

Activation des éosinophiles humains par des nanoparticules

Denis Girard
Maxime Marion-Murphy

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-990

NOS RECHERCHES travaillent pour vous !

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.

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 des normes, de l'équité, 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 CNESST (preventionautravail.com)
- au bulletin électronique [InfoIRSST](#)

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2017
ISBN : 978-2-89631-967-1
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
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
novembre 2017

Activation des éosinophiles humains par des nanoparticules

Denis Girard, Maxime Marion-Murphy

INRS-Institut Armand-Frappier

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-990



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.

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 la réalisation de cette étude, particulièrement les étudiants gradués dont le projet de recherche en nanotoxicologie portait entièrement ou partiellement sur l'effet des nanoparticules sur la biologie des éosinophiles humains. Nous exprimons donc notre gratitude envers ces étudiants au second cycle, Luis Rafael Silva et Yannick Samson.

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

SOMMAIRE

L'économie du Canada, comme celle de bien d'autres pays industrialisés, bénéficie du développement des nanotechnologies dont le fort potentiel peut être exploité dans plusieurs secteurs industriels. Un nombre croissant d'entreprises québécoises de production de nanoparticules (NP) est d'ailleurs déjà implanté et tout porte à croire que d'autres emboîteront le pas dans les années à venir. Ce faisant, non seulement le nombre de travailleurs œuvrant dans la fabrication et la synthèse des NP augmentera sensiblement, mais également le nombre de ceux qui seront appelés à en manipuler et à en transformer dans les domaines des nanotechnologies en général. Une des conséquences de cette situation est l'augmentation du nombre de personnes potentiellement exposées aux NP. Dans la littérature scientifique, de nombreux travaux rapportent des effets inflammatoires causés par l'inhalation de NP; le système respiratoire étant l'une des voies d'exposition aux NP les plus probables. En effet, il a été démontré, par exemple, que des NP comme les oxydes de zinc (ZnO) et de cuivre induisent un recrutement de cellules immunitaires de types éosinophiles (ÉO) dans les poumons des rongeurs. Ces cellules sont bien connues pour causer divers désordres et maladies pulmonaires comme l'asthme. Malgré ce fait, aucune donnée relative aux interactions entre les NP et les ÉO humains n'était disponible avant la réalisation du présent projet. De ce fait, le mode d'action des NP sur la biologie des ÉO était inconnu. En plus des voies respiratoires, les personnes peuvent être exposées par contact cutané et même par ingestion; les NP pouvant ainsi se frayer un chemin par la circulation sanguine ou à travers les divers tissus.

Devant ces faits, l'hypothèse voulant que les NP puissent altérer la biologie des ÉO humains a été émise et le comblement de cette lacune a été retenu comme principal objectif du présent projet. Pour élargir le champ des connaissances et mieux comprendre le mode d'action des NP, des ÉO de donneurs sains et consentants ont été fraîchement isolés puis exposés à une NP donnée afin d'évaluer les capacités modulateurs de plusieurs fonctions, toutes reliées au processus inflammatoire. Parmi ces fonctions, la capacité des NP à affecter la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), le chimiotactisme, l'adhérence, l'apoptose et la production de certaines cytokines par les ÉO.

En utilisant une approche expérimentale, il a été possible de dresser un tableau démontrant les effets différentiels des NP sur la biologie des ÉO humains. Ainsi, par exemple, les NP de dioxyde de cérium (CeO₂) sont celles qui induisent le plus fortement la production de ROS alors qu'elles ne modulent pas l'apoptose. Ajoutons que les NP de dioxyde de titane (TiO₂) sont celles qui augmentent le plus la capacité des ÉO à adhérer à un substrat cellulaire alors qu'elles n'ont pas ou peu d'effets sur la production de ROS et sur l'apoptose.

L'ensemble des résultats démontre clairement qu'il est difficile de classifier les NP strictement selon leur potentiel à modifier l'une ou l'autre des fonctions étudiées. Il est préférable de présenter un tableau plus nuancé dans lequel les effets provoqués par une NP donnée sur la biologie des ÉO humains *in vitro* doivent être pris en considération pour en éclaircir le mode d'action. Les effets des NP sont donc extrêmement variés et la présente étude vise à démontrer qu'elles n'agissent pas toutes de la même façon.

Les retombées de ce projet effectué avec des cellules isolées d'individus sains sont multiples. Les résultats permettront, par la suite, de justifier l'utilisation de cellules de travailleurs

potentiellement exposés aux NP, incluant les chercheurs, les étudiants et le personnel technique, afin d'étudier les fonctions des ÉO qui pourraient avoir des réponses fonctionnelles disproportionnées ou, à l'inverse, très faibles. Les résultats et les observations de cette étude, combinés à ceux qui seront décrits par d'autres équipes étudiant différentes facettes de la toxicité des NP, permettront d'aider à la prise de certaines décisions sur le plan de la gestion des risques liés à une exposition des travailleurs aux nanoparticules.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	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 Choix des nanoparticules.....	7
3.2 Isolement des cellules.....	8
3.3 Traitement des cellules.....	8
3.4 Vérification de l'interférence des NP dans les diverses techniques employées.....	8
3.5 Localisation des NP dans les cellules par cytométrie en flux et microscopie électronique en transmission.....	9
3.6 Fonctions étudiées.....	9
3.6.1 Production des dérivés réactifs de l'oxygène.....	9
3.6.2 Migration/chimiotactisme.....	10
3.6.3 Adhérence sur un substrat cellulaire.....	10
3.6.4 Apoptose.....	10

3.6.5	Production d'analytes (cytokines et chimiokines)	10
3.7	Analyse statistique.....	11
4.	RÉSULTATS	13
4.1	Viabilité cellulaire	13
4.2	Localisation des NP dans les cellules ÉO	15
4.3	Altération des fonctions des ÉO.....	17
4.4	Production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....	20
4.5	Effets des NP sur le chimiotactisme des ÉO	21
4.6	Capacité des NP à induire l'adhérence des ÉO	22
4.7	Modulation de l'apoptose par les NP	23
4.8	Production d'analytes par les ÉO en réponse aux NP.....	24
5.	DISCUSSION	27
6.	CONCLUSION.....	31
	BIBLIOGRAPHIE.....	33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nanoparticules étudiées dans ce projet	7
Tableau 2. Caractérisation des nanoparticules utilisées dans cette étude	14
Tableau 3. Effets différentiels des NP sur la biologie des éosinophiles humains.....	17

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO ₂) sur la viabilité cellulaire des éosinophiles humains.....	15
Figure 2.	Ingestion des NP par les ÉO humains, déterminée par cytométrie en flux.....	16
Figure 3.	Absence de nanoparticules à l'intérieur des éosinophiles humains par microscopie électronique en transmission.	16
Figure 4.	Effets de certaines nanoparticules sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....	20
Figure 5.	Production de superoxyde (O ₂ ⁻) en réponse à certaines nanoparticules.....	21
Figure 6.	Effets de certaines nanoparticules sur le chimiotactisme.....	21
Figure 7.	Capacité de certaines nanoparticules à augmenter l'adhérence des éosinophiles sur les cellules EA.hy926.....	22
Figure 8.	Modulation de l'apoptose des éosinophiles humains par les nanoparticules.....	23
Figure 9.	Détermination de l'effet antiapoptotique des nanoparticules de ZnO par cytologie (A) et par cytométrie en flux (B).....	24
Figure 10.	Criblage de la production de cytokines par les éosinophiles en réponse aux NP.	25
Figure 11.	Quantification de la production des cytokines IL-8, RANTES et IL-1β par les ÉO humains en réponse à certaines NP.	26

LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

Ag : Argent

Al₂O₃ : Alumine ou oxyde d'aluminium

Au : Or

CeO₂ : Dioxyde de cérium

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

Dendrimère G0-3 : Dendrimère de génération 0 à 3

DLS : Dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

ÉO : Éosinophile

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

FITC : Fluorescein isothiocyanate (isothiocyanate de fluorescéine)

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HBSS : Hank's balanced salt solution

IL : Interleukine

INRS : Institut national de la recherche scientifique

MET : Microscopie électronique en transmission

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

MFI : Mean fluorescence intensity

NP : Nanoparticule

NP_x : Nanoparticule ayant un diamètre x (nm)

PAMAM : Poly(amidoamine)

PBS : Phosphate buffered saline

Pd : Palladium

PMA : Phorbol myristate acetate

Pt : Platine

RANTES : Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

ROS : Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène)

SEM : Standard error of mean (erreur type de la moyenne)

SOD : Superoxyde dismutase

SSC : Paramètre indiquant l'intensité de la fluorescence d'une cellule (side scatter)

TiO₂ : Dioxyde de titane

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

VAA-I : Viscum album agglutinine-I

ZnO : Oxyde de zinc

1. INTRODUCTION

1.1 Problématique

Les nanotechnologies accompagnent de plus en plus notre quotidien. En effet, l'utilisation croissante des nanomatériaux dans les secteurs industriel et médical a une influence directe sur l'exposition aux NP d'un bon nombre de travailleurs, mais également de la population en général¹⁻⁴. Étant donné le potentiel économique indéniable des nanomatériaux pour les pays industrialisés, incluant le Canada, l'engouement à développer de nouveaux procédés par des moyens nanotechnologiques dans divers secteurs ne fera qu'amplifier l'implantation d'entreprises de production de NP au pays. De plus, il y a fort à parier que plusieurs compagnies acquerront des NP afin de les introduire dans leurs lignes de production, et ce, sans pour autant être en mesure d'éliminer ou de maîtriser les risques pour la santé de leurs employés.

Le Québec ne fait pas exception et bien qu'un nombre restreint d'entreprises de production de NP soit implanté, il est plausible d'imaginer que ce nombre augmentera dans les années à venir⁵. La question de la prévention des accidents et des maladies liés aux NP prend alors toute son importance en raison des effets inflammatoires causés par l'inhalation des NP. En effet, bien que les dangers potentiels d'une exposition aux NP puissent résulter en des effets cytotoxiques, génotoxiques, et même en des cancers, les maladies inflammatoires sont les plus probables sachant que le système respiratoire représente une cible importante d'exposition des travailleurs. Il a déjà été démontré que plusieurs NP possèdent des propriétés pro-inflammatoires selon leur capacité à altérer la biologie des neutrophiles humains *in vitro* et en induisant une infiltration leucocytaire *in vivo*⁶⁻¹². Les neutrophiles sont des cellules importantes dans l'établissement de l'inflammation. Ces travaux témoignent donc du potentiel inflammatoire des NP. De plus, il est fort probable que les NP constituent un facteur aggravant de certaines maladies pulmonaires comme l'asthme. Il n'est donc pas étonnant que les études se multiplient afin de mieux connaître les effets toxiques de certaines NP et leur mode d'action, ainsi que l'efficacité des moyens de les contenir¹³⁻¹⁶. De fait, une bonne partie des études rapportées dans la littérature scientifique traitent du rôle potentiel des NP en relation avec des désordres/maladies inflammatoires pulmonaires, incluant les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC), l'asthme, et la fibrose kystique^{17,18}. Par exemple, il a été démontré que des NP de dioxyde de titane (TiO₂) induisent des symptômes de l'emphysème et qu'elles stimulent directement la sécrétion de mucine (protéine entrant dans la composition du mucus) par des cellules bronchiales¹⁹. Également, il a été établi que des NP comme les oxydes de zinc (ZnO) et de cuivre²⁰ provoquent un recrutement d'ÉO dans les poumons des rongeurs²¹. Une autre étude démontre que le TiO₂ et des NP d'or aggravent l'inflammation pulmonaire dans un modèle d'asthme induit par les isothiocyanates chez la souris²².

Paradoxalement, certaines études, bien que leur nombre soit restreint, avancent que l'exposition de rats au TiO₂²³ produirait des effets plutôt bénéfiques comme la diminution des symptômes de l'asthme allergique. Cela témoigne donc de la grande complexité à étudier et à déterminer la toxicité des NP. Le présent projet est axé sur l'étude des interactions entre les NP et les ÉO humains, des cellules qui jouent un rôle important dans l'asthme et autres désordres pulmonaires²⁴⁻²⁷. D'où l'intérêt de connaître davantage la toxicité de certaines NP pour les cellules humaines primaires les plus susceptibles d'exercer un rôle pathogénique dans le

développement ou l'exacerbation de l'asthme ou autres désordres inflammatoires pulmonaires. Ces connaissances permettront de dresser une liste des NP en fonction de leur potentiel à activer ou non les fonctions cellulaires des ÉO. Cette liste pourra être utile dans plusieurs secteurs et faciliter l'évaluation des risques pour la santé des travailleurs exposés aux NP.

1.2 État des connaissances

Les ÉO sont des cellules bien connues pour leur rôle important de défense de l'organisme contre les helminthes (vers parasitaires). Cependant, des données plus récentes indiquent que ces cellules jouent un rôle extrêmement important dans la régulation de l'inflammation, principalement en raison de la capacité des ÉO à emmagasiner de puissants modulateurs inflammatoires préformés, comme certaines cytokines et certains facteurs chimioattractants (chimiokines)^{24,25,28,29}. Chez l'animal, un nombre plus élevé d'ÉO a été observé dans les poumons à la suite de traitements avec différentes NP d'oxyde de cuivre et d'oxyde de zinc²¹. Dans cette dernière étude, un fait très intéressant a été observé; les NP de zinc et de cuivre, mais pas les ions, ont induit une infiltration éosinophilique dans les poumons. Une étude récente démontre également qu'une administration intratrachéale de NP d'oxyde de nickel chez des rats provoque une arrivée massive d'ÉO observée dans les lavages broncho-alvéolaires et associée à une production d'éotaxine, une chimiokine qui joue un rôle de tout premier plan dans l'inflammation allergique³⁰. Gustafsson et coll. (2011) ont étudié les effets inflammatoires de NP de TiO₂ administrées de façon intratrachéale chez le rat sur une période allant jusqu'à 90 jours³¹. Les auteurs rapportent une présence accrue de diverses cytokines, incluant IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF et la chimiokine CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) dans les voies respiratoires aux jours 1 et 2 suivant l'instillation des NP, présence qui était accompagnée d'un influx d'ÉO et de neutrophiles. Alors que le nombre de neutrophiles demeurait élevé jusqu'au jour 30 post-instillation, celui des ÉO revenait au niveau de base après 8 jours. À l'inverse, une étude a démontré qu'une administration sous-cutanée de NP de type fullerène (nC60) dans un modèle d'inflammation de la peau par traitement à l'ovalbumine causait plutôt un effet anti-inflammatoire incluant une diminution du nombre d'ÉO dans les échantillons de peau³². Il devient intéressant de constater, par ces observations, que les réponses aux NP sont complexes et que le dénombrement des ÉO est couramment utilisé comme marqueur de l'inflammation. Toutefois, les connaissances actuelles concernant les effets directs des NP sur les ÉO, particulièrement les effets potentiels sur leur biologie, sont incomplètes.

Chez certains travailleurs qui ont développé des symptômes allergiques, il est bien documenté que le retrait de leur milieu de travail ou leur relocalisation résulte bien souvent en une diminution ou une disparition desdits symptômes. Portant plus précisément sur les ÉO, une étude récente de suivi, effectuée avec des individus souffrant d'asthme professionnel, démontre une baisse rapide de l'inflammation après le retrait de l'exposition³³. Bien que dans ce cas les individus ne semblent pas avoir été exposés à des NP, il est fort probable que dans un avenir rapproché, les mêmes observations soient rapportées dans la littérature chez des travailleurs exposés aux NP. Pour l'instant, cela demeure encore purement hypothétique. Toutefois, au moins deux études rapportent des troubles inflammatoires observés chez un travailleur exposé à des NP de nickel³⁴ et un autre exposé plutôt à des NP de carbone³⁵. Dans la première étude, un homme âgé de 38 ans, sans historique médical, a inhalé des NP de nickel alors qu'il en aspergeait des pièces composant une turbine; il est décédé 13 jours après cette exposition. L'autopsie a révélé

que la cause du décès était le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte et des NP de nickel, dont le diamètre était en deçà de 25 nm, ont été observées par microscopie électronique en transmission (MET) dans les macrophages alvéolaires de l'individu. Alors que les taux normaux de nickel dans l'urine sont de l'ordre de 0,25-5,0 µg/L, ceux mesurés chez le travailleur exposé étaient de 780 µg/L³⁴. De plus, ses reins présentaient des évidences de nécrose tubulaire aiguë. Dans l'autre étude, une employée de bureau rapportait une perte de poids et des diarrhées sévères. Bien qu'une endométriase fût suspectée, les résultats de laparoscopie ont révélé la présence de nombreux points noirs sur le péritoine. Des agrégats de NP de carbone ayant un diamètre de 31-67 nm furent observés dans ses tissus par microscopie électronique à balayage et en transmission. Des biopsies du colon ont témoigné d'une maladie inflammatoire de l'intestin avec des signes de la maladie de Crohn, mais sans dépôt des NP. Bien qu'aucun trouble respiratoire n'ait été rapporté par cette employée, il a été conclu que les NP de carbone, utilisées dans les cartouches d'encre d'imprimante au laser, ont été véhiculées par les vaisseaux sanguins à la suite de l'inhalation des poussières par les poumons. Bien que dans ces deux études des individus présentent des troubles inflammatoires associés à une exposition à des NP, aucune allusion aux ÉO n'a été faite. Toutefois, ensemble, ces deux études renforcent le scénario probable que les expositions potentielles grandissantes des travailleurs aux NP pourraient générer plusieurs problèmes inflammatoires, incluant une participation des ÉO.

Curieusement, bien que les ÉO soient des cellules importantes dans l'asthme et autres désordres pulmonaires, ainsi que dans le développement des cancers³⁶ et maladies inflammatoires de l'intestin²⁸, il existe une carence majeure dans la littérature quant aux interactions entre les ÉO humains et les NP. En fait, les données probantes quant au mode d'action des NP sont quasi inexistantes. Pourtant, le modèle le plus fréquemment utilisé présentement pour l'initiation de mécanismes pathogéniques induits par les NP est clairement celui des effets engendrés par l'inflammation, faisant de cette dernière la cible parfaite pour évaluer la toxicité des NP^{37,38}. Actuellement, la majorité des études *in vitro* effectuées en laboratoire consistent en l'incubation de cellules de lignées immortalisées d'origine animale (la majeure partie) ou humaine. Très peu d'études ont eu recours à des cellules humaines primaires et aucune étude approfondie ne traite de l'effet des NP sur les ÉO humains. Toutefois, comme mentionné auparavant, des résultats obtenus principalement par la présente équipe de recherche avec des neutrophiles humains, cellules importantes en matière d'inflammation, indiquent clairement qu'ils représentent une cible importante pour les NP^{6,7,10,11,39-45}.

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

2.1 Hypothèse

Dans un projet de recherche précédent, également subventionné par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST)¹², il a été démontré que les neutrophiles humains peuvent répondre différemment à certaines NP, témoignant d'une certaine sélectivité initiée par l'interaction NP-neutrophiles. Partant de ce fait, l'hypothèse voulant que les ÉO humains soient susceptibles de répondre différemment à certaines NP a été émise.

2.2 Objectifs

L'objectif principal est de comprendre et d'établir comment les ÉO humains réagissent face à une activation par les NP *in vitro* afin d'en déterminer les modes d'action et d'approfondir les connaissances dans ce domaine. De façon plus spécifique, les objectifs sous-jacents visent :

- i. à établir quelles NP, parmi plusieurs types, vont activer les ÉO, afin d'en dresser une liste selon leur potentiel activateur;
- ii. à déterminer quelles fonctions des ÉO sont modulées à la hausse ou à la baisse par les NP;
- iii. à élucider si les ÉO sont affectés sans égard à la taille d'une NP donnée;
- iv. à vérifier s'il y a corrélation entre la capacité de certaines NP à moduler une fonction donnée des ÉO et la distribution de la taille ou le potentiel zêta des NP concernées.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Choix des nanoparticules

Plusieurs types de NP étaient à la disposition de l'équipe de recherche. Pour le présent projet, le choix des NP présentées dans le **tableau 1** découlait de travaux antérieurs^{6,7,10,11,39-42,46-48}, témoignant d'un certain potentiel pro-inflammatoire de ces dernières. Ce choix devenait évident pour des fins de comparaisons avec d'autres études et également parce que ces NP sont amplement étudiées en nanotoxicologie. En effet, étant largement utilisées en industrie et se retrouvant dans plusieurs produits faisant partie du quotidien, elles font partie des particules auxquelles les travailleurs de plusieurs secteurs risquent d'être exposés, ici ou ailleurs dans le monde. Bien que le présent rapport prenne en considération les résultats d'études précédentes concernant les propriétés pro-inflammatoires des NP les plus susceptibles d'être utilisées au Québec, le présent projet a permis d'étudier en parallèle des NP connues également pour être largement employées au niveau mondial, comme le dioxyde de titane (TiO₂) et diverses NP d'argent^{7,8,41}. Malgré le fait que plusieurs de ces substances aient déjà fait l'objet d'études sur leurs effets sur la santé^{2,18,49}, leurs mécanismes d'action et leurs effets sur la biologie des ÉO humains sont encore largement inconnus.

Tableau 1. Nanoparticules étudiées dans ce projet

	NP	Fournisseur
1	AgNP ₁₅	US Research Nanomaterials Inc.
2	AgNP ₂₀	Ted Pella, Inc.
3	AgNP ₇₀	Ted Pella, Inc.
4	Al ₂ O ₃	Nanostructured & Amorphous Materials Inc.
5	AuNP [*]	Sciventions Inc.
6	AuNP ⁺	Sciventions Inc.
7	AuNP ₇₀	Ted Pella, Inc.
8	CeO ₂	Vive Nano Inc.
9	Dendrimère G0 [†]	Sigma-Aldrich
10	Dendrimère G1 [†]	Sigma-Aldrich
11	Dendrimère G2 [†]	Sigma-Aldrich
12	Dendrimère G3 [†]	Sigma-Aldrich
13	Fe ₃ O ₄	Sciventions Inc.
14	Palladium	Sciventions Inc.
15	Platine	Sciventions Inc.
16	TiO ₂ (rutile)	Sciventions Inc.
17	ZnO	Sciventions Inc.

* chargé négativement ou positivement

† Dendrimère poly(amidoamine) (PAMAM)

Au préalable, chacune des NP obtenues directement du manufacturier a été mise en suspension dans l'eau ultra-pure, à une concentration de 50 µg/mL, puis a été caractérisée par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un appareil de type Nanosizer (Malvern). Cela a permis d'obtenir la distribution de la taille, le potentiel *zêta* ainsi que l'index de polydispersité. Cette concentration a été sélectionnée selon la littérature scientifique, où des cellules ont été incubées *in vitro* avec des concentrations de NP variant de 0-1000 µg/mL^{6,7,10,13,15} et certains résultats préliminaires ont indiqué que les concentrations étudiées n'induisaient pas la mort cellulaire par nécrose.

3.2 Isolement des cellules

Pour cette étude, les ÉO ont été fraîchement isolés à partir du sang d'individus sains faisant partie d'une banque de donneurs consentants fréquemment utilisée. Les prises de sang ont été effectuées par une infirmière dans un bureau de santé localisé dans le centre de recherche où se déroule la présente étude. Après l'isolation des granulocytes (fraction contenant principalement des neutrophiles + ÉO), la pureté des cellules des donneurs a été évaluée par cytologie, à la suite d'une coloration. En général, une présence d'ÉO variant entre 1-5 % est observée; le reste étant des neutrophiles. Bien que nos donneurs ne soient pas connus pour être asthmatiques ou rhinitiques, nous pouvons exceptionnellement observer un nombre plus élevé d'ÉO, mais ce nombre est toujours inférieur à 10 %. Lorsque la présence d'au moins 2 % d'ÉO était observée, la suspension cellulaire était reprise. Elle a été traitée pour purifier les ÉO et éliminer les neutrophiles par la technique de séparation négative, à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques, une technique régulièrement utilisée dans le laboratoire⁵⁰.

3.3 Traitement des cellules

Les ÉO ont été traités *in vitro* avec des concentrations croissantes d'une NP donnée (en général 0-500 µg/mL), pour différentes périodes allant de 0 à 120 min pour les fonctions de production de radicaux libres, de chimiotactisme et d'adhérence, ou pendant 24 h pour les fonctions d'apoptose et de production de cytokines. En tout temps, des témoins négatifs (milieu de culture dans lequel les NP sont en suspension) et positifs ont été utilisés, incluant le phorbol-12-myristate-13-acétate ou PMA (radicaux libres), les cytokines IL-5 (chimiotactisme), GM-CSF et TNF-α (adhérence) et la lectine de plante *Viscum album* agglutinine-I ou VAA-I (apoptose). Les effets des NP sur la viabilité cellulaire ont été vérifiés par la technique d'exclusion au bleu de trypan. Il est important de noter ici que les ÉO sont des cellules connues pour se diriger spontanément en apoptose lorsque mis en culture sans agents autre que du sérum. En effet, après 24 h d'incubation, environ 30-50 % des cellules sont en apoptose et non pas mortes par nécrose alors qu'elles éclateraient. De plus, les cellules en apoptose excluent le bleu de trypan puisque leur membrane est préservée et, de ce fait, sont considérées viables.

3.4 Vérification de l'interférence des NP dans les diverses techniques employées

Certaines NP ont la capacité d'interférer avec des techniques utilisées en toxicologie permettant de mesurer différentes fonctions cellulaires^{51,52}. Par exemple, certaines techniques requièrent l'utilisation de fluorochromes pour obtenir des mesures d'intensité de fluorescence et ainsi

évaluer une fonction cellulaire donnée. Dans la présente étude, pour chacune des NP étudiées, il a été vérifié qu'en aucun cas elles n'interféraient avec les intensités des signaux obtenus par les différentes techniques utilisées (voir sous-section 3.6). Pour ce faire, certaines mesures/lectures ont été effectuées au préalable avec des solutions ne contenant que les suspensions des différentes NP étudiées, en absence de cellules. En aucun cas, une telle interférence pouvant diminuer ou augmenter l'intensité des signaux mesurés en laboratoire n'a été notée.

3.5 Localisation des NP dans les cellules par cytométrie en flux et microscopie électronique en transmission

La capacité des NP à pénétrer à l'intérieur des ÉO a été déterminée par cytométrie en flux. En effet, cette technique peut être utilisée pour déterminer si un type de NP pénètre à l'intérieur des cellules, en évaluant les niveaux de fluorescence d'une cellule et la granularité/complexité (SSC pour *side scatter*); plus la fluorescence est élevée plus la complexité des cellules est grande⁵³. Toutefois, cette technique doit être utilisée principalement lors des premiers moments de contact entre les NP et les cellules, c.-à-d. dans les premières 30 à 60 minutes. Par la suite, les résultats peuvent devenir difficiles à interpréter, générant des faux positifs. Les ÉO ont donc été incubés pendant 1 à 60 minutes dans 100 µg/mL d'une NP donnée. Au moment désiré, les tubes contenant les cellules et les NP ont été plongés dans la glace pour ensuite être centrifugés. Les surnageants ont été éliminés puis les culots ont été défaits et mis en suspension avec un tampon de solution saline au phosphate (phosphate buffered saline [PBS]) frais. Cette opération a été répétée trois fois afin d'éliminer les NP libres. Au terme de cette opération, l'intensité de la fluorescence des cellules (paramètre SSC) a été déterminée à l'aide d'un cytomètre en flux (BD FACSCalibur™).

Cette approche a été utilisée pour des fins de criblage. Dans les cas où les résultats obtenus suggéraient que les NP étaient à l'intérieur des cellules, comme pour les AgNP₁₅ et les AgNP₂₀ (voir sous-section 4.2), des observations par MET ont été effectuées pour confirmer leur présence. Pour ce faire, des ÉO fraîchement isolés ont été incubés en présence des NP pour une période s'échelonnant de quelques minutes à 24 h. Les ÉO ont ensuite été récupérés puis lavés trois fois avec un milieu tamponné avant d'être mélangés à des cellules AML14.3D10 (rapport 1:5), afin d'obtenir un meilleur support pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Cette étape était nécessaire étant donné le nombre limité d'ÉO qu'un individu sain possède dans le sang ainsi que les faibles quantités de sang utilisées dans cette étude (50-60 mL).

3.6 Fonctions étudiées

Étant donné que, dans son ensemble, la présente étude portant sur les interactions ÉO-NP s'inscrit dans un créneau de recherche qui peut nécessiter des développements de connaissances pouvant s'échelonner sur plusieurs années, les résultats présentés dans ce rapport découlent des recherches effectuées seulement sur certaines fonctions.

3.6.1 Production des dérivés réactifs de l'oxygène

La production des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* [ROS]) peut être mesurée par différentes techniques. Dans le cas présent, la production de radicaux libres totaux

intracellulaire par cytométrie en flux a été mesurée à l'aide de la sonde CM-H₂DCFDA, comme il a été préalablement détaillé¹⁰. La production spécifique du superoxyde (O₂⁻) extracellulaire a été mesurée par spectrophotométrie⁵⁴, à l'aide de la technique de réduction du ferrocyclochrome *c*. Pour ce faire, les ÉO (5 x 10⁵ cellules/mL) en solution dans du *Hank's balanced salt solution* (HBSS), supplémenté avec du CaCl₂ (1,6 mM) contenant ou non la superoxyde dismutase (SOD) (10 µg/mL) et du ferrocyclochrome *c* (130 µM), ont été incubés en présence des NP indiquées (50 µg/mL) ou du PMA (0,05 µM) pendant 24 h à 37 °C. La réduction du ferrocyclochrome *c* a été suivie à 550 nm et la concentration d'ions superoxydes produits a été calculée en soustrayant les puits correspondants avec et sans SOD, en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 21,1.

3.6.2 Migration/chimiotactisme

La technique ayant recours à une chambre de Boyden, un montage simple composé d'une chambre inférieure et supérieure séparée par une membrane poreuse, a été retenue. Brièvement, une NP donnée ou un témoin positif, l'IL-5 (à 100 ng/mL), est placé dans la chambre inférieure et la membrane y est déposée pour ensuite ajouter les ÉO dans la chambre supérieure. Après différentes périodes, la membrane est récupérée, colorée, montée sur une lame de microscope et le nombre d'ÉO accolés sur la membrane (partie faisant face à la chambre inférieure) est déterminé.

3.6.3 Adhérence sur un substrat cellulaire

La lignée de cellules endothéliales humaines, les EA.hy926 (American Type Culture Collection [ATCC]) peut être utilisée pour plusieurs passages, contrairement aux cellules endothéliales primaires ou celles de type HUVEC. Ces cellules endothéliales ont donc servi comme substrat et ont accueilli les ÉO préalablement marqués pendant 30 min avec 5 µM de calcéine-AM (Molecular Probes ®) et préalablement traitées avec un témoin négatif (milieu de culture), un témoin positif (cytokine GM-CSF ou TNF-α) ou une NP donnée⁵⁵. Par la suite, après trois lavages, les ÉO adhérents ont été dénombrés par microscopie à fluorescence.

3.6.4 Apoptose

Deux méthodes fréquemment utilisées en laboratoire ont été retenues pour évaluer le degré d'apoptose^{7,50,54}. La première, pour un premier criblage, consiste à dénombrer le nombre d'ÉO par cytologie, en microscopie optique; les cellules en apoptose sont aisément reconnaissables puisqu'elles rapetissent et que leur noyau bilobé caractéristique change complètement de forme pour devenir pycnotique. La seconde technique consiste à déterminer le nombre de cellules qui sont positives à l'annexine-V couplée à un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-Annexin-v), à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (BD Biosciences).

3.6.5 Production d'analytes (cytokines et chimiokines)

Les analytes présents dans les surnageants d'ÉO ayant été traités ou non avec une NP donnée ont été analysés par une approche utilisant une trousse nommée ELISArray (Multi-Analyte

ELISArray Kits, Qiagen). Cette technique permet de détecter simultanément la présence ou non de plusieurs analytes dans un même échantillon. Pour les expériences de criblage, différents surnageants de donneurs ont été mixés (3-5 donneurs différents) afin de fournir une bonne idée de la modulation ou non d'un analyte donné (cytokine, chimiokines). Nous avons sélectionné des trousse commerciales visant la détection des cytokines/chimiokines connues pour être importantes dans l'initiation et régulation de l'inflammation. Par la suite, la concentration des analytes dont la production a été plus importante a été confirmée et quantifiée séparément pour chaque donneur par la technique ELISA.

3.7 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés par une moyenne \pm erreur type de la moyenne ⁵⁶ ($n \geq 3$). Une analyse de la variance a aussi été effectuée (ANOVA à un facteur) et les différences de chacun des groupes par rapport au groupe témoin ont été examinées à l'aide du test de Dunnett utilisant GraphPad Prism (version 5.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). Les données ont été considérées significatives avec une valeur de $p < 0,05$.

4. RÉSULTATS

4.1 Viabilité cellulaire

Après avoir caractérisé chacune des NP par diffusion dynamique de la lumière à la concentration de 50 µg/mL (moyenne ± SEM, n=3) (**tableau 2**), des tests de viabilité cellulaire ont été effectués afin de déterminer les concentrations idéales à utiliser pour étudier les fonctions cellulaires des ÉO. Ces concentrations de NP étaient normalement comprises entre 0 et 500 µg/mL. En général, moins de 10 % de nécrose a été observée pour toutes les NP testées, jusqu'à des concentrations > 200 µg/mL, pour une période de traitement allant jusqu'à 24 h. Il est à noter que les ÉOs sont connues pour se diriger spontanément en apoptose et qu'après environ 24 h d'incubation, 30-50 % des cellules seront apoptotiques sans traitement.

En se basant sur la littérature et pour fins de comparaison et de standardisation, la majorité des tests ont été réalisés avec des concentrations de 50 µg/mL, parfois en incluant en parallèle des concentrations moindres ou plus élevées (comme indiquée dans la description des résultats). Dans les conditions utilisées pour les analyses effectuées par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, [DLS]), certaines NP montrent un diamètre plus élevé que 100 nm (**tableau 2**), indiquant la présence de plus gros agrégats. Toutefois, la possibilité qu'une désagrégation des NP ait lieu lorsqu'elles sont déposées dans les cultures cellulaires pouvant ensuite mener à des tailles plus petites ne peut être exclue.

La **figure 1** illustre des résultats typiques obtenus à la suite de l'évaluation de la viabilité cellulaire des ÉO traités avec des NP de dioxyde de cérium (CeO₂) selon la technique d'exclusion au bleu de trypan, où il est aisé de constater que les NP ne sont pas très nécotiques pour les cellules, avec un pourcentage de viabilité de plus de 90 %.

Tableau 2. Caractérisation des nanoparticules utilisées dans cette étude

NP	Diamètre (nm)	% de NP dans la suspension	Index de polydispersion	Potentiel ζ
AgNP ₁₅	86,6 ± 26,2 16,7 ± 18,6	89,4 ± 12,1 10,6 ± 12,1	0,26 ± 0,03	-9,8 ± 0,2
AgNP ₂₀	34,9 ± 1,5 1450, 0 ± 2512	99,2 ± 1,4 0,8 ± 1,4	0,17 ± 0,006	-41,3 ± 1,7
AgNP ₇₀	89,7 ± 1,5	100	0,18 ± 0,01	-50,0 ± 0,6
Al ₂ O ₃	481,2 ± 18,4	100	0,4 ± 0,04	-17,1 ± 0,9
AuNP ⁺	189 ± 6,9 7,5 ± 13,0	99,3 ± 1,3 0,7 ± 1,3	0,3 ± 0,008	- 5,5 ± 0,4
AuNP ⁻	46,7 ± 0,02 3033 ± 2623	95,7 ± 4,1 4,3 ± 4,1	0,5 ± 3,6	-9,7 ± 2,3
AuNP ₇₀	132,4 ± 1,4	100	0,1 ± 0,005	-9,5 ± 0,8
CeO ₂	90,9 ± 4,6 10,8 ± 2,2	83,2 ± 4,2 16,8 ± 4,2	0,5 ± 0,003	-15,9 ± 2,1
Fe ₃ O ₄	767,3 ± 169 11,2 ± 16,7 3416 ± 2990	71,6 ± 5,5 26,4 ± 4,3 2 ± 2,6	0,9 ± 0,2	-17,7 ± 0,9
PAMAM G0	164,9 ± 156,7 4,8 ± 6,9 0,8 ± 1,4	70,7 ± 7,4 24,8 ± 2,7 4,5 ± 7,8	0,9 ± 0,09	-4,9 ± 1,5
PAMAM G1	373,6 ± 115, 4 0,8 ± 0,07	78,6 ± 7,0 21,4 ± 7,0	0,9 ± 0,09	-0,9 ± 0,9
PAMAM G2	246, 0 ± 61, 7	100	0,5 ± 0,1	-0,09 ± 0,9
PAMAM G3	273,4 ± 72,1 4,2 ± 1,0 0,5 ± 0,5	54,6 ± 14,4 33,0 ± 1,8 9,7 ± 8,7	0,8 ± 0,3	0,2 ± 1,9
Pd	277,6 ± 7,8 32,0 ± 7,0 7,7 ± 1,1	83,5 ± 2,1 12,4 ± 1,3 4,1 ± 1,1	0,6 ± 0,04	-8,4 ± 0,2
Pt	34,0 ± 2,0 1289 ± 2232	99,3 ± 1,2 0,7 ± 1,2	0,4 ± 0,004	-8,8 ± 1,3
TiO ₂	77,7 ± 20,9 8,0 ± 10,4	90,4 ± 2,8 9,7 ± 7,4	0,3 ± 0,1	-11,1 ± 0,4
ZnO	70,4 ± 3,5 11,5 ± 0,3 3054 ± 310	66,8 ± 3,6 26,0 ± 1,7 7,2 ± 2	0,5 ± 0,08	-11,3 ± 0,4

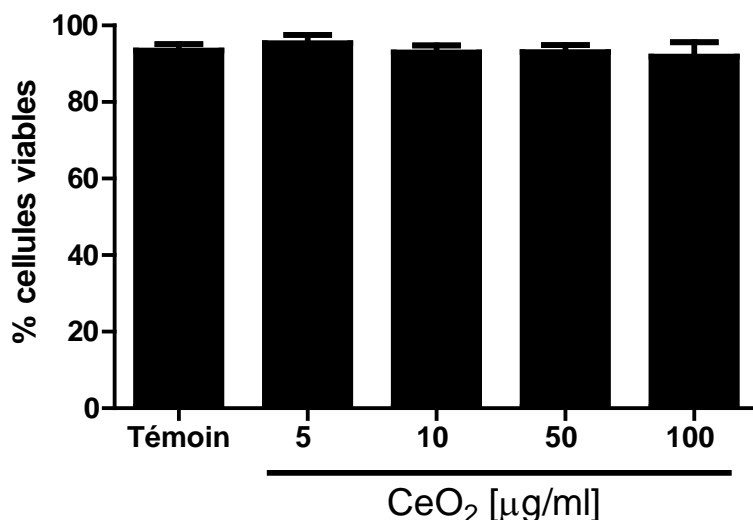


Figure 1. Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium (CeO₂) sur la viabilité cellulaire des éosinophiles humains.

Les ÉO humains ont été incubés pendant 24 heures en présence d'un milieu de culture (témoin) ou aux concentrations indiquées de CeO₂ préparées avec le même milieu de culture. La viabilité cellulaire a été déterminée par la technique d'exclusion au bleu de trypan visant à dénombrer le nombre de cellules mortes ou nécrotiques apparaissant bleues sous le microscope. Les résultats (moyenne ± SEM, n=5) sont exprimés en pourcentage de cellules viables.

4.2 Localisation des NP dans les cellules ÉO

La cytométrie en flux a été utilisée pour cribler les NP susceptibles de pénétrer à l'intérieur des ÉO et pour ensuite confirmer ou non leur présence dans les cellules par MET. La **figure 2** illustre le type de résultats obtenus. Selon cette technique, les NP d'argent (AgNP₁₅, AgNP₂₀, mais pas AgNP₇₀) seraient à l'intérieur des ÉO. Toutefois, il a été impossible d'observer ces dernières (AgNP₁₅ et AgNP₂₀) à l'intérieur des ÉO par microscopie électronique (**figure 3**). Cependant, lors d'un projet antérieur, la présence de AgNP₂₀ à l'intérieur des neutrophiles humains avait été confirmée⁴¹. Également, il est à noter que les présentes données obtenues par cytométrie en flux indiquent que les AgNP de plus gros diamètre, comme les AgNP₇₀, ne semblent pas pénétrer à l'intérieur des ÉO. Dans le même ordre d'idée, il a été rapporté que ces AgNP₇₀, chez les neutrophiles, avaient plutôt tendance à demeurer près de la membrane cytoplasmique sans toutefois pénétrer à l'intérieur des cellules après quelques heures d'incubation¹¹. Ce n'est qu'après environ 24 h que la pénétration de quelques AgNP₇₀ à l'intérieur de certaines cellules a pu être observée. Étant donné que plusieurs des fonctions étudiées dans la présente étude ne nécessitaient pas de longues périodes d'incubation avec les NP et que nous observons quand même certaines modulations des réponses cellulaires, il est préférable de véhiculer l'idée qu'il n'est pas nécessaire que les NP pénètrent à l'intérieur des cellules pour induire des effets biologiques.

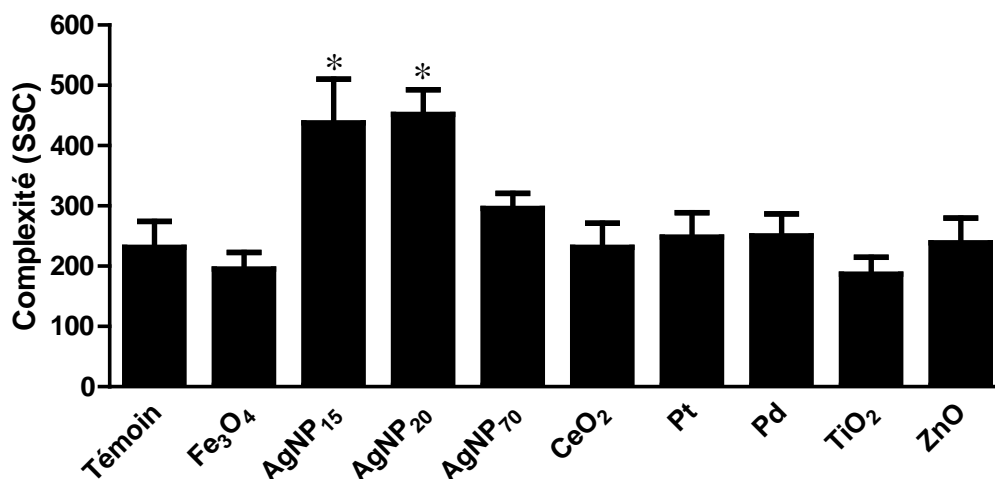


Figure 2. Ingestion des NP par les ÉO humains, déterminée par cytométrie en flux.

Les ÉO ont été incubés pendant 1 heure en présence de milieu de culture (témoin) ou en présence de 100 µg/mL des nanoparticules préparées avec le même milieu de culture. La complexité des cellules a été déterminée par cytométrie en flux en mesurant l'intensité de la fluorescence (paramètre SSC). Les résultats (moyenne ± SEM, n=3) sont exprimés en unité de fluorescence.

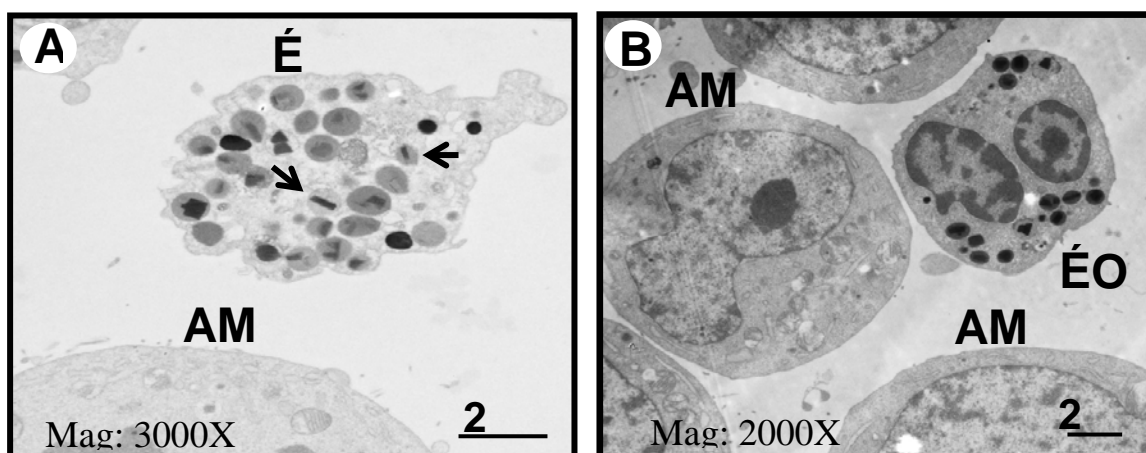


Figure 3. Absence de nanoparticules à l'intérieur des éosinophiles humains par microscopie électronique en transmission.

Les ÉO ont été incubés en présence de 50 µg/mL de AgNP (15, 20 ou 70 nm) pour une période de 2 h et ont ensuite été récupérés puis lavés trois fois avant d'être mélangés avec des cellules AML14.3D10 (rapport 1:5) afin d'obtenir un meilleur support pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Cette étape était importante étant donné le nombre limité d'ÉO qu'un individu sain possède dans le sang. Le panneau A montre un ÉO plus ou moins bien conservé, mais ayant les granules caractéristiques des ÉO, alors que celui en B

montre un ÉO possédant un beau noyau. Dans les deux cas, aucune nanoparticule n'est observable à l'intérieur des cellules. ÉO, éosinophiles; AML, lignée cellulaire AML14.3D10; flèches, granules caractéristiques des ÉO; Mag, grossissement (« magnification »).

4.3 Altération des fonctions des ÉO

Le **tableau 3** montre l'ensemble des données permettant d'examiner la capacité des NP à altérer certaines fonctions des ÉO humains, incluant : *i*) la capacité à élaborer des produits dérivés de l'oxygène (ROS); *ii*) le chimiotactisme; *iii*) l'adhérence; *iv*) l'apoptose; *v*) la production de certaines cytokines/chimiokines. Étant donné les contraintes et les limites à obtenir toujours un bon nombre d'ÉO pour effectuer les manipulations expérimentales, certains tests n'ont pu être effectués pour toutes les NP étudiées.

Tableau 3. Effets différentiels des NP sur la biologie des éosinophiles humains

NP ^a	Test effectué	Effet ^b	Commentaire
AgNP ₁₅	Cytokines ^c	↑↑↑ RANTES	Légère baisse non significative : IL-1α, IL-1β, IL-8 et MIP-1β
AgNP ₂₀	ROS ^d	↑↑	Rapide, observable après 5 minutes
	Apoptose	↓	
	Cytokines	↑↑ RANTES	Aucun effet ou légère baisse non significative : IL-1α, IL-1β, IL-8 et MIP-1β
AgNP ₇₀	ROS	↑	À partir de 30 minutes
	Chimiotactisme	↑↑	
	Apoptose	↑↑↑	Ces NP sont les plus pro-apoptotiques
	Cytokines	↑↑ RANTES	Aucun effet ou légère baisse non significative : IL-1α, IL-1β, IL-8 et MIP-1β
Al ₂ O ₃	Chimiotactisme	↑↑↑	Très chimioattractant pour les ÉO
	Adhérence	↑	
AuNP ⁻	Chimiotactisme	↓	
	Adhérence	↓	Léger
AuNP ⁺	Chimiotactisme	↑	
	Adhérence	↑	
AuNP ₇₀	ROS	↑	À partir de 30 minutes
	Chimiotactisme	↑	
	Adhérence	↑	
	Apoptose	Aucun	
CeO ₂	ROS	↑↑↑↑	Très puissant

NP ^a	Test effectué	Effet ^b	Commentaire
	Chimiotactisme	↑↑	
	Adhérence	↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	↑↑ IL-1β	Aucun effet ou légère hausse non significative : IL-1α, IL-8, RANTES et MIP-1β
Dendrimère G0	Chimiotactisme	↓	
	Adhérence	↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère hausse non significative : IL-1β et IL-8
Dendrimère G1	Chimiotactisme	↑	
	Adhérence	↑↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère hausse non significative : IL-1β et IL-8
Dendrimère G2	Chimiotactisme	↓	
	Adhérence	↑↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère hausse non significative : IL-1β et IL-8
Dendrimère G3	Chimiotactisme	↓	
	Adhérence	↑↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère hausse non significative : IL-1β et IL-8
Fe ₃ O ₄	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↑↑	
	Adhérence	↑↑	
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère baisse non significative : IL-1α, IL-1β, IL-8, RANTES et MIP-1β
Palladium	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↑↑↑	Très chimioattractant pour les ÉO
	Adhérence	↑	

NP ^a	Test effectué	Effet ^b	Commentaire
	Apoptose	↑	
	Cytokines	Aucun	Aucun effet ou légère baisse non significative : IL-1 α , IL-1 β , IL-8, RANTES et MIP-1 β
Platine	ROS	Aucun	
	Chimiotactisme	Aucun	
	Adhérence	↑	
	Apoptose	↑↑	
	Cytokines	↑↑ IL-8 (exceptionnellement non significatif)	Aucun effet ou légère baisse non significative : IL-1 α , IL-1 β , RANTES et MIP-1 β
TiO ₂	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↑	
	Adhérence	↑↑↑↑	Les NP de TiO₂ sont celles qui induisent le plus l'adhérence des ÉO.
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	
ZnO	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↓	
	Adhérence	↑	
	Apoptose	↓↓	
	Cytokines	↑↑ IL-1 β et IL-8	Augmentation non significative de IL-1 α et MIP-1 β

^a Les NP ont toutes été testées à une concentration de 50 µg/mL.

^b ↑, augmentation; ↓, diminution. Le nombre de flèches indique l'intensité de la réponse étudiée et deux flèches ou plus correspond à un résultat significatif ($p < 0, 05$). RANTES, Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

^c Les résultats des cytokines ont tous été obtenus par la technique ELISA.

^d Dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* [ROS])

Vert : Les effets les plus marquants sur la biologie des ÉO.

Les sous-sections subséquentes présentent des exemples de résultats obtenus avec les différentes NP pour chacune des fonctions des ÉO étudiées soient : la production de ROS, le chimiotactisme, l'adhérence, l'apoptose et la production d'analytes. Ce sont des exemples représentatifs ayant été utilisés pour élaborer le **tableau 3**.

4.4 Production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

La **figure 4** illustre le fait que peu de NP possèdent la capacité d'augmenter la production de ROS par les ÉO. Cependant, les NP de CeO₂ s'avèrent être de puissants inducteurs de cette fonction; d'ailleurs, parmi toutes les NP testées, celles de CeO₂ sont les plus puissantes pour provoquer la formation de ROS (**tableau 3**). Le mécanisme impliqué demeure toutefois encore inconnu.

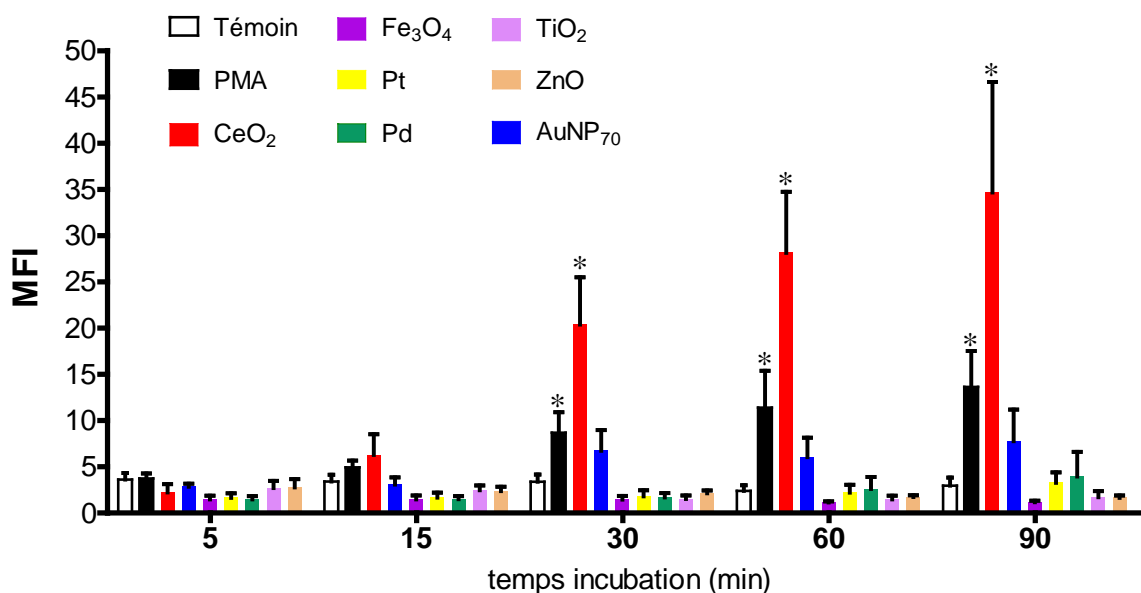


Figure 4. Effets de certaines nanoparticules sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Les éosinophiles humains ont été incubés en présence de 50 µg/mL des NP indiquées pour une période allant de 5 à 90 minutes. La production de ROS a été déterminée grâce à l'intensité de la fluorescence émise par la sonde CM-H₂DCFDA. Les NP de CeO₂ sont clairement celles qui induisent le plus la formation de ROS (barres rouges) par les ÉO. Les résultats sont exprimés par la moyenne de l'intensité de la fluorescence (mean fluorescence intensity [MFI]) ± SEM (n≥4).

La capacité des NP à augmenter spécifiquement la production de superoxyde (O₂⁻) a également été étudiée en parallèle. Les résultats montrent qu'aucune NP ne possède cette capacité et même que certaines (AgNP₂₀ et Pd) diminuent les niveaux de bases observés chez les cellules témoins non traitées (**figure 5**). Étant donné qu'aucune des NP étudiées dans cette étude ne module la production d'O₂⁻, les résultats ne sont pas inclus dans la production de ROS présentée au **tableau 3**. Ces expériences ont toutefois leur importance. En effet, elles permettent de conclure que la production totale de ROS observée en réponse aux CeO₂ n'est pas reliée à une production spécifique d'O₂⁻.

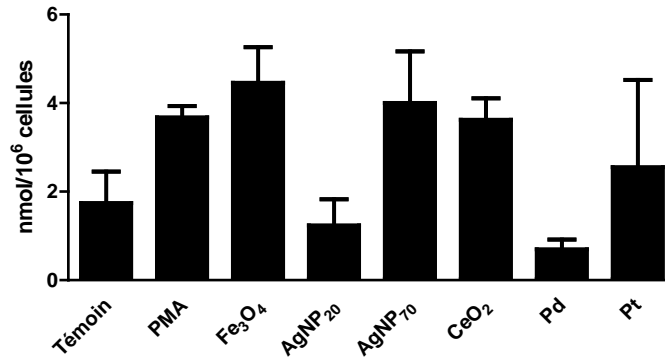


Figure 5. Production de superoxyde (O₂⁻) en réponse à certaines nanoparticules.

Les ÉO (5×10^5 cellules/mL) ont été incubés en présence des NP indiquées (50 µg/mL) ou du PMA (0,05 µM) pendant 24 h à 37 °C. La production de O₂⁻ basée sur la réduction du cytochrome c a été mesurée telle que décrite dans la méthodologie (sous-section 3.6.1).

4.5 Effets des NP sur le chimiotactisme des ÉO

Contrairement à la production de ROS, plusieurs NP ont la capacité d’augmenter l’adhérence des ÉO (figure 6). Il est intéressant de constater que ce ne sont pas les NP de CeO₂ qui provoquent les plus grands effets, mais plutôt celles de Pd. Cela indique qu’il n’y a probablement aucun lien entre la capacité d’induire une production de ROS et celle d’augmenter l’adhérence.

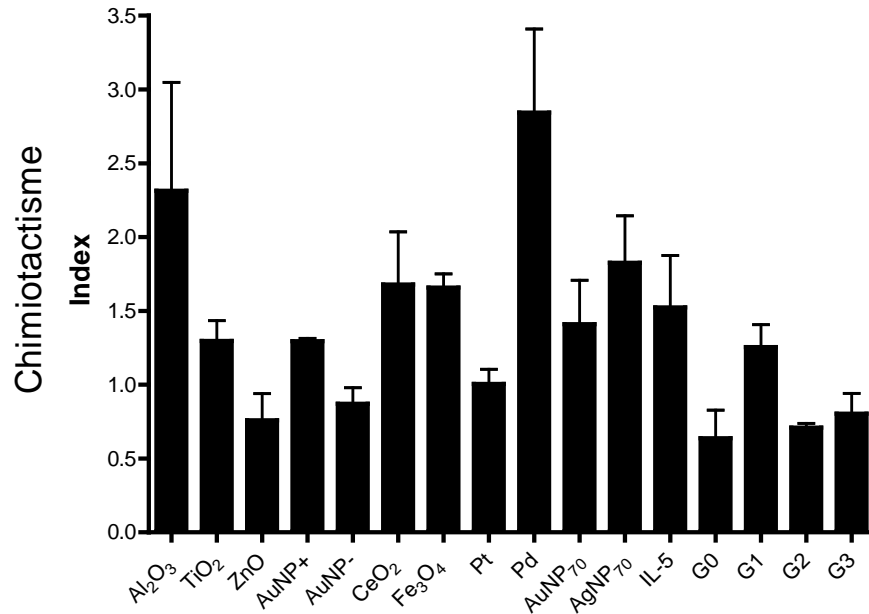


Figure 6. Effets de certaines nanoparticules sur le chimiotactisme

La capacité des ÉO à exercer le chimiotactisme a été déterminée à l’aide d’une chambre de Boyden comme décrite auparavant. Les NP indiquées ont été déposées dans la chambre du bas alors que les ÉO l’ont été dans celle du haut, les deux étant séparées par une fine membrane poreuse pour une période de 30 minutes. À la suite d’une coloration de la membrane, le nombre de cellules adhérentes au verso a été calculé. Les résultats sont indiqués en index par rapport au groupe témoin (aucune NP dans la chambre du bas) et représentent les moyennes ± SEM (n≥3).

4.6 Capacité des NP à induire l'adhérence des ÉO

Les résultats obtenus lors des expériences visant à déterminer la capacité des NP à induire l'adhérence des ÉO sur un substrat cellulaire révèlent que plusieurs NP augmentent cette fonction. En effet, la **figure 7** illustre bien que la plupart des NP étudiées augmentent le nombre d'ÉO adhérents aux cellules EA.hy926. Seules les AuNP⁻ diminuent légèrement la capacité des ÉO à adhérer. Les NP de TiO₂ sont celles qui augmentent le plus l'adhérence des ÉO sur le substrat cellulaire. Il est à noter que les NP de CeO₂ ne font qu'augmenter minimalement cette fonction des ÉO, suggérant que les ROS, dont la production est grandement stimulée par les NP de CeO₂, ne jouent pas nécessairement un rôle dans la capacité des NP à augmenter l'adhérence.

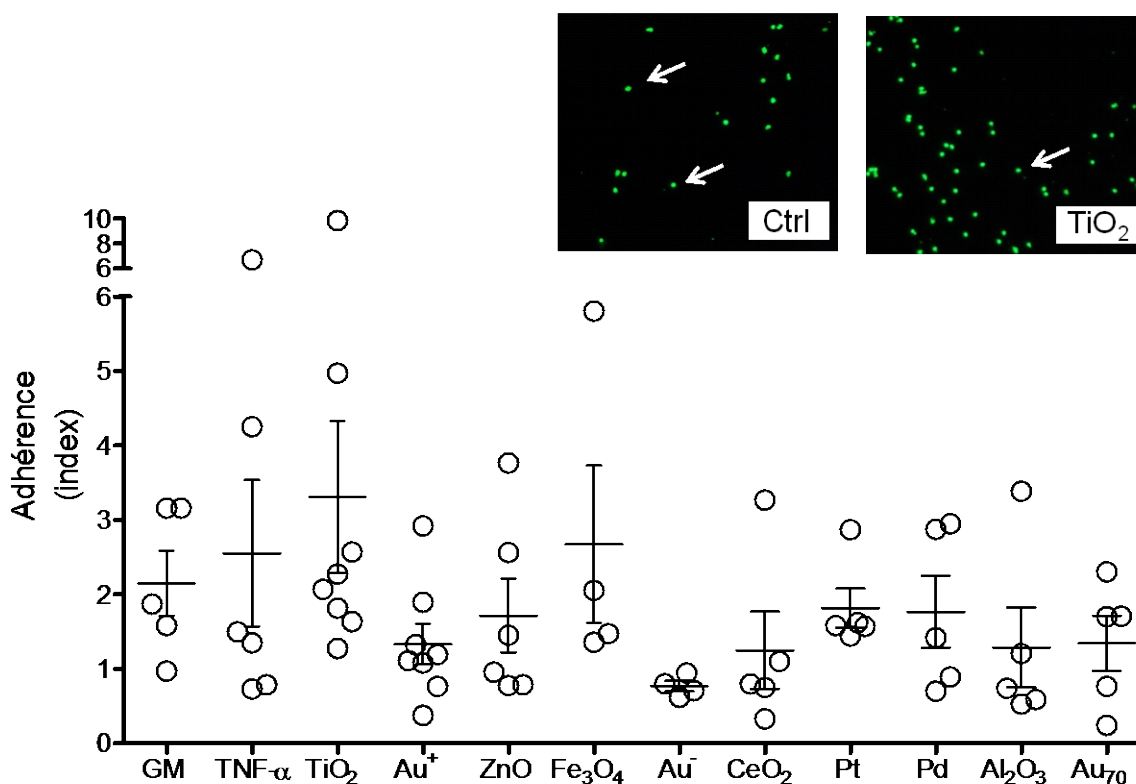


Figure 7. Capacité de certaines nanoparticules à augmenter l'adhérence des éosinophiles sur les cellules EA.hy926

Les ÉO ont été fraîchement isolés, incubés en présence de milieu de culture (témoin négatif), des cytokines GM-CSF ou TNF-α (témoins positifs) ou des NP indiquées pour une période de 30 minutes. Par la suite, les cellules ont été marquées avec la calcéine-AM pour 30 minutes et la capacité des ÉO à adhérer aux cellules EA.hy926 a été déterminée après une incubation de 15 minutes. Les résultats sont exprimés en index (groupe testé/groupe témoin) et représentent les moyennes ± SEM ($n \geq 4$). Les images illustrent le type de résultats observables sous le microscope à fluorescence où chacun des points verts représente une cellule ÉO adhérente aux cellules EA.hy926 (non visibles en fluorescence).

4.7 Modulation de l'apoptose par les NP

Comme discuté auparavant, l'apoptose peut être évaluée par différentes techniques en laboratoire. La première technique utilisée dans le passé dans ce laboratoire pour évaluer les effets d'un nouvel agent sur l'apoptose est basée sur des observations morphologiques en microscopie optique. Cela est particulièrement important lorsqu'il s'agit de tester des NP pouvant interférer avec certaines techniques, ce qui n'est pas le cas lorsque des observations cytologiques sont utilisées. La **figure 8** illustre que ce ne sont pas la majorité des NP testées qui peuvent altérer les niveaux de base de l'apoptose spontanée des ÉO humains. De plus, deux images contenues dans cette figure montrent la morphologie de cellules apoptotiques (A) et normales (B), facilement distinguable l'une de l'autre. Une autre technique couramment utilisée pour étudier l'apoptose est basée sur l'utilisation de sondes/marqueurs émettant un signal de fluorescence pouvant être déterminé à l'aide d'un cytomètre en flux. Les résultats présentés dans la **figure 9** démontrent une bonne corrélation entre ces deux techniques en ce qui concerne les effets antiapoptotiques des NP de ZnO, lorsque testées à plusieurs concentrations.

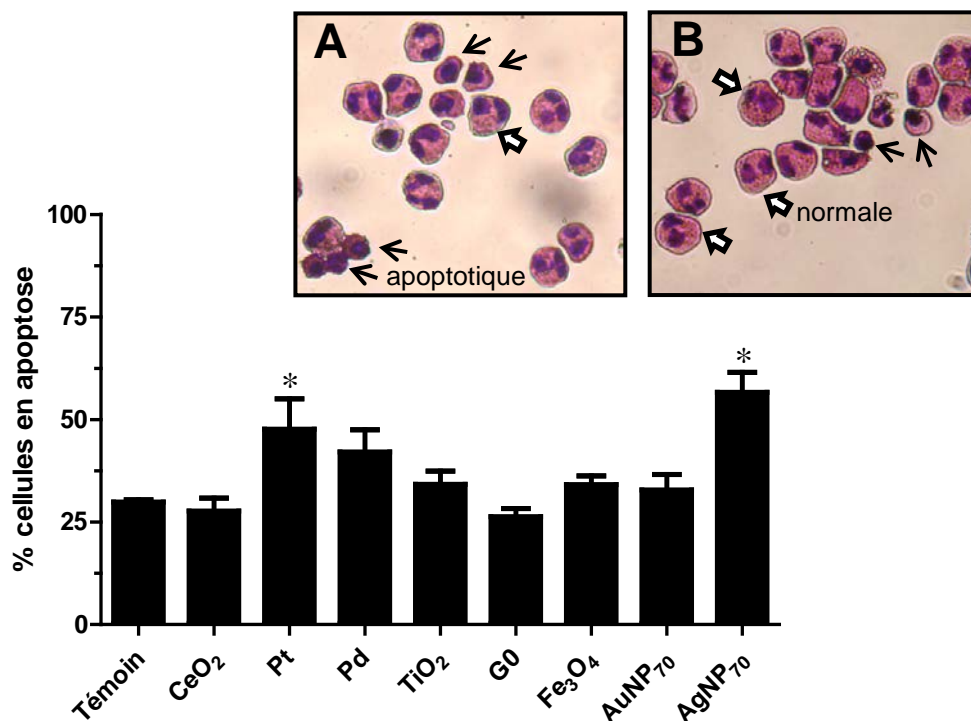


Figure 8. Modulation de l'apoptose des éosinophiles humains par les nanoparticules.

Les ÉO ont été incubés en présence de milieu de culture (témoin) ou des NP indiquées pour une période de 24 h. Par la suite, les cellules ont été récupérées, cytocentrifugées sur des lames puis colorées. Le nombre d'ÉO en apoptose a été calculé. Les résultats sont exprimés en % de cellules en apoptose et représentent les moyennes ± SEM (n≥3). Les images en A (ÉO + Pt) et B (Témoins ÉO sans NP) illustrent des résultats typiques obtenus indiquant des cellules en apoptose (flèches noires) et normales non apoptotiques (flèches blanches).

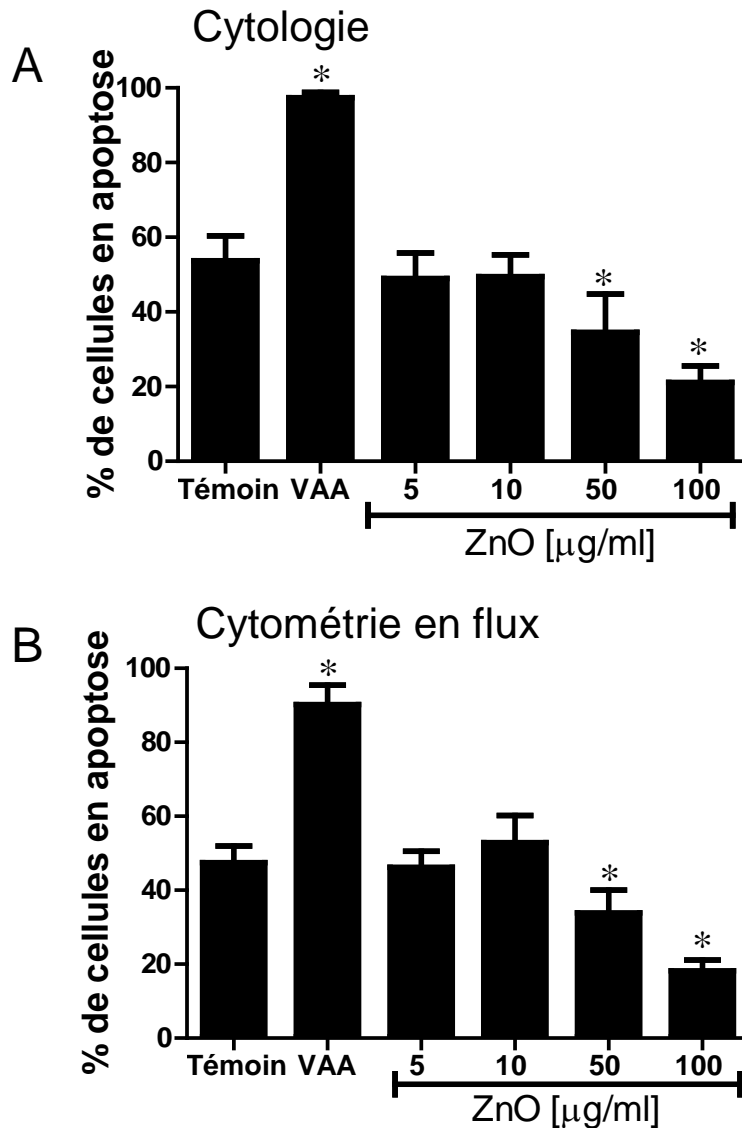


Figure 9. Détermination de l'effet antiapoptotique des nanoparticules de ZnO par cytologie (A) et par cytométrie en flux (B).

Les ÉO ont été incubés en présence de milieu de culture (témoin), de l'agent proapoptotique VAA-I ou des concentrations indiquées de NP de ZnO pour une période de 24 h. Par la suite, les cellules ont été récupérées et le taux d'apoptose a été évalué par cytologie (A) et par cytométrie en flux en calculant le nombre de cellules positives à FITC-annexine-v (B). Les résultats sont présentés par les moyennes \pm SEM ($n=5$ pour A et $n=4$ pour B).

4.8 Production d'analytes par les ÉO en réponse aux NP

Dans la présente étude, la technique utilisée permettait de déterminer si une NP donnée pouvait augmenter simultanément la production de plusieurs analytes pour fins de criblage. Il s'agit d'une technique semi-quantitative. Les résultats présentés dans la **figure 10** sont un exemple de l'utilisation de cette technique où il est aisé de constater que les NP agissent de façon différente

en augmentant la production de différents analytes, témoignant ainsi de la complexité de leur mode d'action. Après criblage servant à identifier plusieurs analytes dont la production est augmentée par une NP donnée, la technique ELISA a été utilisée pour permettre de quantifier la concentration d'un analyte spécifique. La **figure 11** illustre les résultats obtenus à l'aide de trousse commerciales permettant de mesurer spécifiquement les concentrations d'IL-8, RANTES et IL-1 β dans les surnageants. Collectivement, ces résultats indiquent que le potentiel pro-inflammatoire de certaines NP peut s'expliquer, du moins partiellement, par la production de médiateurs de l'inflammation dont plusieurs sont des chimiokines connues pour attirer des cellules aux sites inflammatoires.

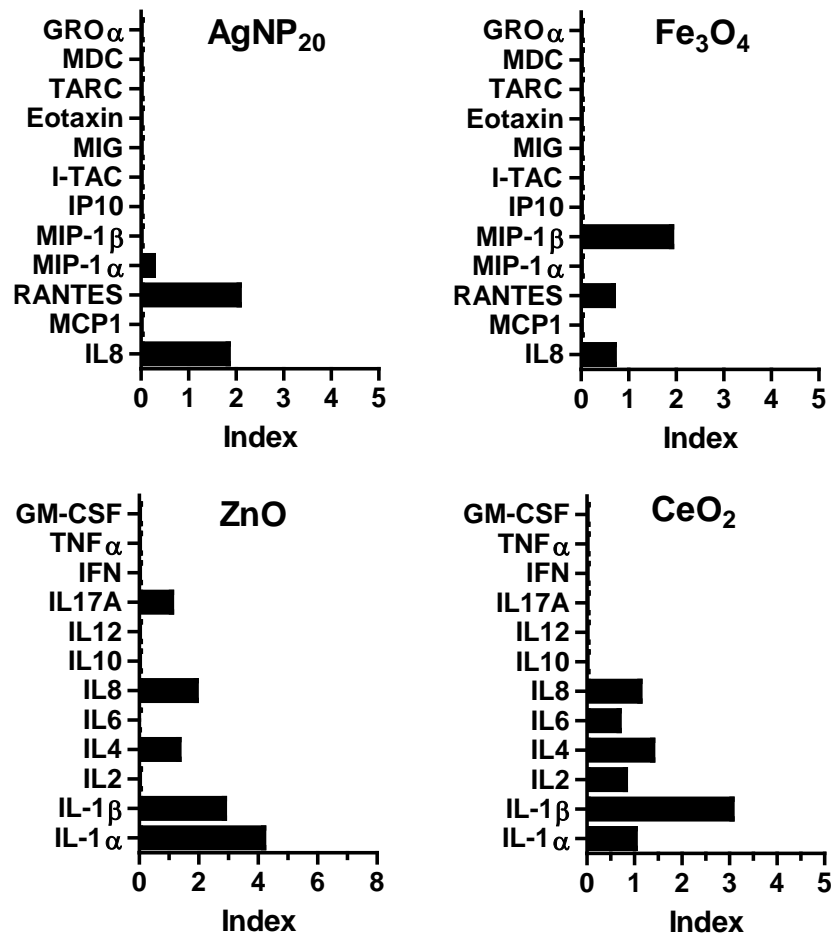


Figure 10. Criblage de la production de cytokines par les éosinophiles en réponse aux NP.

Les ÉO (5×10^5 cellules/mL) ont été incubés pendant 24 h en présence ou en absence des nanoparticules ($50 \mu\text{g/mL}$) indiquées et les surnageants d'au moins trois donneurs différents ont été récoltés puis mélangés, pour ensuite être utilisés afin de détecter simultanément la présence de diverses cytokines inflammatoires (AgNP₂₀ et Fe₃O₄) ou communes (ZnO et CeO₂) à l'aide du kit Multi-Analyte ELISArray de QIAGEN. Les résultats sont exprimés en index (groupe traité/groupe témoin).

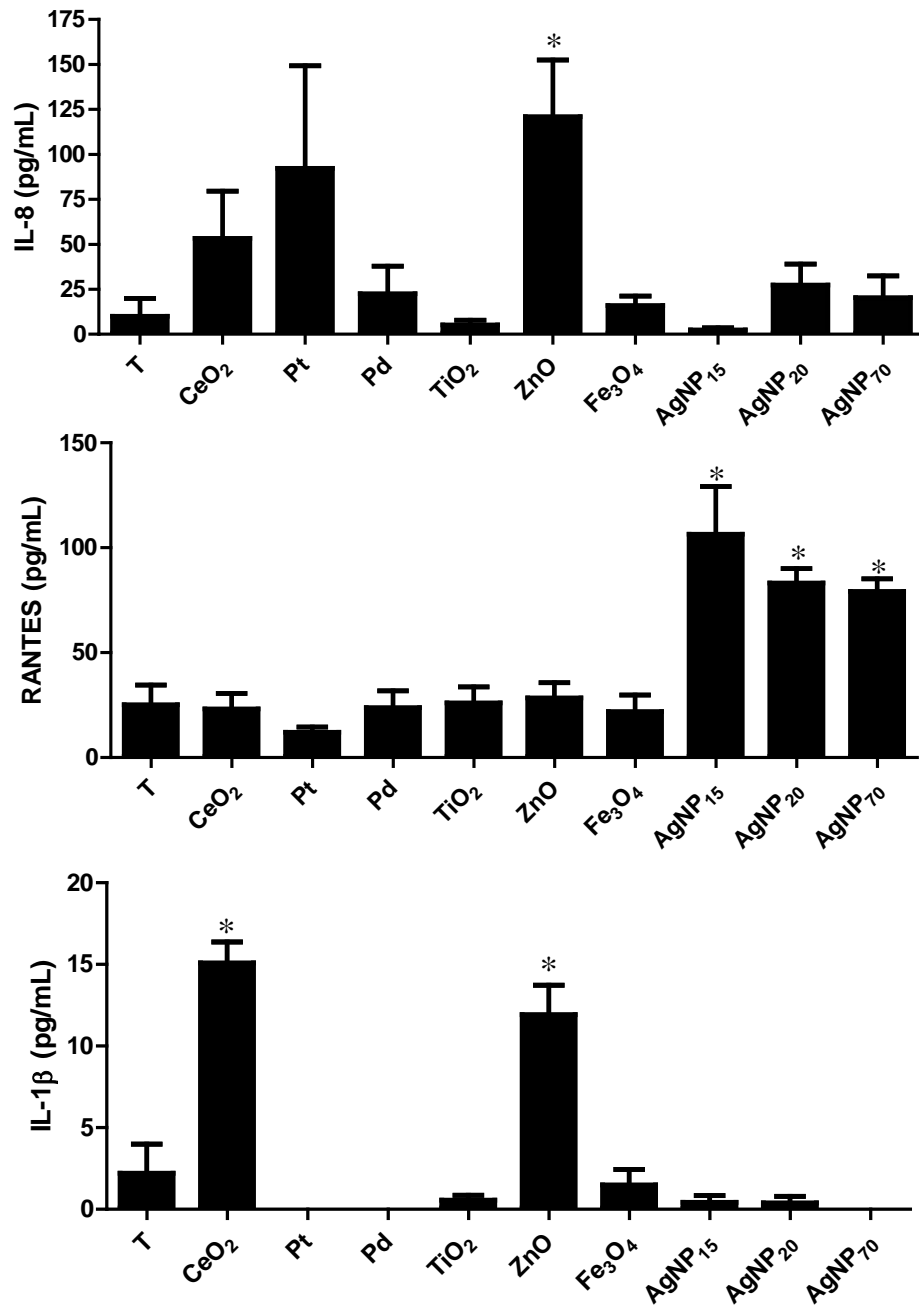


Figure 11. Quantification de la production des cytokines IL-8, RANTES et IL-1 β par les ÉO humains en réponse à certaines NP.

Les ÉO ont été incubés pendant 24 h en présence de milieu de culture (groupe témoin ou T), ou des NP indiquées (50 pg/mL) et les surnageants de donneurs différents ont été récoltés, puis utilisés séparément pour quantifier la production des cytokines IL-8, RANTES et IL-1 β par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/mL selon une courbe standard établie avec la trousse ELISA et représentent des moyennes \pm SEM ($n=3$).

5. DISCUSSION

L'objet de cette étude portait sur les interactions directes entre différentes NP et les ÉO humains afin de mieux comprendre comment elles affectent la biologie des ÉO et ainsi contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche très peu documenté. En effet, avant d'initier ce projet, aucune donnée scientifique n'était disponible. Pourtant, la littérature comprend plusieurs études démontrant que le nombre d'ÉO augmente dans les poumons et dans les lavages broncho-alvéolaires chez les rongeurs soumis à des expositions aux NP *in vivo*. Notons que dans ces études, les NP sont administrées par inhalation, instillation nasale ou intratrachéale, la voie respiratoire étant l'une des plus probables voies pour une exposition aux NP chez les travailleurs^{21,30,57-59}. En fait, le nombre d'ÉO est grandement utilisé comme marqueur d'inflammation; plus le nombre est élevé, plus l'effet inflammatoire est prononcé.

Comme le montre le **tableau 3**, qui illustre la synthèse des résultats, les NP agissent différemment sur la physiologie cellulaire des ÉO humains, et ce, pour chacune des fonctions testées dans cette étude. Par exemple, certaines NP comme celles de CeO₂ induisent fortement une production de ROS alors que d'autres l'augmentent peu (AgNP₇₀) ou pas (ZnO). Les NP Al₂O₃ augmentent de beaucoup la capacité des ÉO à effectuer le chimiotactisme alors que celles de TiO₂ n'ont pas ou très peu d'effets. Par contre les NP de TiO₂ sont celles qui possèdent la plus grande capacité à induire l'adhérence des ÉO sur un substrat cellulaire. Pour ce qui est de la capacité à moduler le niveau d'apoptose spontanée des ÉO, les NP de Pt l'accélèrent alors que celles de ZnO l'inhibent fortement. Finalement, en ce qui concerne la production de cytokines, toutes les AgNP_{xx} induisent fortement la production de la chimiokine CCL5 (RANTES) alors que la plupart des autres NP qui augmentent la production de cytokines ciblent plutôt l'IL-1 β et/ou l'IL-8 (CeO₂ et ZnO). Rappelons ici, qu'un premier criblage pour identifier les analytes a été fait par ELISArray nous permettant de distinguer les cytokines et chimiokines les plus susceptibles à être modulées en réponse aux NP. Par la suite, la production des cytokines IL- β , IL-8, RANTES et MIP-1 β a été systématiquement quantifiée puisqu'elles jouent toutes un rôle important en matière d'inflammation.

Les exemples de données obtenus des analyses par DLS présentant les diamètres, l'index de polydispersion et les valeurs du potentiel ζ (**tableau 2**) ne permettent pas de faire de corrélation entre l'un ou l'autre de ces paramètres et un effet donné d'une NP. Les expériences effectuées à l'aide de la cytométrie en flux (**figure 2**) et de la MET (**figure 3**) ne permettent pas de conclure que les NP pénètrent ou non à l'intérieur des ÉO. Toutefois, ce constat ne doit pas être interprété comme si les NP doivent être à l'intérieur d'une cellule pour induire ou moduler une action biologique quelconque, incluant une cytotoxicité. Par contre, il est vrai qu'en médecine, il devient important de déterminer si les NP utilisées comme vecteur pénètrent ou non certains types cellulaires ciblés lorsqu'ils y acheminent des médicaments. Par exemple certaines cellules cancéreuses pourraient être la cible d'une drogue transmise par l'intermédiaire d'un nanovecteur afin qu'elles soient tuées.

Présentement, les techniques se raffinent de plus en plus pour déterminer si une NP pénètre à l'intérieur d'une cellule. Par exemple, des systèmes d'imagerie en 3D (3D Enhanced Darkfield Imaging System, CytoViva Inc.) seront certes d'une utilité dans ce domaine. Dans la présente étude sur la toxicité potentielle des NP, cette information ne revêtait pas un caractère important.

En ce sens, les tests de viabilité cellulaire effectués démontrent très bien qu'aucune des NP étudiées dans les conditions expérimentales utilisées ne présentait une capacité à induire de façon significative la nécrose cellulaire. Il est bien de rappeler ici que les cellules apoptotiques sont considérées viables lorsque la viabilité cellulaire est évaluée par la technique d'exclusion au bleu de trypan.

Un des objectifs secondaires de ce projet était de déterminer si le diamètre d'une même NP pouvait avoir des effets différents. En effet, il est connu que les propriétés physicochimiques des NP, incluant le diamètre initial, puissent modifier largement les effets biologiques observés après une exposition aux NP, qu'elle soit *in vitro* ou *in vivo*⁶⁰⁻⁶³. En général, les NP ayant un plus petit diamètre sont présentées dans la littérature comme étant plus toxiques⁶¹, principalement en référence avec des études dans lesquelles les NP sont administrées par la voie pulmonaire; les NP ayant un plus petit diamètre pouvant pénétrer plus profondément l'arbre respiratoire^{64,65}. Toutefois, à l'inverse, d'autres études indiquent que certaines NP ayant un petit diamètre auraient moins l'occasion d'atteindre le poumon profond^{66,67}. Plusieurs travaux doivent donc être effectués afin d'augmenter les connaissances dans ce domaine.

Avant la présente étude, les effets différentiels liés au diamètre des NP sur la biologie des ÉO *in vitro* n'avaient jamais été examinés. Par exemple, pour les NP d'argent, si l'on compare des AgNP₂₀ avec des AgNP₇₀ provenant de la même compagnie (Ted Pella Inc.), il ressort que les AgNP₇₀ étaient de puissants accélérateurs d'apoptose alors que les AgNP₂₀ avaient plutôt tendance à retarder le phénomène. Pourtant, ces deux NP augmentaient la production de ROS et celle de la cytokine RANTES, à des niveaux légèrement différents. Il est intéressant de constater que dans des travaux antérieurs effectués chez les neutrophiles humains, il a été démontré que ces mêmes NP avaient des effets différentiels selon leur diamètre, mais les résultats n'étaient pas les mêmes que ceux observés dans le cas présent avec les ÉO. En effet, chez les neutrophiles, les AgNP₂₀ sont de très puissants accélérateurs de l'apoptose⁴¹ alors que les AgNP₇₀ retardent significativement ce processus biologique¹¹. C'est donc dire que, pour compliquer davantage le mode d'action des NP, le diamètre n'est qu'une variable parmi d'autres, et que les effets biologiques sont même différents d'un type cellulaire à l'autre. Pourtant, les ÉO et les neutrophiles sont des cellules très voisines; elles sont issues d'une cellule commune de la lignée myéloïde et toutes deux connues pour exercer des rôles dans l'inflammation. Quatre types de NP d'une même classe, les dendrimères PAMAM G0, G1, G2 et G3 ont aussi été étudiés. Ces NP ont toutes un diamètre < 5 nm. Ce diamètre minuscule a fait en sorte que les analyses par DLS n'ont pu être réalisées puisque le seuil limite de détection de l'appareil était ≥ 10 nm. Ces NP ont toutes les mêmes effets sur la biologie des ÉO. Elles n'ont aucune capacité à moduler les niveaux d'apoptose des ÉO ni leur production d'analytes. Toutefois, de légères différences ont été observées en ce qui concerne la capacité des dendrimères PAMAM à augmenter l'adhérence et à induire le chimiotactisme (**tableau 3**).

Une des limites de la présente étude est le fait qu'il est difficile, voire impossible, de reproduire l'inflammation *in vitro* en y étudiant, par exemple, un seul type cellulaire. Bien que plusieurs modèles inflammatoires *in vivo* utilisés pour déterminer les effets pro-inflammatoires des NP ont été développés chez les rongeurs, il est connu que les ÉO de souris sont fonctionnellement différents des éosinophiles humains⁶⁸.

Une autre limite de l'étude est qu'il est présentement difficile d'extrapoler les résultats obtenus en traitant des cellules avec des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$. En effet, très peu de données sont disponibles concernant la détection de NP en milieu physiologique. Toutefois, une étude rapporte qu'une concentration de $10 \mu\text{g/mL}$ de AgNP correspondrait approximativement à une charge totale cellulaire, chez un travailleur ayant été exposé sur une période de 74 semaines (8 heures/jour, 5 jours/semaine)⁶⁹. Donc, bien que d'apparence élevée, une telle concentration pourrait être atteinte après plusieurs années d'exposition ou à la suite d'une exposition aiguë accidentelle. De plus, bien que la vaste majorité des études utilisent des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$ pour des expériences *in vitro*, il est difficile de comparer les effets de différentes NP, car pour une même concentration massique, le nombre final de NP/cellule peut varier passablement. Pour ces raisons et surtout pour en apprendre davantage sur les mécanismes d'action des NP, la poursuite d'études sur les interactions entre les NP et les ÉO humains *in vitro* apparaît souhaitable. En parallèle, des expériences plus complexes *in vivo* seraient aussi d'intérêt, non seulement pour connaître ce qu'il advient des NP après administration, mais également sur la possibilité d'interaction NP-ÉOs *in vivo*.

6. CONCLUSION

Cette étude a permis de combler, du moins partiellement, une lacune dans la littérature scientifique concernant les effets biologiques que peuvent avoir des NP sur la biologie des ÉO humains. En effet, les résultats présentés ici constituent un avancement des connaissances dans un domaine peu étudié. Ils indiquent que les ÉO réagissent différemment d'une NP à l'autre, témoignant de la grande complexité des études portant sur leurs modes d'action. De plus, en relation avec des travaux antérieurs^{6,7,10,12,42}, les résultats actuels montrent que les effets des NP peuvent même être à l'opposé d'un type cellulaire à un autre. En effet, alors que les AgNP₇₀ augmentent l'apoptose des neutrophiles¹¹, ces mêmes NP retardent plutôt l'apoptose des ÉOs (ce rapport). Sachant maintenant que certaines NP possèdent, à divers degrés, la capacité d'activer des ÉO isolés à partir d'individus sains, il serait intéressant d'étudier la biologie des ÉO isolés de travailleurs potentiellement exposés aux NP, en les activant avec des agonistes classiques comme les cytokines IL-5, GM-CSF, etc., afin de les comparer avec des ÉO d'individus non exposés.

De plus, ce projet démontre que des NP de même nature, mais de diamètre différent génèrent 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 produisent des effets divers. Le mode d'action des NP est extrêmement complexe et diversifié, et il 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 et pourraient favoriser une meilleure compréhension des risques pour la santé des travailleurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allegra A, Penna G, Alonci A, Rizzo V, Russo S, Musolino C. Nanoparticles in oncology: the new theragnostic molecules. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(7):669-686. Prepublished on 2011/07/27 as DOI.
2. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(2):151-165.
3. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2010;28(11):580-588. Prepublished on 2010/08/21 as DOI 10.1016/j.tibtech.2010.07.006.
4. Pirela SV, Martin J, Bello D, Demokritou P. Nanoparticle exposures from nano-enabled toner-based printing equipment and human health: state of science and future research needs. *Crit Rev Toxicol.* 2017:1-27. Prepublished on 2017/05/20 as DOI 10.1080/10408444.2017.1318354.
5. Endo C-A, Ostiguy C, Dossa NI, Emond C. Portrait de la nanotechnologie au Québec dans les milieux industriels et de la recherche universitaire et publique. *IRSST, R-854.* 2014:1-90.
6. 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.
7. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(3):1002-1008.
8. 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.
9. 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):1884-1892.
10. 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):926-931. Prepublished on 2014/04/25 as DOI 10.1016/j.tiv.2014.03.002.
11. Poirier M, Simard JC, Girard D. Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol.* 2015:1-11. Prepublished on 2015/12/01 as DOI 10.3109/1547691x.2015.1106622.
12. Lavastre V, Goncalves DM, Girard D. Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules. *IRSST.* 2015;Rapport 886:1-32.
13. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;236(3):310-318. Prepublished on 2009/03/10 as DOI 10.1016/j.taap.2009.02.020.

14. Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett.* 2010;10(1):59-63.
15. Chen D, Tang Q, Li X, et al. Biocompatibility of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4973-4982.
16. Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi Bidgoli S, Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:855-862.
17. Sethi S. New developments in the pathogenesis of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(2):113-119.
18. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect.* 2006;114(12):1818-1825.
19. Chen HW, Su SF, Chien CT, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J.* 2006;20(13):2393-2395.
20. Sevier CS, Cuzzo JW, Vala A, Aslund F, Kaiser CA. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(10):874-882. 10.1038/ncb1001-874.
21. Cho WS, Duffin R, Poland CA, et al. 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.* 2012;6(1):22-35.
22. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, et al. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J.* 2011;37(2):299-309.
23. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, 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.
24. Amini-Vaughan ZJ, Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Therapeutic strategies for harnessing human eosinophils in allergic inflammation, hypereosinophilic disorders, and cancer. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012;12(5):402-412.
25. Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* 2009;101:81-121.
26. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):57-83.
27. Watt AP, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):415-423.
28. Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29(1):7-14.
29. Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir Res.* 2013;14(34):1465-9921.

30. Lee S, Hwang SH, Jeong J, et al. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):30. Prepublished on 2016/06/11 as DOI 10.1186/s12989-016-0142-8.
31. Gustafsson A, Lindstedt E, Elfsmark LS, Bucht A. Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat. *J Immunotoxicol.* 2011;8(2):111-121. Prepublished on 2011/02/12 as DOI 10.3109/1547691x.2010.546382.
32. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology.* 2016;14:8. Prepublished on 2016/01/27 as DOI 10.1186/s12951-016-0159-z.
33. Lemiere C, Chaboillez S, Welman M, Maghni K. Outcome of occupational asthma after removal from exposure: A follow-up study. *Can Respir J.* 2010;17(2):61-66.
34. Phillips JI, Green FY, Davies JC, Murray J. Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles. *Am J Ind Med.* 2010;53(8):763-767. Prepublished on 2010/07/14 as DOI 10.1002/ajim.20855.
35. Theegarten D, Boukercha S, Philippou S, Anhenn O. Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report. *Diagn Pathol.* 2010;5:77. Prepublished on 2010/12/04 as DOI 10.1186/1746-1596-5-77.
36. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):3831-3852.
37. Lu S, Duffin R, Poland C, 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):241-247.
38. Cho WS, Duffin R, Poland CA, et al. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect.* 2010;118(12):1699-1706.
39. Liz R, Simard JC, Leonardi LB, Girard D. Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):616-625. Prepublished on 2015/08/05 as DOI 10.1016/j.intimp.2015.06.030.
40. Noel C, Simard JC, Girard D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro.* 2016;31:12-22. Prepublished on 2015/11/10 as DOI 10.1016/j.tiv.2015.11.003.
41. 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):404-412.

42. Babin K, Goncalves DM, Girard D. Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(11):2276-2282. Prepublished on 2015/08/19 as DOI 10.1016/j.bbagen.2015.08.006.
43. Abrikossova N, Skoglund C, Ahren M, Bengtsson T, Uvdal K. Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology*. 2012;23(27):0957-4484.
44. Couto D, Freitas M, Vilas-Boas V, et al. Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicol Lett*. 2014;225(1):57-65. Prepublished on 2013/12/03 as DOI 10.1016/j.toxlet.2013.11.020.
45. Moeller S, Kegler R, Sternberg K, Mundkowski RG. Influence of sirolimus-loaded nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. *Nanomedicine*. 2012;8(8):1293-1300.
46. Durocher I, Girard D. In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm Res*. 2016;65(9):745-755. Prepublished on 2016/06/25 as DOI 10.1007/s00011-016-0959-5.
47. Simard JC, Durocher I, Girard D. Silver nanoparticles induce irremediable endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response dependent apoptosis in breast cancer cells. *Apoptosis*. 2016;21(11):1279-1290. Prepublished on 2016/09/03 as DOI 10.1007/s10495-016-1285-7.
48. Simard JC, Vallieres F, de Liz R, Lavastre V, Girard D. Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2015;290(9):5926-5939. Prepublished on 2015/01/17 as DOI 10.1074/jbc.M114.610899.
49. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Nanoparticle toxicology: measurements of pulmonary hazard effects following exposures to nanoparticles. *Methods Mol Biol*. 2011;726:313-324.
50. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. Viscum album agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol*. 2005;130(4):527-535.
51. Holder AL, Goth-Goldstein R, Lucas D, Koshland CP. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(9):1885-1892.
52. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol*. 2012;86(7):1123-1136.
53. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol*. 2007;41(8):3018-3024.

54. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol.* 2011;186(6):3622-3631. Prepublished on 2011/02/18 as DOI 10.4049/jimmunol.1002956.
55. Pelletier M, Girard D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(2):315-325.
56. Ghasemali S, Nejati-Koshki K, Tafsiri E, et al. Inhibitory effects of beta-cyclodextrin-helenalin complexes on H-TERT gene expression in the T47D breast cancer cell line - results of real time quantitative PCR. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6949-6953. Prepublished on 2014/01/01 as DOI.
57. Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10(1):26.
58. Huang KL, Lee YH, Chen HI, Liao HS, Chiang BL, Cheng TJ. Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *J Hazard Mater.* 2015;297:304-312. Prepublished on 2015/05/27 as DOI 10.1016/j.jhazmat.2015.05.023.
59. 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):114-117.
60. Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, et al. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7(1):37. Prepublished on 2010/12/04 as DOI 10.1186/1743-8977-7-37.
61. Kim IY, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine.* 2015;11(6):1407-1416. Prepublished on 2015/03/31 as DOI 10.1016/j.nano.2015.03.004.
62. Braakhuis HM, Gosens I, Krystek P, et al. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:49. Prepublished on 2014/09/18 as DOI 10.1186/s12989-014-0049-1.
63. Zhao W, Lu X, Yuan Y, et al. Effect of size and processing method on the cytotoxicity of realgar nanoparticles in cancer cell lines. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1569-1577. Prepublished on 2011/08/17 as DOI 10.2147/ijn.s21373.
64. Anderson DS, Silva RM, Lee D, et al. Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: Influence of dose, size, and chemical composition. *Nanotoxicology.* 2014:1-12. Prepublished on 2014/09/19 as DOI 10.3109/17435390.2014.958116.
65. Mohamud R, Xiang SD, Selomulya C, et al. The effects of engineered nanoparticles on pulmonary immune homeostasis. *Drug Metab Rev.* 2014;46(2):176-190. Prepublished on 2013/11/26 as DOI 10.3109/03602532.2013.859688.
66. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO, 3rd. Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there? *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):1-10. Prepublished on 2011/01/15 as DOI 10.1016/j.ijpharm.2010.12.040.

67. Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:2. Prepublished on 2010/03/09 as DOI 10.1186/1743-8977-7-2.
68. Lee JJ, Lee NA. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin Exp Allergy.* 2005;35(8):986-994.
69. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:11. Prepublished on 2014/02/18 as DOI 10.1186/1743-8977-11-11.