

Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP)

**Existe-t-il différentes propriétés inflammatoires
des NP liées au sexe?**

Marion Vanharen
Abdelaziz Saafane
Alexanne Léveillé
Thomas Mahbeer
Denis Girard

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-1173-fr

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

Dans l'esprit de la Loi sur la santé et la sécurité du travail (LSST) et de la Loi sur les accidents du travail et les maladies professionnelles (LATMP), la mission de l'IRSST est de :

Contribuer à la santé et à la sécurité des travailleuses et travailleurs par la recherche, l'expertise de ses laboratoires, ainsi que la diffusion et le transfert des connaissances, et ce, dans une perspective de prévention et de retour durables au 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, 2022
ISBN 978-2-89797-251-6 (PDF)

© Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, 2022

IRSST - Direction des communications, de la veille et de la mobilisation des connaissances
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca

Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP)

Existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe?

Marion Vanharen¹, Abdelaziz Saafane¹, Alexanne Léveillé¹, Thomas Mahbeer¹, Denis Girard¹

¹ Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

RAPPORTS
SCIENTIFIQUES

R-1173-fr



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

Ce travail aurait été impossible à réaliser sans la contribution des nombreux volontaires qui ont fait don de leur sang. Merci à vous tous.

Nous tenons également à remercier le personnel du bureau de santé de l'Institut national de la recherche scientifique (INRS), le Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, impliqué dans cette étude ainsi que mesdames Isabelle Durocher et Pierrette Kwémo, étudiantes inscrites respectivement au programme de doctorat en biologie et à la maîtrise en science expérimentale de la santé de l'INRS pour leur implication à la réalisation de cette étude.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------------|
| SOMMAIRE | IV |
| ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS..... | VII |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. ÉTAT DES CONNAISSANCES | 3 |
| 2. OBJECTIFS DE RECHERCHE | 6 |
| 3. MÉTHODOLOGIE | 7 |
| 3.1 Choix des NP et caractérisation..... | 7 |
| 3.2 Sélection des donneurs, hommes ou femmes..... | 8 |
| 3.3 Isolement et traitement des cellules | 8 |
| 3.4 Production de dérivés réactifs de l'oxygène | 9 |
| 3.5 Phagocytose..... | 9 |
| 3.6 Migration/chimiotactisme | 9 |
| 3.7 Adhérence sur un substrat cellulaire | 10 |
| 3.8 Apoptose | 10 |
| 3.9 Production de cytokines..... | 10 |
| 3.10 Analyse statistique..... | 10 |
| 4. RÉSULTATS | 11 |
| 4.1 Caractérisation des NP et viabilité cellulaire | 11 |
| 4.2 Altération des fonctions des NT et des EO en réponse aux NP | 16 |
| 5. DISCUSSION | 31 |
| CONCLUSION..... | 38 |
| BIBLIOGRAPHIE | 40 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------|--|----|
| Tableau 1. | Nanoparticules étudiées dans ce projet | 7 |
| Tableau 2. | Caractéristique des nanoparticules obtenues par analyses DLS | 12 |
| Tableau 3. | Effets différentiels des NP sur la biologie des neutrophiles (NT) et des éosinophiles (EO) mâles (♂) et femelles (♀) | 16 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 1. | Résultats représentatifs d'une analyse effectuée par DLS en ce qui concerne la distribution de la taille des nanoparticules de CeO ₂ | 14 |
| Figure 2. | Images représentatives illustrant des cellules obtenues après l'isolement des granulocytes à partir du sang d'un donneur..... | 15 |
| Figure 3. | Effet de certaines NP sur le taux d'apoptose des neutrophiles en tenant compte ou non du sexe..... | 22 |
| Figure 4. | Certaines NP n'altèrent pas la phagocytose basale des NT mais altèrent celle des EO. | 23 |
| Figure 5. | Les NP G0 augmentent significativement la phagocytose uniquement chez les EO femelles..... | 24 |
| Figure 6. | Incapacité des nanoparticules à induire la production de ROS par les neutrophiles. | 25 |
| Figure 7. | La production de l'interleukine-8 par les neutrophiles traités avec les nanoparticules de CeO ₂ , Pd, Pt, TiO ₂ et ZnO..... | 26 |
| Figure 8. | La production de l'interleukine-1 β par les éosinophiles traités avec les nanoparticules (NP) d'or. | 27 |
| Figure 9. | Capacité des nanoparticules à augmenter l'adhérence des neutrophiles sur des cellules endothéliales. | 28 |
| Figure 10. | Capacité des nanoparticules (NP) à augmenter la migration des neutrophiles (NT) : les NP de Pt et Pd affectent davantage les NT mâles que femelles. | 29 |

SOMMAIRE

Les nanotechnologies offrent un important potentiel d'exploitation dans des secteurs industriels variés, pour lequel les bénéfices financiers ne sont pas négligeables. À l'instar des provinces canadiennes et de nombreux pays industrialisés, le Québec voit un nombre grandissant de compagnies produisant des nanomatériaux et des nanoparticules (NP) se développer, sans oublier celles qui introduisent de plus en plus de NP dans leurs produits. Le nombre de travailleurs québécois œuvrant dans la fabrication et dans la synthèse des NP augmentera dans les années à venir. De plus, le nombre de travailleurs appelés à manipuler et à transformer des NP dans les domaines des nanotechnologies en général ne fera que s'accroître. Ainsi, il est à prévoir que cet engouement pour les nanotechnologies provoquera une augmentation du nombre de travailleurs potentiellement exposés aux NP, une exposition à laquelle le grand public n'échappera pas, sachant que déjà des milliers de produits à usage courant contiennent des NP. Les conclusions d'une littérature dynamique, riche et en expansion indiquent clairement qu'une exposition aux NP représente certains risques pour la santé. Bien que ces travaux de recherche recensent plusieurs dangers d'une exposition aux NP (effets cytotoxiques ou génotoxiques, stress oxydatif, cancers, etc.), l'inflammation demeure parmi les effets néfastes les plus souvent répertoriés.

L'inflammation est une réponse biologique tout à fait normale qui survient, par exemple, lors d'une infection et qui est connue pour se résorber par elle-même lorsque la personne est en bonne santé. Toutefois, une mauvaise régulation de l'inflammation peut mener à plusieurs sortes de maladies et désordres du système immunitaire comme l'asthme, certaines allergies et l'arthrite pour ne nommer qu'elles. En fait, pratiquement toutes les maladies humaines possèdent une composante inflammatoire à une certaine étape durant leur développement. La réponse inflammatoire est une réponse complexe, faisant intervenir plusieurs médiateurs et cellules comme les leucocytes ou globules blancs. Parmi ces derniers, les neutrophiles (NT) et les éosinophiles (EO) sont connus pour exercer un rôle majeur lors de l'inflammation. Par leur petitesse, il y a de fortes chances que des NP présentes dans un environnement puissent être inhalées pouvant ainsi engendrer des maladies inflammatoires des poumons chez des travailleurs ou encore exacerber des maladies déjà existantes. En effet, plusieurs études menées chez l'animal exposé à des NP *in vivo* démontrent la présence accrue de NT ou EO dans les lavages bronchoalvéolaires et les poumons. En plus de la voie par inhalation, la présence de certaines NP dans une gamme grandissante de produits à usage courant, les personnes peuvent être exposées par diverses autres voies comme par contact cutané et même par ingestion. Ainsi, il devient inévitable que les NP puissent se frayer un chemin par la circulation sanguine ou à travers les divers tissus et interagir directement avec les NT ou EO.

Des travaux récents indiquent clairement d'ailleurs que les NP ont la capacité d'altérer la biologie des NT et des EO. Contrairement aux quelques études menées chez l'animal, et bien que plusieurs NP possèdent des propriétés inflammatoires *in vitro*, aucune donnée portant sur différents effets inflammatoires des NP entre les sexes chez l'humain n'est disponible. Visant à combler cette lacune et à élargir le champ des connaissances dans ce domaine, la présente étude a été menée en utilisant des NT et des EO obtenus à partir d'échantillons sanguins de femmes et d'hommes consentants et en bonne santé. Les cellules ont été traitées *in vitro* avec différentes NP auxquels les travailleurs(euses) québécois(es) risquent d'être exposé(e)s afin d'évaluer les capacités modulatrices de plusieurs fonctions, toutes reliées au processus inflammatoire. Parmi ces fonctions, la capacité des NP à affecter l'apoptose, la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), la phagocytose, la production de certaines cytokines, l'adhérence et la migration par les NT et EO a été déterminée. En utilisant une telle approche expérimentale, il a été possible de dresser un tableau montrant les effets différentiels des NP sur la biologie des NT et EO selon le sexe. L'ensemble des données et des observations relevées ici permettent de démontrer certaines différences entre les sexes. Toutefois, aucune différence majeure allant à l'opposée entre les sexes, c.-à-d. qu'une NP ne va pas activer une réponse chez les NT et/ou EO mâles et l'inhiber ou la renverser chez les NT et/ou EO femelles. En général, lorsqu'une NP augmente ou diminue une fonction ou une réponse donnée, une analyse des résultats en tenant compte du sexe des donneurs(euses) révèle que ce sont préférentiellement les cellules obtenues d'échantillons sanguins féminins qui sont davantage affectées. Ainsi, bien que cela soit au niveau cellulaire plutôt qu'un organisme entier, les NP semblent agir plus intensément sur les cellules du sexe féminin. Cela corrobore bien avec le dimorphisme sexuel observé pour le système immunitaire humain où les femmes possèdent une réponse immunologique plus intense.

Les retombées de cette étude effectuée avec des cellules isolées d'individus sains sont multiples. L'une d'elles est l'acquisition d'informations nouvelles qui pourront contribuer à l'avancement des connaissances sur les effets des NP sur la santé. Collectivement, 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 NP. En plus d'augmenter l'état des connaissances sur le mode d'action et les effets biologiques des NP en lien avec l'inflammation, et de former du personnel hautement qualifié dans ce créneau de recherche, l'approche expérimentale développée ici démontrant que les NT et les EO peuvent réagir différemment selon le sexe, aideront à mieux utiliser éventuellement des NP dans diverses stratégies thérapeutiques et à pousser davantage vers une médecine personnalisée. Également, cette étude peut certes servir de tremplin pour aider à améliorer les procédures actuelles visant à réglementer l'utilisation plus sécuritaire des NP en milieu de travail. À plus long terme, les retombées de cette étude effectuée avec des cellules isolées d'individus sains n'étant pas des travailleurs ou des individus potentiellement ou volontairement exposés aux NP peuvent aider à éclairer davantage une prise de décision pour utiliser, avec

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

entente, les cellules obtenues du sang de certains travailleurs ciblés selon une exposition aux NP. Ceci permettrait d'étudier les fonctions des NT ou des EO qui pourraient avoir des réponses fonctionnelles disproportionnées selon le sexe des donneurs.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

ACRONYMES, SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| Acronyme | Définition |
|--------------------------------|--|
| Ag | Argent |
| Au | Or |
| CAFBSB | Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie |
| CeO ₂ | Dioxyde de cérium |
| CM-H ₂ DCFDA | 5- [et-6] -chlorométhyle-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate |
| Dendrimère G0 et G3 | Dendrimère de génération 0 et 3 |
| DLS | <i>Dynamic light scattering</i> (diffusion dynamique de la lumière) |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| EO | Éosinophile |
| Fe ₃ O ₄ | Oxyde de fer (II, III) ou magnétite |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate (isothiocyanate de fluorescéine) |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (facteur stimulant les colonies de granulocytes macrophages) |
| h | heure |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> (solution saline équilibrée de Hank) |
| IDP | Indice de polydispersité |
| IL | Interleukine |
| INRS | Institut national de la recherche scientifique |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MET | Microscopie électronique en transmission |
| MFI | <i>Mean fluorescence intensity</i> (intensité de fluorescence moyenne) |
| Milli-Q® | marque déposée par la société Millipore Corporation |
| NP | Nanoparticule |
| NP _x | Nanoparticule ayant un diamètre x (nm) |
| NT | Neutrophiles |
| PAMAM | Poly(amidoamine) |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> (solution saline tamponnée au phosphate) |
| Pd | Palladium |

IRSSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| | |
|------------------|--|
| PMA | <i>Phorbol myristate acetate</i> (acétate de myristate de phorbol) |
| Pt | Platine |
| ROS | Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène) |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SD | Standard deviation (écart-type) |
| SEM | <i>Standard error of mean</i> (erreur type de la moyenne) |
| TiO ₂ | <i>Dioxyde de titane</i> |
| TNF- α | <i>Facteur de nécrose tumorale α</i> |
| VAA-I | <i>Viscum album agglutinine-I</i> |
| ZnQ | <i>Oxyde de zinc</i> |

- IRSST** ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

INTRODUCTION

Avec l'engouement financier potentiellement engendré par les nanotechnologies, de plus en plus de personnes seront inévitablement exposées aux NP, incluant bien évidemment des travailleurs les manipulant. Il est bien documenté qu'une exposition aux NP peut mener à des effets indésirables pour la santé, incluant la cytotoxicité, la génotoxicité, le stress oxydatif, des cancers et de l'inflammation. L'inflammation est certainement l'effet le plus rapporté dans la littérature scientifique dans les études dans lesquelles des expositions aux NP sont effectuées. Étant donné leur petitesse, il n'est pas surprenant que l'inhalation des NP représente une des voies majeures d'exposition pouvant causer des maladies pulmonaires inflammatoires ou amplifier celles existantes. Les granulocytes, principalement les neutrophiles (NT) et les éosinophiles (EO) exercent un rôle important dans l'inflammation en général. Il a été démontré qu'après une telle exposition, les NP peuvent également atteindre la circulation sanguine (Miller *et al.*, 2017 ; Raftis et Miller, 2019) où les NT, les leucocytes les plus abondants du sang et chefs d'orchestre de l'inflammation, peuvent directement interagir avec ces NP. En plus de cette voie d'exposition, les travailleurs peuvent être exposés aux NP de diverses façons selon le type d'emploi ou de tâches effectuées comme durant tout le processus de fabrication des NP et/ou des produits qui en contiennent, la manutention et l'entreposage, sans compter les risques d'expositions accidentelles comme lors d'un déversement de NP à la suite d'une mauvaise manœuvre. En plus, connaissant la volonté croissante d'utiliser des NP comme vecteurs de médicaments en clinique ou autres applications médicales, il devient évident qu'une exposition aux NP pour les travailleurs de la santé et pour tous ceux qui participeront à la fabrication de tels produits augmentera les chances d'exposition accidentelles ou non aux NP.

La présente étude tire son origine de certains de travaux antérieurs subventionnés par l'IRSST en lien direct avec les propriétés inflammatoires des NP. Ces travaux ont été réalisés grâce à deux projets de recherche subventionnés par l'IRSST (Lavastre *et al.*, 2015 ; Murphy-Marion et Girard, 2017). Brièvement, dans le premier, il a été démontré que le mode d'action des NP est très complexe et qu'elles peuvent altérer la biologie des NT humains de diverses façons (Babin *et al.*, 2013 ; Goncalves *et al.*, 2010 ; Goncalves et Girard, 2014 ; Poirier *et al.*, 2015). Dans cette étude, les NT étaient isolés à partir du sang d'individus sains n'ayant aucune exposition connue aux NP et sans tenir compte du sexe. Dans un modèle murin, il a été également démontré que plusieurs NP possèdent des propriétés pro-inflammatoires *in vivo* en causant principalement une infiltration neutrophilique et la production de certaines cytokines/chimiokines, sans tenir compte du sexe, car, comme la plupart des autres études de la littérature scientifique, seulement des souris du même sexe, en l'occurrence des femelles, ont été utilisées (Durocher et Girard, 2016 ; Goncalves et Girard, 2011).

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Dans le second, axé sur les interactions NP-EO (et non pas NT), il a été démontré, que certaines NP retardent l'apoptose spontanée des EO et augmentent la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (Silva et Girard, 2016). De plus, il a été démontré que plusieurs NP possèdent la capacité d'augmenter l'adhérence des EO sur un substrat de cellules endothéliales humaines (Murphy-Marion M., 2017). Collectivement, ces travaux avaient pour objectifs de mieux comprendre le mode d'action des NP et d'en évaluer leur potentiel inflammatoire. Toutefois, bien qu'un grand nombre d'expériences aient été effectuées en laboratoire générant de nombreux résultats, tel que mentionné auparavant, aucune analyse n'a été effectuée en tenant compte du sexe comme la plupart des études dans le domaine. En se basant sur une revue de la littérature anémique, rapportant quelques effets différentiels des NP observés chez l'animal selon le sexe, la présente étude a ainsi été pensée et mise sur pied pour pallier cette lacune. Ainsi, cette étude permet non seulement d'augmenter les connaissances dans ce domaine, mais sera d'une utilité certes pour aider au développement de projets futurs. Parmi eux, notons des projets visant à promouvoir l'utilisation des cellules primaires humaines pour aider à régler l'utilisation plus sécuritaire des NP en milieu de travail et l'utilisation d'échantillons sanguins de femmes et d'hommes exposés aux NP en milieu de travail afin d'étudier le comportement des granulocytes, si importants non seulement pour la défense de l'hôte, mais également si important dans le développement et la régulation de l'inflammation pouvant différer chez l'homme et la femme.

1. ÉTAT DES CONNAISSANCES

Les nanotechnologies représentent un domaine en pleine expansion non seulement dans le secteur industriel, mais également en recherche universitaire et publique et en médecine. Le développement des nanotechnologies représente un potentiel économique indéniable pour les pays industrialisés, incluant le Canada. Plus près de nous, au Québec, il est à prévoir qu'un nombre grandissant de travailleurs sera exposé aux NP. À ce sujet, les résultats d'une étude récente ayant pour objectif de dresser le portrait des industries et des laboratoires de recherche universitaire et publique du Québec qui développent, produisent, utilisent ou commercialisent des NP de synthèse, indiquent clairement qu'au moins près de 2000 travailleurs québécois sont déjà exposés aux NP et que tout porte à croire que ce nombre augmentera dans le futur sans compter le grand public utilisant des produits contenant des NP (Endo C.-A., 2014). Il est donc capital de prévenir le développement de maladies ou d'accidents reliés aux NP dont l'un des effets toxiques les mieux documentés dans la littérature est l'inflammation. En ce sens, bien que dans le passé il ait été démontré que plusieurs NP possèdent des propriétés inflammatoires *in vitro* et *in vivo* (Durocher et Girard, 2016 ; Durocher *et al.*, 2017 ; Goncalves *et al.*, 2010 ; Goncalves et Girard, 2011 ; Silva et Girard, 2016), il existe présentement très peu de données portant sur des différences de ces propriétés inflammatoires selon le sexe chez l'humain.

La nanotoxicologie, discipline qui vise à étudier les effets toxiques potentiels des NP sur la santé, connaît un essor qui ne cesse de s'accroître année après année (Arora *et al.*, 2012 ; Oberdorster *et al.*, 2005 ; Ray *et al.*, 2020). Il n'est donc pas étonnant de constater que des données scientifiques s'accumulent et démontrent des effets toxiques et indésirables de plusieurs NP (Chen, H. W. *et al.*, 2006 ; Hussain *et al.*, 2011), incluant telle que mentionnée, l'inflammation (Chen, H. *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2015 ; Rossi *et al.*, 2010). En plus, il est fort probable que les NP peuvent constituer un facteur dans l'environnement de travail pouvant même aggraver certains désordres préexistants comme des maladies pulmonaires, incluant l'asthme (Brandenberger *et al.*, 2013 ; Hussain *et al.*, 2011). Plusieurs NP possèdent non seulement la capacité à déréguler l'inflammation induite par des agents dans certains modèles animaux (Brandenberger *et al.*, 2013 ; Inoue et Takano, 2011), mais possèdent également, par elles-mêmes, des propriétés inflammatoires *in vivo* (Chen, H. *et al.*, 2013 ; Durocher et Girard, 2016 ; Huang *et al.*, 2015) et *in vitro* (Babin *et al.*, 2013 ; Sahu *et al.*, 2014). En gros, dans plusieurs modèles inflammatoires *in vivo*, un nombre plus élevé de cellules NT ou EO est observé dans les fluides biologiques ou les poumons après traitement aux NP. Ainsi, dans la majorité des publications scientifiques, le nombre de NT et de EO sert bien souvent de « marqueurs » de l'inflammation, compte tenu de leurs rôles importants dans ce processus ; plus le nombre de cellules est élevé, plus l'inflammation est importante en intensité. Cependant, beaucoup moins d'études portent sur les effets directs des NP sur ces cellules *in vitro*, particulièrement chez des cellules primaires d'origine humaine. Bien

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

que les études in vivo effectuées chez la souris peuvent mener à des avancées scientifiques importantes, il convient de préciser ici qu'en ce qui concerne le domaine de l'inflammation, la population de NT chez une souris ne représente qu'environ 20 % des leucocytes totaux alors que chez l'homme c'est plutôt plus de 65-70 % (Mestas et Hughes, 2004). De nos jours, certains types d'emplois sont encore majoritairement occupés par des hommes ou des femmes dans divers secteurs. Il est fort à parier que parmi ces travailleurs, dans un cas comme dans l'autre, plusieurs seront de plus en plus exposés aux NP. Les secteurs de la coiffure et l'esthétique chez les femmes et de la soudure chez les hommes en sont de bons exemples, pour ne nommer qu'eux. Bien que des données scientifiques s'accumulent et démontrent des propriétés inflammatoires de plusieurs NP (Babin *et al.*, 2013 ; Cho *et al.*, 2012 ; Durocher et Girard, 2016 ; Goncalves et Girard, 2011 ; Poirier *et al.*, 2015 ; Pujari-Palmer *et al.*, 2016 ; Silva et Girard, 2016 ; Verdon *et al.*, 2021), il n'existe présentement aucune donnée portant sur des différences de ces propriétés selon le sexe chez l'humain. La présente étude vise à combler cette lacune et est en partie fondée sur le fait que chez des modèles animaux traités avec des NP, certaines différences ont été observées entre les sexes dans une littérature scientifique anémique. Une étude, effectuée chez des rats traités avec des NP d'argent, rapporte que les femelles accumulent davantage les NP au niveau des reins que les mâles. Aucune autre observation semblable n'a été relevée au niveau du foie, cerveau, poumons et dans le sang (Kim *et al.*, 2009). Dans une autre étude menée par la même équipe, les chercheurs ont analysé l'expression génétique en réponse aux NP d'argent, et ils ont identifié que certains gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques étaient préférentiellement surexprimés chez les mâles alors que chez les femelles il s'agissait plutôt de gènes impliqués dans des voies d'activation signalétiques (Dong *et al.*, 2013). En testant les propriétés inflammatoires de nanocristaux de cellulose (nanocellulose cristalline ou cellulose nanocristalline), une équipe a observé que ces derniers causaient une inflammation pulmonaire plus importante chez des souris femelles comparativement aux mâles, basée sur une plus grande expression de la cytokine TGF- β et de collagène dans les poumons (Shvedova *et al.*, 2016).

Le système immunitaire des hommes et des femmes est différent et l'existence d'un tel dimorphisme sexuel est de plus en plus documentée (Jaillon *et al.*, 2019). Cela est particulièrement évident en ce qui concerne la réponse immunitaire innée dans laquelle les granulocytes comme les NT et EO sont grandement impliqués. Non seulement le rôle des hormones y serait pour beaucoup, mais l'existence même de plusieurs gènes importants en immunologie étant localisés sur le chromosome X, tempère le rôle central des hormones. En ce sens, le fait que la plus grande susceptibilité à développer des infections chez les hommes s'observe dès la naissance jusqu'à l'âge adulte, suggère fortement que ce sont les chromosomes sexuels qui sont importants pour expliquer le dimorphisme plutôt que les hormones sexuelles connues pour entrer en jeu vers l'adolescence (Jaillon *et al.*, 2019 ; Lefevre *et al.*, 2019). Bien que très complexe et encore mal connue, la sévérité et la durée de la réponse inflammatoire sont bien différentes chez les hommes et les femmes. En effet, les femmes sont connues pour avoir une réponse

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

immunitaire généralement plus intense, les rendant moins susceptibles aux infections, mais plus susceptibles à développer des maladies auto-immunes connues pour avoir une composante inflammatoire.

Jusqu'à présent, aucune donnée n'existe en ce qui concerne des effets des NP liés au sexe pour des fonctions cellulaires importantes en inflammation, et ce, particulièrement avec des cellules primaires humaines. Cependant, il y a près de 30 ans, une étude (probablement la seule à ce jour) rapporte que certains métaux (cadmium et nickel à des grosseurs non nanométriques cependant) augmentent davantage l'adhérence des NT de femmes comparativement à ceux obtenus chez les hommes (Macia et Hernandez, 1995). Plus récemment, une étude révèle que des cellules souches amniotiques humaines femelles ingéraient plus de nanocristaux que les cellules mâles (Serpooshan *et al.*, 2018). Cependant, en utilisant les mêmes NP, les auteurs ont observé l'inverse en utilisant des cellules fibroblastes isolées des glandes salivaires. Ces observations effectuées par la même équipe, bien que contradictoires, démontrent qu'il peut y avoir un effet différentiel, en l'occurrence la capacité à ingérer des NP, selon que les cellules aient été obtenues d'un individu mâle ou femelle.

La présente étude veut donc documenter les propriétés inflammatoires des NP en étudiant la biologie des NT et EO tout en analysant les données obtenues en tenant compte du sexe afin de pallier cette lacune notée dans la littérature scientifique.

2. OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif principal est de déterminer si les propriétés inflammatoires des NP peuvent différer selon le sexe en regard de la physiologie cellulaire des NT et des EO humains.

De façon plus spécifique, les objectifs sous-jacents sont :

- établir si une NP (ou plusieurs) peut agir différemment chez les NT ou chez les EO obtenus à partir d'échantillons sanguins de femmes comparativement à ceux obtenus à partir d'échantillons sanguins d'hommes ;
- déterminer quelles fonctions des NT et des EO seront modulées à la hausse ou à la baisse par les NP selon le sexe.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Choix des NP et caractérisation.

Douze NP auxquelles les travailleurs québécois (et ailleurs dans le monde) sont susceptibles d'être exposés ont été sélectionnées pour la présente étude. Elles sont présentées dans le tableau 1. Ce choix provient de travaux antérieurs démontrant que ces NP peuvent altérer la biologie des NT et/ou des EO, mais les données obtenues ne tenaient pas contre du sexe des donneurs. De plus, elles sont amplement étudiées en nanotoxicologie et recherches connexes, probablement dues au fait qu'elles sont, pour la plupart, largement utilisées en industrie et qu'elles se retrouvent dans plusieurs produits faisant partie du quotidien. Chacune des NP a été caractérisée par diffusion dynamique de la lumière, à l'aide d'un appareil Nanosizer (Zetasizer Nano-ZS modèle ZEN3600, Malvern) disponible dans le laboratoire (tableau 1 et figure 1). La stérilité des NP a été déterminée avec une trousse de détection des endotoxines et/ou par ensemencement des suspensions de NP sur pétri avec un milieu de culture LB (*lysogeny broth*) pour 72 h comme préalablement détaillé (Durocher et Girard, 2016 ; Goncalves et Girard, 2014). Aucune contamination apparente n'a été détectée (résultats non montrés). Des tests d'interférence ont été effectués en mesurant un signal potentiellement obtenu avec les NP seules pour les méthodes le nécessitant. Les signaux obtenus étaient tous négligeables.

Tableau 1. Nanoparticules étudiées dans ce projet

| | NP | Fournisseur | Caractérisation |
|---|------------------------------------|------------------|----------------------------|
| 1 | Fe ₃ O ₄ | Sigma-Aldrich | Sphérique, 9-11 nm par MET |
| 2 | ZnO | Sciventions Inc. | Sphérique, <10 nm par MET |
| 3 | CeO ₂ | Sciventions Inc. | Sphérique, <10 nm par MET |
| 4 | TiO ₂ (<i>rutile</i>) | Sciventions Inc. | Sphérique, <10 nm par MET |
| 5 | Palladium | Sciventions Inc. | Sphérique, <10 nm par MET |
| 6 | Platine | Sciventions Inc. | Sphérique, <10 nm par MET |
| 7 | AuNP ₂₀ | NanoBrand | Sphérique, 20 nm par MET |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| | NP | Fournisseur | Caractérisation |
|----|--------------------|-----------------|---|
| 8 | AuNP ₇₀ | NanoBrand | Sphérique, 70 nm par MET |
| 9 | Dendrimère G0 † | Sigma-Aldrich | Multibranches, <3 nm selon la littérature |
| 10 | Dendrimère G3 † | Sigma-Aldrich | Multibranches, <3 nm selon la littérature |
| 11 | AgNP ₂₀ | Ted Pella, Inc. | Sphérique, 20 nm par MET |
| 12 | AgNP ₇₀ | Ted Pella, Inc. | Sphérique, 70 nm par MET |

† Dendrimère poly(amidoamine) (PAMAM)

3.2 Sélection des donneurs, hommes ou femmes

Une banque de donneurs(euses) existante (>350 employés sur le campus) a été utilisée pour obtenir des échantillons sanguins d'hommes et de femmes sélectionnés selon quelques critères d'exclusion (fumeurs ; personnes prenant des anti-inflammatoires et/ou ayant des maladies connues (par exemple diabète, arthrite, asthme, cancers, etc.) ainsi que les personnes présentant des signes de rhume ou grippe). Les prises de sang sont effectuées directement au bureau de santé de l'INRS-CAFSSB, permettant d'obtenir le matériel le plus frais possible. L'infirmière procède par l'envoi d'un courriel à tous les employés puis organise les rendez-vous selon les premiers répondants. Un formulaire de consentement, déjà en utilisation depuis plusieurs années, est signé par chaque donneur.

3.3 Isolement et traitement des cellules

Les NT et EO sont fraîchement isolés de façon routinière dans le laboratoire (Babin *et al.*, 2013 ; Chhay *et al.*, 2018 ; Silva et Girard, 2016). À la suite de l'isolement des granulocytes (NT + EO) effectué après sédimentation sur Dextran et centrifugation sur Ficcol-Hypaque, la pureté des cellules chez un donneur donné est déterminée aisément par cytologie après coloration des cellules à l'aide d'une trousse commercialement disponible de type Hema-3™ stain basée sur la coloration classique de Wright et Giemsa. En général, la présence d'EO dans les préparations varie grossièrement de 0-10 %, le reste étant des NT (figure 2). Lorsque la présence d'au moins 3 % d'EO est observable, la suspension cellulaire est réutilisée afin de la traiter pour purifier les EO en éliminant les NT par une technique de séparation négative. Il s'agit de traiter la suspension cellulaire avec des anticorps liant spécifiquement un marqueur de surface des NT, le CD16, couplés à des billes magnétiques et de la déposer ensuite sur une colonne fixée à un montage aimanté. Ainsi, les NT seraient retenus dans la colonne laissant passer les EO

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

facilement récupérables. Parmi les concentrations de 10, 50 et 100 µg/ml, seulement la concentration de 100 µg/ml de NP a été retenue étant donné que des tests préliminaires démontrent que la biologie des cellules n'est pas affectée avec les plus faibles concentrations. De plus, une concentration de 100 µg/mL de NP est couramment utilisée dans des études *in vitro* (Arora *et al.*, 2009 ; Durocher *et al.*, 2017 ; Goncalves *et al.*, 2010 ; Rosas-Hernandez *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2013) et, dans le cas présent, elle est en plus utilisée pour des fins de comparaisons entre les différentes NP.

Ainsi, pour ce rapport, les NT et EO ont incubés *in vitro* avec le milieu de culture RPMI + 10 % de sérum autologue avec 100 µg/ml de NP et la viabilité cellulaire a été déterminée par la technique d'exclusion au bleu de trypan avant chaque expérience.

3.4 Production de dérivés réactifs de l'oxygène

La production de dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) peut être mesurée par différentes techniques. Dans la présente étude, après traitement des cellules avec les NP pour 30 minutes, la production de ROS totaux intracellulaires a été mesurée par un signal émis par la sonde CM-H₂DCFDA à l'aide de l'appareil Spectra Max M5 (plate reader, Molecular Devices) avec une excitation/émission de 485/538 nm (Chhay *et al.*, 2018 ; Goncalves et Girard, 2014).

3.5 Phagocytose

La capacité des NT et EO à exercer la phagocytose des bactéries *Escherichia coli* de la souche K-12 (Alexa Fluor 488-FITC-*E. coli*) est déterminée à l'aide de la cytométrie en flux comme détaillée (Simard *et al.*, 2011). Brièvement, les cellules ont été traitées avec ou sans NP pour 30 minutes pour ensuite être incubées avec les bactéries (ratio 10 bactéries : une cellule) pour une durée de 30 minutes. Après lavages, la phagocytose a été déterminée à l'aide d'un cytofluorimètre (BD FACScan apparatus, BD Biosciences).

3.6 Migration/chimiotactisme

La technique classique ayant recours à une chambre de Boyden a été utilisée. Il s'agit d'un montage simple composé d'une chambre inférieure et supérieure séparée par une membrane poreuse. Brièvement, les cellules sont traitées ou non avec une NP donnée pendant 30 minutes. Par la suite, 50 ng/ml de la cytokine GM-CSF ou 100 ng/ml d'IL-8 (témoin positif pour les EO et NT, respectivement) sont ajoutés dans la chambre inférieure et la membrane est ensuite déposée. Les cellules NT ou EO sont incubées dans la chambre supérieure. Après 30 minutes, la membrane est récupérée, colorée puis montée sur une lame de microscope. Le nombre de cellules accolées sur la membrane (partie faisant face à la chambre inférieure) est déterminé et les résultats sont présentés sous forme d'index (groupe traité/groupe non traité) ou le groupe normal est égal à 1 (Durocher *et al.*, 2017 ; Ratthe *et al.*, 2002).

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

3.7 Adhérence sur un substrat cellulaire

Les cellules endothéliales EA.hy926 (ATCC) humaines ont été utilisées comme substrat pour déterminer la capacité d'adhérence des NT et EO. Pour ce faire, les NT ou EO préalablement traités avec une NP donnée pour 30 minutes sont marqués pendant 30 min avec 5 μM de calcéïne-AM (Molecular Probes, Inc.) puis déposés sur le tapis cellulaire EA.hy926 (confluence >80 %) pour 30 minutes. Ensuite, plusieurs lavages sont effectués et les NT ou EO adhérents sont dénombrés par microscopie à fluorescence. Les résultats sont présentés sous forme d'index (groupe traité/groupe normal) ou le groupe normal est égal à 1 (Chhay *et al.*, 2018 ; Murphy-Marion et Girard, 2018).

3.8 Apoptose

Le taux d'apoptose des cellules a été déterminé par observation cytologique en microscopie optique. Les cellules en apoptose sont aisément reconnaissables puisque leur noyau caractéristique polylobé (NT) ou bilobé (EO) change complètement de forme pour devenir pycnotique. Il est aisé de quantifier le pourcentage de cellules en apoptose dans un échantillon. Les cellules sont traitées pour une période de 24h avec ou sans une NP donnée, récupérées, centrifugées sur une lame puis colorées avec un kit de coloration Hema-3 (Goncalves *et al.*, 2010 ; Poirier *et al.*, 2014 ; Silva et Girard, 2016). Occasionnellement, en parallèle, le taux d'apoptose a été également vérifié par cytométrie en flux après marquage des cellules avec un mélange d'annexine-V-FITC et de l'iodure de propidium.

3.9 Production de cytokines

La production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α est déterminée par ELISA à l'aide de trousse disponibles commercialement en utilisant les surnageants des NT et EO traités ou non avec les NP pour une période de 24h. (Durocher *et al.*, 2017 ; Goncalves *et al.*, 2010 ; Silva et Girard, 2016).

3.10 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par une moyenne \pm écart-type (sauf si spécifié et uniquement afin de simplifier les graphiques) et une analyse de la variance (ANOVA) est effectuée (ANOVA à un facteur) et les différences de chacun des groupes par rapport au groupe témoin sont examinées à l'aide du test de Dunnett utilisant GraphPad Prism (version 5.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Les données sont considérées significatives de la façon suivante :

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; et **** $p < 0,001$ vs le groupe témoin (Ctrl). Les tests sont faits à la fois avec l'ensemble des données, c.-à-d. les résultats obtenus avec les mâles et femelles ensemble, avec les mâles seuls et avec les femelles seules.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

4. RÉSULTATS

4.1 Caractérisation des NP et viabilité cellulaire

Dans les conditions utilisées pour les analyses effectuées par diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, [DLS]), en suspension dans l'eau, la plupart des NP montrent un diamètre plus élevé que celui fourni par les manufacturiers, lorsque mesurés par MET, sauf pour AgNP₇₀, AuNP₂₀ et AuNP₇₀ qui ont des valeurs similaires (tableau 2, valeurs en bleu). Cependant, lorsque les mesures sont effectuées dans le tampon RPMI en présence de sérum humain, toutes les valeurs, comme prévu, sont largement supérieures, sauf pour Pd et ZnO (valeurs en gris). Ceci est explicable à la formation d'une corona sur les NP, due à la présence de plusieurs protéines dans le sérum humain (Ahsan *et al.*, 2018 ; Ge *et al.*, 2015). Collectivement, les données de DLS suggèrent la présence de plus gros agrégats dépassant parfois les 100 nm, taille généralement acceptée dans la littérature pour qu'une particule puisse être nommée et considérée comme étant une NP. En dépit de la présence d'agrégats, il est intéressant de constater que plusieurs NP possèdent un IDP <0,2 considéré comme ayant une dispersion stable. C'est le cas pour AgNP₂₀, AgNP₇₀, AuNP₇₀ et CeO₂ (valeurs en vert). Un potentiel zêta de ± 40 à ± 60 mV indique une très bonne stabilité des suspensions colloïdales des NP. Ici, c'est le cas pour AgNP₂₀, AgNP₇₀, AuNP₂₀, AuNP₇₀, Pd, TiO₂ et CeO₂ (valeurs en jaune) lorsque les mesures sont effectuées pour les NP en suspension dans l'eau distillée (Eau Milli-Q®). Il est à noter que la possibilité qu'une désagrégation des NP ait lieu lorsqu'elles sont déposées dans les cultures cellulaires et pouvant ensuite être endocytées menant à des tailles plus petites ne peut être exclue. En effet, ceci a déjà été observé par exemple pour les AgNP₂₀, AuNP₂₀, AuNP₇₀, alors que plusieurs NP se retrouvaient libres et non agrégées dans le cytosol ou encore dans des vacuoles des NT (Noel *et al.*, 2016 ; Poirier *et al.*, 2014). Un exemple de résultat obtenu à la suite d'une analyse DLS pour la distribution de la taille des NP de CeO₂ est illustré à la figure 1.

Des dénombrements cellulaires après coloration au bleu de trypan ont été effectués afin de s'assurer que la viabilité des cellules ne soit pas altérée à la suite du traitement avec les différentes NP. Les concentrations de NP étaient comprises entre 0 et 500 µg/mL. Moins de 10 % de nécrose a été observée pour toutes les NP testées, jusqu'à des concentrations ≤ 100 µg/mL, pour une période de traitement allant jusqu'à 24 h (résultats non montrés). Il est à noter que les NT et les EO sont des cellules connues pour se diriger spontanément en apoptose et qu'après environ 24h d'incubation (48h pour les EO), 30-50 % des cellules seront apoptotiques sans aucun traitement *in vitro*.

Tableau 2. Caractéristique des nanoparticules obtenues par analyses DLS

| Nanoparticule ^a | Milieu de suspension | Diamètre (nm) ^e | IDP ^{b,e} | Potentiel zêta (mV) ^e |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------------|
| AgNP ₂₀ | Eau Milli-Q® | 86,5 ± 12,4 | 0,12 ± 0,008 | -47,8 ± 0,4 ^e |
| | RPMI-10 % | 412,3 ± 41,5 | 0,7 ± 0,1 | -8,1 ± 0,1 |
| AgNP ₇₀ | Eau Milli-Q® | 78,9 ± 5,2 | 0,22 ± 0,06 | -40,7 ± 1 |
| | RPMI-10 % | 122 ± 6,1 | 0,7 ± 0,02 | -8,2 ± 0,8 |
| AuNP ₂₀ | Eau Milli-Q® | 25 ± 0,1 | 0,31 ± 0,002 | -60,4 ± 7,4 |
| | RPMI-10 % | 84 ± 2,7 | 0,5 ± 0,09 | -8,1 ± 0,5 |
| AuNP ₇₀ | Eau Milli-Q® | 58 ± 1 | 0,21 ± 0,006 | -44 ± 0,9 |
| | RPMI-10 % | 94 ± 0,9 | 0,2 ± 0,01 | 0,4 ± 0,2 |
| Pt | Eau Milli-Q® | 36,9 ± 13,9 | 0,08 ± 0,03 | -5,4 ± 0,3 |
| | RPMI-10 % | 191,8 ± 41,6 | 0,8 ± 0,2 | -7,9 ± 0,5 |
| Pd | Eau Milli-Q® | 197,8 ± 4,67 | 0,3 ± 0,006 | -47,3 ± 1,3 |
| | RPMI-10 % | 141,4 ± 10,6 | 1 ± 0,06 | -8,8 ± 0,6 |
| Fe ₃ O ₄ | Eau Milli-Q® | 47,9 ± 1,53 | 0,44 ± 0,02 | -27,1 ± 0,2 |
| | RPMI-10 % | 124,3 ± 3,6 | 0,8 ± 0,05 | -7,7 ± 0,2 |
| TiO ₂ | Eau Milli-Q® | 491 ± 67,93 | 0,58 ± 0,04 | -48,3 ± 3,3 |
| | RPMI-10 % | 533,9 ± 62,3 | 0,8 ± 0,03 | -9,9 ± 1 |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| Nanoparticule ^a | Milieu de suspension | Diamètre (nm) ^e | IDP ^{b,e} | Potentiel zêta (mV) ^e |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------------|
| ZnO | Eau Mill-Q© | 287 ± 197,2 | 0,37 ± 0,2 | -8,5 ± 5,4 |
| | RPMI-10 % | 191.2 ± 23.3 | 0.8 ± 0.06 | -7,5 ± 0,2 |
| CeO ₂ | Eau Mill-Q© | 83,6 ± 0,9 | 0.22 ± 0.007 | -49 ± 1,9 |
| | RPMI-10 % | 158,7 ± 9,2 | 0,9 ± 0,04 | -8,8 ± 0,5 |
| G0 ^c | X | X | X | X |
| G3 ^c | X | X | X | X |

^a Des échantillons différents ont été analysés à une concentration de 100 µg/mL. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n=3).

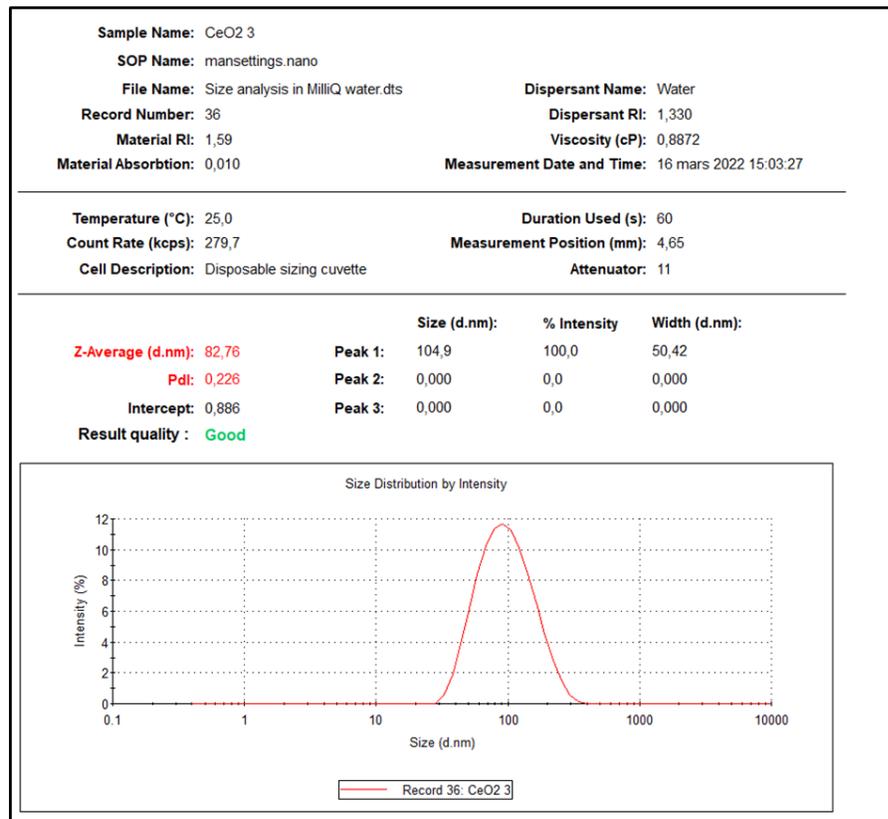
^b Indice de polydispersité.

^c Les NP PAMAM G0 et G3 sont trop petites pour être analysées par DLS. Leur diamètre est en deçà de 5 nm.

^e Nombres colorés, valeurs d'intérêt relevées dans le texte.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Figure 1. Résultats représentatifs d'une analyse effectuée par DLS en ce qui concerne la distribution de la taille des nanoparticules de CeO2.

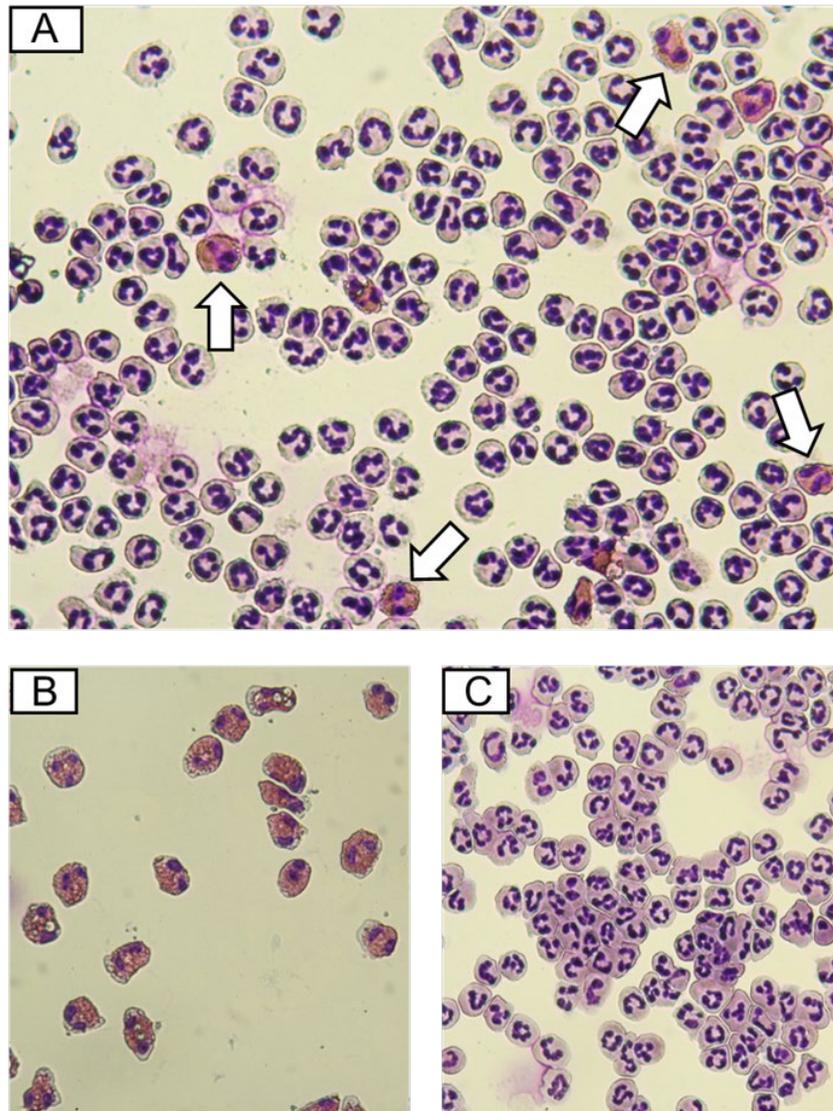


Pour cet échantillon, on note une taille moyenne de 82,8 nm lorsque les NP sont en suspension dans l'eau distillée (Milli-Q®) à une concentration de 100 µg/mL.

- IRSST** ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

La figure 2 illustre la morphologie des cellules utilisées dans cette étude, les NT et les EO. Alors que les NT ont une couleur bleuâtre et possèdent un noyau polylobé, les EO sont plutôt rougeâtres avec un noyau bilobé en général.

Figure 2. Images représentatives illustrant des cellules obtenues après l'isolement des granulocytes à partir du sang d'un donneur.



Les granulocytes ont été fraîchement isolés à partir du sang par une méthode routinière comportant une étape de sédimentation au Dextran suivie d'une centrifugation sur Ficcol. La fraction ainsi obtenue contient principalement des NT (majorité des cellules polylobées dans le panneau A) et des EO (flèches blanches). Les NT peuvent être éliminés par une technique de séparation négative en traitant la suspension cellulaire avec des anticorps se liant spécifiquement aux NT couplés à des billes magnétiques. Le tout est ensuite déposé sur une colonne fixée à un montage aimanté. Ainsi, les NT seront retenus dans la colonne ne laissant passer que les EO (B).

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Les NT peuvent aussi être récupérés en lavant la colonne avec un tampon (C). Les images sont issues d'une coloration de type Wright & Giemsa effectuée avec la trousse commerciale Hema-3™ stain à un grossissement de 400 X. NT, neutrophiles ; EO, éosinophiles.

4.2 Altération des fonctions des NT et des EO en réponse aux NP

Le tableau 3 montre l'ensemble des données obtenues avec des NT et des EO mâles et femelles. Il permet d'examiner la capacité des NP à altérer certaines fonctions des NT et des EO humains étudiées dans cette étude (figure 2), incluant : a) la capacité à élaborer des produits dérivés de l'oxygène (ROS) ; b) la phagocytose ; c) l'apoptose ; d) la migration ; e) l'adhérence ; et f) la production des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α . Étant donné les contraintes et les limites à obtenir des dons de sang à cause de la pandémie et des mesures sanitaires instaurées par le gouvernement, certains tests n'ont pu être effectués avec un grand nombre d'échantillons sanguins, comme prévu, pour toutes les NP étudiées. Cependant, sauf si indiqué, aucun résultat n'a été obtenu avec moins de cinq à sept échantillons sanguins différents, ce qui est suffisant pour en tirer des conclusions.

Tableau 3. Effets différentiels des NP sur la biologie des neutrophiles (NT) et des éosinophiles (EO) mâles (♂) et femelles (♀)

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|-----------------|-----------------|----------------------------|--|
| | | | |
| ZnO | Apoptose | NT♂♀↓↓ - EO♂♀↓↓ | Différence significative pour EO♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓↓ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀↑ - EO♂♀∅ | Légère augmentation, NT♂♀-IL-8 |
| | Adhérence | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | |
| | Migration | NT♂♀↑↑ - EO♂♀∅ | Pas de différence ♂♀ |
| | | | |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|
| CeO ₂ | Apoptose | NT♂♀↓↓ - EO♂♀∅ | Différence significative pour NT♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓↓ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | Légère augmentation, EO♂-IL-8 |
| | Adhérence | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Migration | NT♂♀↑↑ - (ND) | Pas de différence ♂♀ |
| TiO ₂ | Apoptose | NT♂♀↓↓ - EO♂♀∅ | Différence significative chez les NT♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓↓ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Adhérence | NT♂♀∅ - EO♂♀↑↑ | Pas de différence ♂♀ |
| | Migration | NT♂♀↑↑ - EO♂♀∅ | Pas de différence ♂♀ |
| Pt | Apoptose | NT♂♀↓↓ - EO♂♀↓↓ | Différence significative chez les EO♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓↓ | Pas de différence ♂♀ |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|--------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | Légère augmentation, EO♂♀-IL-8 |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑↑ | Différence significative chez les NT♀ |
| | Migration | NT♂♀↑↑ - (ND) | Différence significative chez les NT♂ |
| Pd | Apoptose | NT♂♀↓ - EO↓↓♂♀ | Différence significative chez les EO♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓↓ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | Légère augmentation pour IL-8/EO |
| | Adhérence | NT♂♀↑/ - EO♂♀↑ | |
| | Migration | NT♂♀↑/ - EO♂♀∅ | Différence significative chez les NT♂ |
| Fe ₃ O ₄ | Apoptose | NT♂♀↓↓ - EO♂♀∅ | Puissant inhibiteur pour NT♂♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀↑↑ - EO♂♀∅ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀↑↑ - (ND) | IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α/NT |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑ | Pas de différence ♂♀ |
| | Migration | NT♂♀↑↑ - EO♂♀∅ | Pas de différence ♂♀ |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|--------------------|-----------------|----------------------------|---|
| | | | |
| G0 | Apoptose | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↑↑ | Différence significative chez les EO♀ |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Adhérence | NT♂♀↑ - (ND) | |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | | | |
| G3 | Apoptose | NT♂♀↑ - EO♂♀↑↑ | Légère augmentation chez les NT♂ Différence significative chez les EO♀ |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↑↑ | Pas de différence ♂♀ |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | Légère augmentation pour IL-8/EO |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑ | Pas de différence ♂♀ |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | | | |
| AgNP ₂₀ | Apoptose | NT♂♀↑ - EO♂♀↑ | |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|-------------------------------|-----------------|----------------------------|---|
| AgNP ₂₀ (suite) | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | |
| | Cytokines | NT♂♀↑ - EO♂♀↑ | Légère augmentation, IL-8/NT et IL-8/EO |
| | Adhérence | NT♂♀↑ - EO♂♀∅ | |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| AgNP ₇₀ | Apoptose | NT♂♀↓ - EO♂♀↑ | |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↑ | |
| | Cytokines | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑ | Augmentation IL-8/NT, IL-8/EO |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↓ | Différence significative NT femelles |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| AuNP ₂₀ | Apoptose | NT♂♀↑ - EO♂♀↑ | |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀↓ | |

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

| NP ^a | Fonction testée | Effet observé ^b | Analyse basée sur le sexe |
|--------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------------------|
| | Cytokines | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑↑ | IL-8/NT, IL-8/EO, IL-1β/EO |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑ | Différence significative NT mâles |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| AuNP ₇₀ | Apoptose | NT♂♀↑ - EO♂♀↑ | |
| | ROS | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Phago | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |
| | Cytokines | NT♂♀∅ - EO♂♀↑↑ | Différence significative, IL-1β EO♀ |
| | Adhérence | NT♂♀↑↑ - EO♂♀↑ | Pas de différence ♂♀ |
| | Migration | NT♂♀∅ - EO♂♀∅ | |

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

^b ↑, augmentation; ↓, diminution; ∅, sans effet notable. Le nombre de flèches indique l'intensité de la réponse étudiée et deux flèches correspondent à un résultat significatif ($p < 0,05$).

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

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

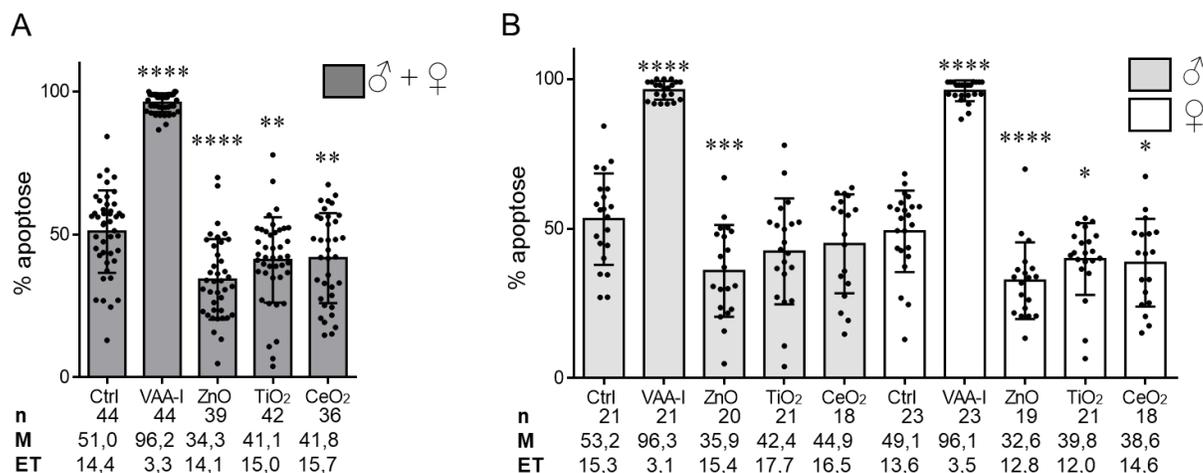
Bleu et **Rose**: Effet significatif selon le sexe chez NT et EO ♂ et ♀, respectivement

ND, non déterminé ou données insuffisantes. NP, nanoparticules.

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

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

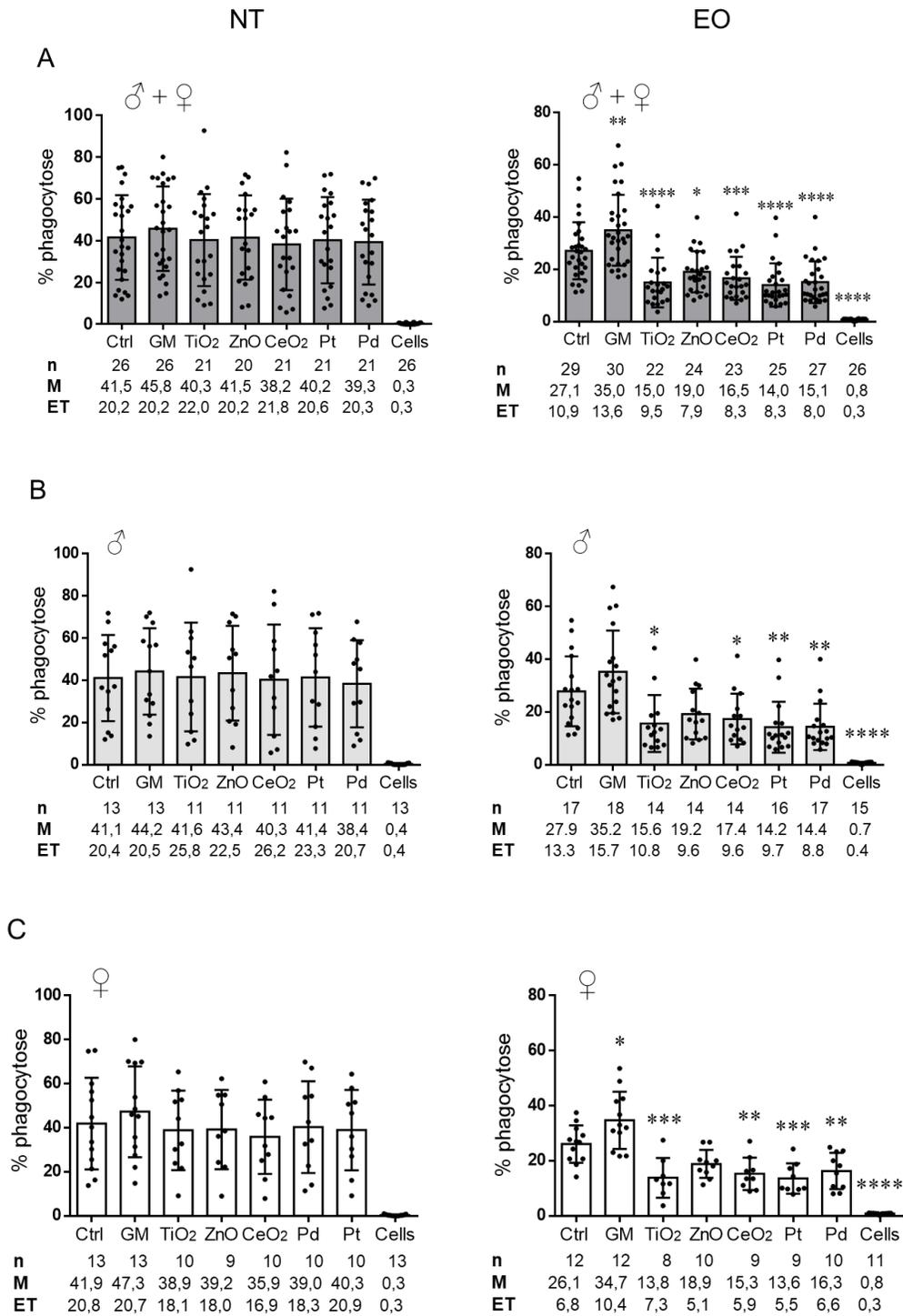
Figure 3. Effet de certaines NP sur le taux d'apoptose des neutrophiles en tenant compte ou non du sexe.



Les NT ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), la lectine de plante VAA-I (un agent proapoptotique puissant) ou les trois types de NP indiqués à 100 µg/mL pour une période de 24 heures. Le taux d'apoptose a été déterminé tel que détaillé dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. n, nombre de donneurs ; M, moyenne géométrique ; ET, écart-type. Chaque point représente une expérience effectuée avec un(e) donneur(euse).

Dans la figure 3, le taux d'apoptose de trois NP, ZnO, TiO₂ et CeO₂ ainsi que de la lectine de plante VAA-I utilisée comme témoin proapoptotique, a été déterminé avec des NT mâles et femelles. Lorsque les résultats sont présentés en ne tenant pas compte du sexe (A), les trois NP ont la capacité d'inhiber significativement le processus d'apoptose des NT. Cependant, en tenant compte du sexe, on note que la capacité des NP de TiO₂ et CeO₂ à agir comme des agents anti-apoptotiques est plutôt attribuée aux femelles alors qu'il est évident que les NP de ZnO agissent indépendamment du sexe. Il s'agit ici d'un exemple démontrant que certaines NP peuvent agir différemment (mais pas nécessairement à l'opposé) sur la biologie des NT selon le sexe.

Figure 4. Certaines NP n'altèrent pas la phagocytose basale des NT mais altèrent celle des EO.

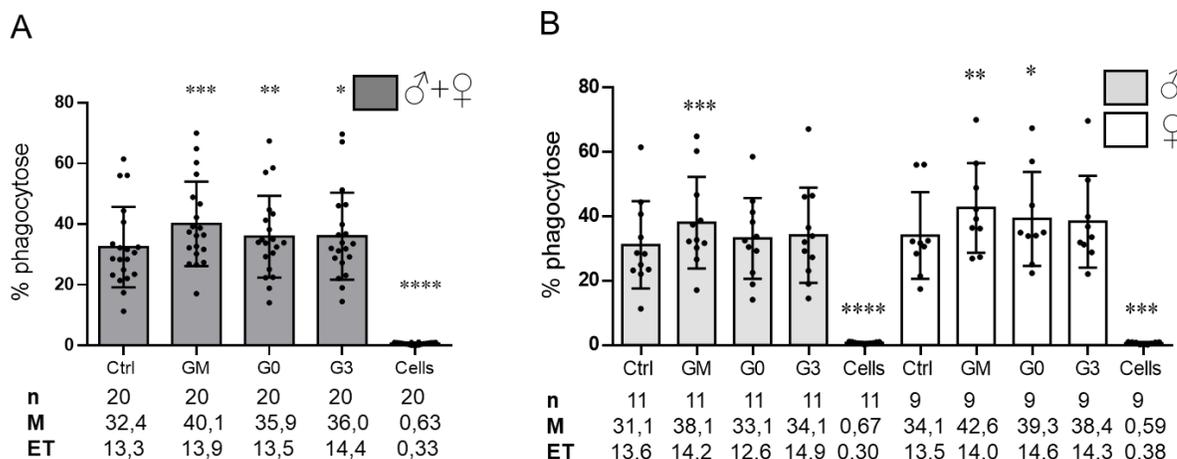


IRSSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Les NT (partie gauche) ou EO (partie droite) ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), la cytokine GM-CSF (GM), ou les cinq types de nanoparticules (NP) indiqués à 100 µg/mL pour une période de 30 minutes. La capacité à exercer la phagocytose de bactéries *E.coli* a été déterminée comme détaillée dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B et C) du sexe. n, nombre de donneurs ; M, moyenne géométrique ; ET, écart-type, Cells, cellules seules (témoin négatif). Chaque point représente une expérience effectuée avec un(e) donneur(euse).

L'exemple des résultats obtenus dans la figure 4 illustre bien que certaines NP n'agissent pas de la même façon sur la biologie des NT et des EO. En effet, alors que les NP de TiO₂, ZnO, CeO₂, Pt et Pd n'affectent pas le taux basal de phagocytose des NT envers des bactéries *E. coli* (panneaux à la gauche), ces mêmes NP inhibent celui des EO (panneaux à la droite). Toutefois, aucun effet ici ne semble être lié au sexe en ce qui concerne ces NP, mais le témoin positif GM-CSF augmente significativement la phagocytose des EO de femmes. Ceci n'a pas été observé avec les NT alors que le GM-CSF augmentait légèrement, mais non significativement, la phagocytose de façon similaire autant chez les hommes que chez les femmes, séparément ou non. La figure 5 montre plutôt des NP, G0 et G3, qui augmentent significativement la capacité des EO à exercer la phagocytose en ne tenant pas compte du sexe (figure 5A). Toutefois, en séparant les données entre mâles et femelles, seulement G0 augmentent significativement la phagocytose, et ce, uniquement chez les femelles (figure 5B). Notons cependant que le pourcentage d'augmentation n'est que d'environ 5 % par rapport au groupe témoin.

Figure 5. Les NP G0 augmentent significativement la phagocytose uniquement chez les EO femelles.

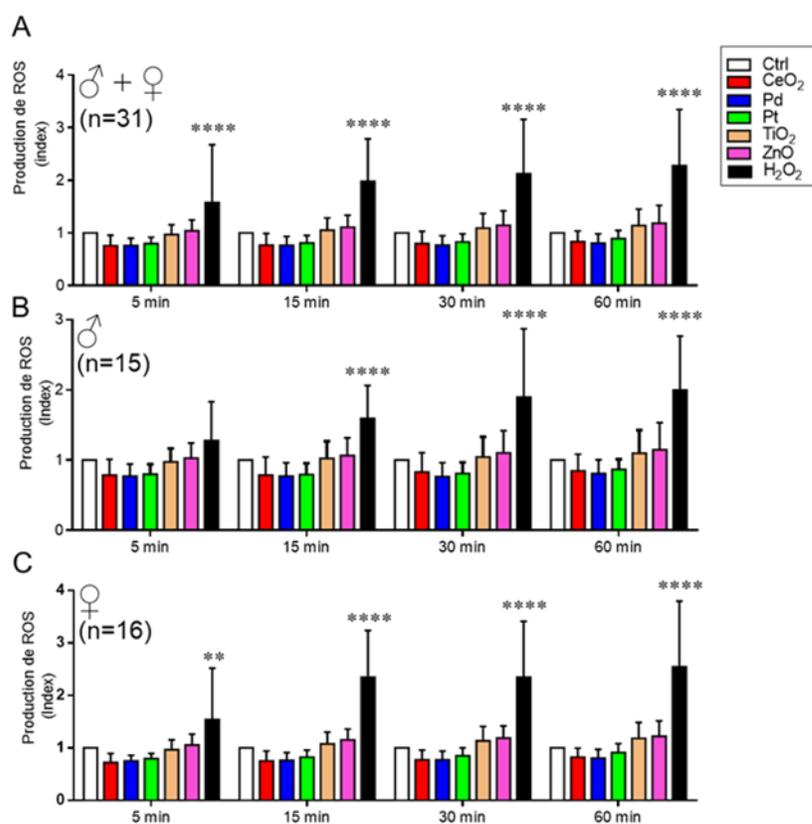


Les éosinophiles (EO) ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), la cytokine GM-CSF (GM), ou les nanoparticules (NP) G0 ou G3 à 100 µg/mL pour une période de 30 minutes. La capacité à exercer

la phagocytose de bactéries *E. coli* a été déterminée comme détaillée dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. n, nombre de donneurs ; M, moyenne géométrique ; ET, écart-type ; Cells, cellules seules (témoin négatif). Chaque point représente une expérience effectuée avec un(e) donneur(euse).

La figure 6 montre l'incapacité des NP à induire la production de ROS par les NT. En effet, dans cet exemple, les NP de CeO₂, Pd, Pt, TiO₂ et ZnO n'ont pas augmenté la production de ROS après, 5, 15, 30 et même 60 minutes de traitement, alors que le témoin positif (H₂O₂) a augmenté la production pour toutes les périodes étudiées.

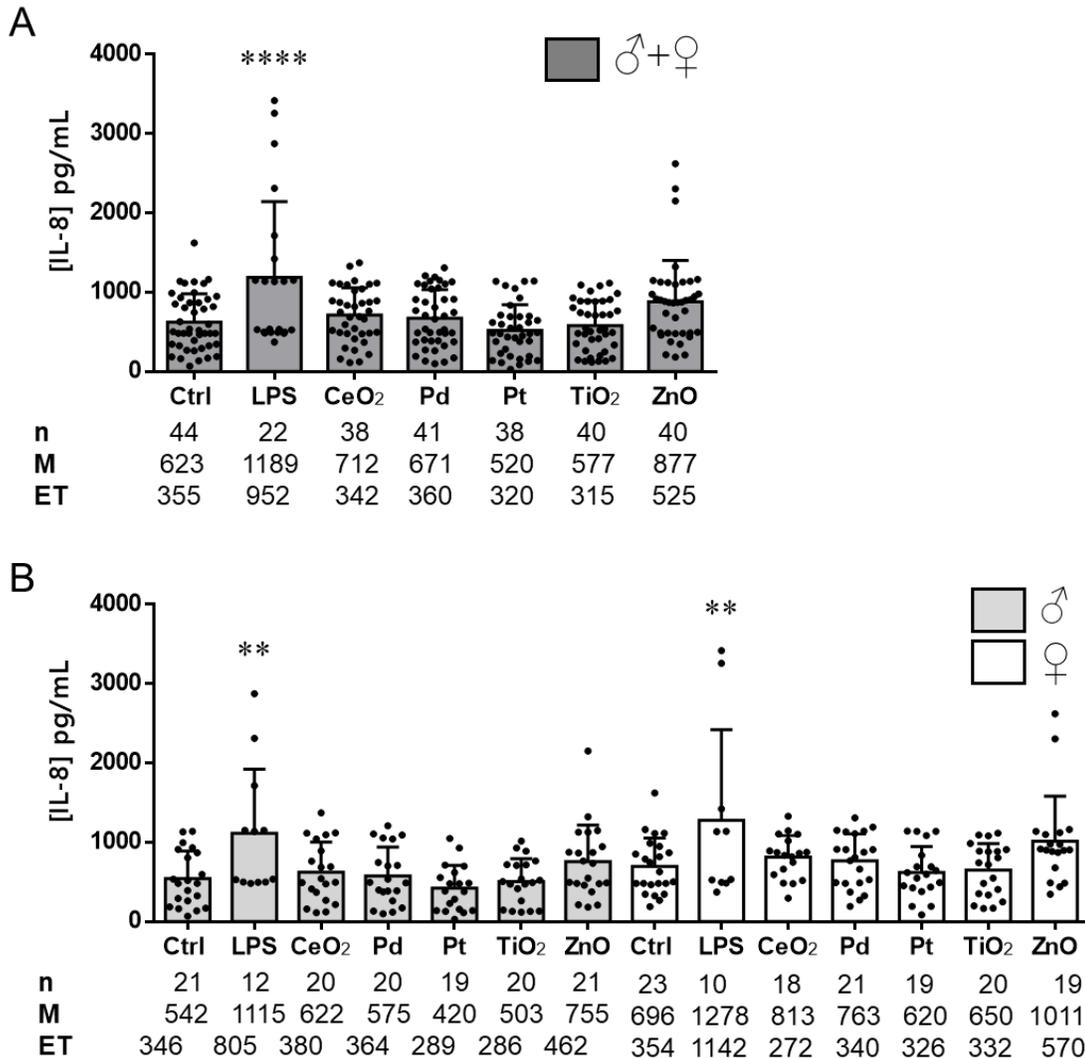
Figure 6. Incapacité des nanoparticules à induire la production de ROS par les neutrophiles.



Les neutrophiles (NT) ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), le H₂O₂ ou les cinq types de nanoparticules indiqués à 100 µg/mL pour les périodes de 5-60 minutes (min). La production de ROS a été déterminée à l'aide de la sonde CM-H₂DCFDA comme détaillée dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B et C) du sexe. Le nombre de donneurs (euses) n est indiqué entre parenthèses, Mean, moyenne géométrique, SD, écart-type.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Figure 7. La production de l'interleukine-8 par les neutrophiles traités avec les nanoparticules de CeO₂, Pd, Pt, TiO₂ et ZnO.



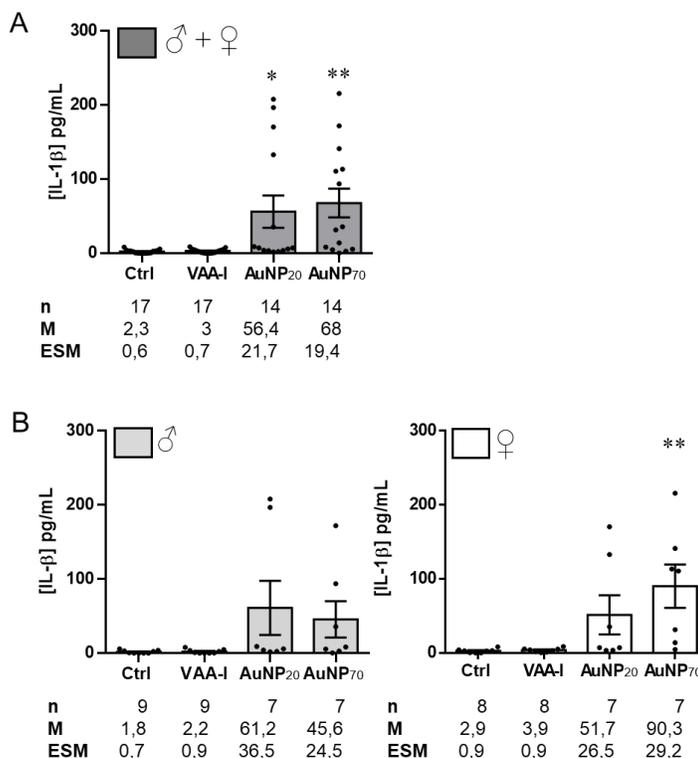
Les NT ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), le LPS ou les cinq types de NP indiqués à 100 µg/mL pour une période de 24h. La production d'IL-8 a été déterminée à l'aide d'une trousse ELISA comme détaillée dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. Le nombre de donneurs (euses) n est indiqué entre parenthèses ; M, moyenne géométrique ; ET, écart-type.

La figure 7 montre que plusieurs NP, en l'occurrence les NP de CeO₂, Pd et ZnO, provoquent une légère augmentation non significative de la production de la cytokine IL-8 des NT après 24 heures de traitement *in vitro*. À l'inverse, les NP de Pt et de TiO₂ diminuent la production basale d'IL-8, mais non significativement.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Ces résultats s'observent autant en prenant l'ensemble des données obtenues avec les NT mâles et les NT femelles (figure 7A) que séparément en ne considérant que les NT mâles et les NT femelles (figure 7B). Comme prévu, le témoin positif LPS augmente significativement la production d'IL-8. En faisant une analyse en tenant compte du sexe, il est clair que cette production d'IL-8 s'observe autant avec les NT mâles ou femelles.

Figure 8. La production de l'interleukine-1 β par les éosinophiles traités avec les nanoparticules (NP) d'or.

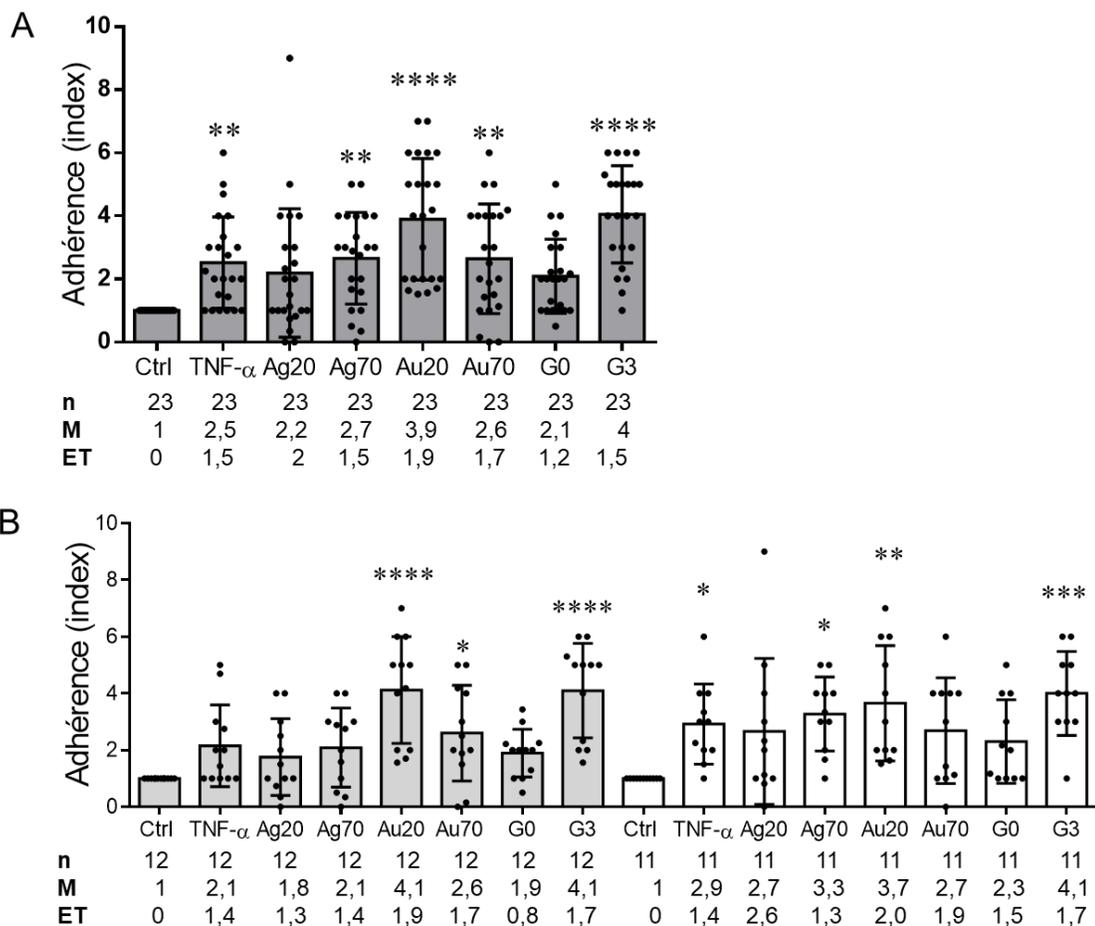


Les éosinophiles ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), la VAA-I, ou les AuNP₂₀ et AuNP₇₀ à 100 µg/mL pour une période de 24h. La production de l'IL-1 β a été déterminée à l'aide d'une trousse ELISA comme détaillée dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. Le nombre de donneurs (euses) n est indiqué entre parenthèses ; M, moyenne géométrique ; ESM, erreur standard de la moyenne.

Les résultats de la figure 8A montrent que les AuNP₂₀ et AuNP₇₀ augmentent significativement la production de l'IL-1 β par les EO sans tenir compte du sexe. Toutefois, en analysant les données séparément selon le sexe des donneurs(euses), les AuNP₇₀ augmentent significativement la production de cette cytokine uniquement chez les EO femelles.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Figure 9. Capacité des nanoparticules à augmenter l'adhérence des neutrophiles sur des cellules endothéliales.

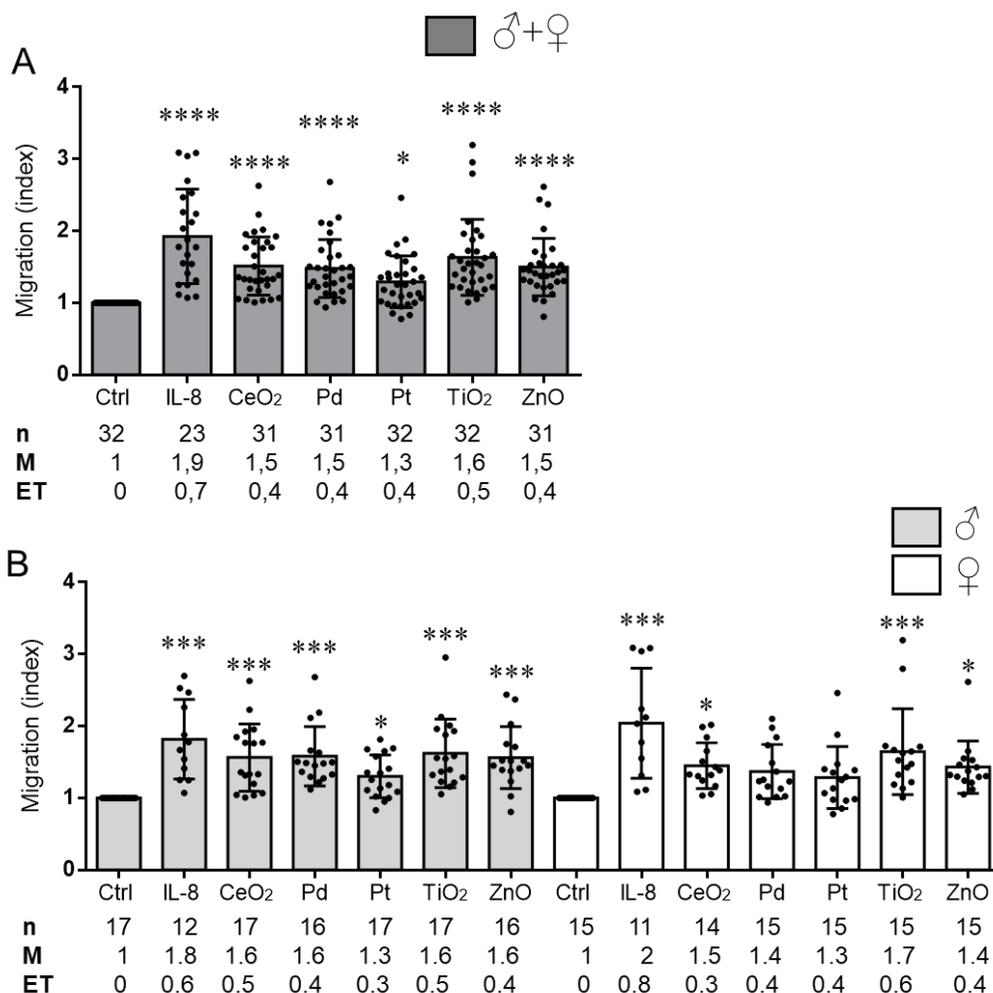


Les neutrophiles ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (δ) ou femelles (f) et ont été incubés avec du tampon (Ctrl), le TNF- α , ou les nanoparticules indiquées à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour une période de 30 minutes. Elles ont ensuite été traitées avec la calcéine-AM pour 30 minutes avant d'être déposées sur un tapis cellulaire composé des cellules endothéliales EA.hy926 pour 30 minutes avant d'être dénombrées comme détaillé dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. Le nombre de donneurs (euses) n est indiqué entre parenthèses ; M, moyenne géométrique ; ET, écart-type.

La figure 9 illustre les données obtenues pour le test d'adhérence des NT traités ou non avec les NP AgNP₂₀, AgNP₇₀, AuNP₂₀, AuNP₇₀, G0 et G3. En ne tenant pas compte du sexe, il est clair que toutes les NP testées sauf AgNP₂₀ et G0 sont capables d'augmenter significativement la capacité d'adhérence des NT sur les cellules endothéliales (figure 9A). En analysant les résultats séparément en tenant compte du sexe, les AgNP₇₀ augmentent significativement l'adhérence des NT femelles alors que l'augmentation observée chez les NT mâles n'est pas statistiquement significative. Alors que les AuNP₂₀

agissent indépendamment du sexe, les AuNP₇₀ augmentent l'adhérence des NT autant chez les mâles que chez les femelles et bien que les résultats soient très semblables, une différence significative n'est observée que chez les NT mâles. En ce qui concerne les dendrimères G3, leur capacité à augmenter significativement l'adhérence des NT s'observe autant chez les mâles que chez les femelles. Fait intéressant, le témoin positif TNF- α agit davantage sur les NT femelles.

Figure 10. Capacité des nanoparticules (NP) à augmenter la migration des neutrophiles (NT) : les NP de Pt et Pd affectent davantage les NT mâles que femelles.



Les neutrophiles (NT) ont été fraîchement isolés à partir du sang de donneurs(euses) mâles (♂) ou femelles (♀) et ont été déposés dans la chambre supérieure pour une période de 30 minutes alors que la chambre inférieure contenait du tampon, de l'IL-8 (témoin positif) ou les nanoparticules indiquées à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour une période de 30 minutes. Ensuite, le montage est défait et la membrane est récupérée, colorée puis montée sur une lame de microscope pour le dénombrement des cellules adhérentes comme détaillé dans la section Méthodologie. Les données ont été traitées

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

sans tenir compte (A) ou en tenant compte (B) du sexe. Le nombre de donneurs (euses) n'est indiqué entre parenthèses ; M, moyenne géométrique, ET, écart-type.

La capacité des NP de CeO₂, Pd, Pt, TiO₂ et ZnO à augmenter la migration des NT a été déterminée (figure 10). En prenant toutes les données obtenues autant avec les NT mâles que les NT femelles, toutes les NP augmentent significativement la migration des NT sur les cellules endothéliales (figure 10A). Toutefois, les NP de Pd et Pt augmentent significativement la migration des NT mâles, mais pas des NT femelles, bien que les résultats en index soient très similaires (figure 10B).

5. DISCUSSION

Il est de plus en plus documenté que les NP peuvent altérer le système immunitaire à plusieurs niveaux et qu'elles possèdent des propriétés inflammatoires *in vitro* et *in vivo*, un domaine de recherche dynamique et relativement nouveau (Boraschi *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2015 ; Larsen *et al.*, 2010 ; Pallardy *et al.*, 2017 ; Pujari-Palmer *et al.*, 2016). Certaines études ont démontré que les NP pouvaient spécifiquement altérer la biologie des NT et des EO (Babin *et al.*, 2013 ; Chhay *et al.*, 2018 ; Couto *et al.*, 2014 ; Durocher *et al.*, 2017 ; Goncalves *et al.*, 2010 ; Goncalves et Girard, 2014 ; Kang *et al.*, 2021 ; Lu *et al.*, 2020 ; Murphy-Marion et Girard, 2018 ; Silva et Girard, 2016 ; Snoderly *et al.*, 2022). Cependant, aucune analyse des données n'a été effectuée en tenant compte du sexe et, rappelons que la présente étude vise justement à initier de telles analyses dans le domaine et à combler une telle lacune.

Le principal objectif de cette étude était de déterminer si des NP auxquelles plusieurs travailleurs pouvant être exposés directement ou non peuvent altérer différemment la biologie des NT et/ou EO humains en tenant compte du sexe. Ainsi, les données ont été analysées en considérant si les échantillons sanguins utilisés pour l'isolement des cellules provenaient de donneurs mâles ou femelles. Des comparaisons ont ainsi été faites en testant les effets des NP sur les fonctions d'apoptose, de production de ROS et cytokines, de phagocytose, d'adhérence et de migration, toutes des fonctions reliées à la réponse inflammatoire. Une telle approche permet de contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine de recherche très peu documenté. En effet, la vaste majorité des études rapportées dans la littérature scientifique ne tiennent pas compte du sexe dans les différentes expériences effectuées en laboratoire. Ceci est encore plus véridique en ce qui concerne les études effectuées avec des NP qui ont plus récemment attiré l'attention des scientifiques. Notons que dans les modèles d'exposition aux NP où l'analyse des résultats est effectuée en tenant compte du sexe, il s'agit principalement d'expériences effectuées avec des animaux de laboratoire, bien souvent des rongeurs, dans lesquelles les résultats obtenus (accumulation de NP dans les organes, intensité de l'inflammation, etc.) sont comparés entre les mâles et les femelles (Kim *et al.*, 2009 ; Ray *et al.*, 2020 ; Shvedova *et al.*, 2016). *In vitro*, très peu d'études portant sur les interactions directes NP-cellules primaires tiennent compte du sexe dans les analyses. Il est bon de mentionner que la présente étude se démarque de la plupart des autres, car, ici, des cellules primaires humaines ont été utilisées pour effectuer les expériences plutôt que des lignées cellulaires transformées bien souvent d'origine non humaine. En plus, la présente étude cadre parfaitement avec la volonté grandissante à réduire le nombre d'animaux voire à cesser le recours à l'expérimentation animale en recherche et, plus précisément, elle répond à la nécessité de mener des études *in vitro* avec les nanomatériaux (Arora *et al.*, 2012).

Comme le montre le tableau 3, qui illustre la synthèse des résultats obtenus avec les NT et EO humains mâles et femelles, certaines NP agissent différemment sur la biologie de ces cellules selon le sexe. Toutefois, d'entrée de jeu, mentionnons qu'il n'existe pas de dichotomie claire et nette pour ce qui est des effets différentiels des NP selon le sexe. Il s'agit plutôt d'effets nuancés où les valeurs varient de légèrement à modérément entre les NT et/ou EO mâles et femelles. En effet, aucune NP ne va par exemple retarder l'apoptose des NT chez les hommes et à l'inverse l'induire ou l'accélérer chez les femmes pour un type cellulaire particulier. Plutôt, une NP donnée va causer un retard de l'apoptose autant chez les NT mâles que chez les NT femelles, mais à des degrés légèrement différents selon le taux basal observé dans les deux sexes. Rappelons que les NT et EO sont bien connus pour se diriger spontanément en apoptose et que ce phénomène est primordial pour que le nombre de cellules demeure relativement constant pour le maintien de l'homéostasie (Daigle et Simon, 2001 ; Geering et Simon, 2011 ; Ilmarinen *et al.*, 2014). En lien avec ces observations, une rare étude rapporte des taux d'apoptose de base significativement différents entre des NT humains mâles et femelles où celui des mâles avoisine les 35 % contre 25 % chez les NT femelles (Molloy *et al.*, 2003). Pour établir cette différence, les auteurs ont utilisé 26 donneurs et 26 donneuses âgé(e)s de 26-33 ans en utilisant des conditions expérimentales (ainsi que la façon de déterminer le taux d'apoptose) différentes de celles utilisées dans le présent rapport. Pour l'une d'elles, et probablement la plus importante, les cellules étaient incubées en présence de 10 % de sérum de veau fœtal pour tous les donneurs utilisés alors que pour la présente étude une attention particulière a été apportée pour plutôt incuber les cellules en présence de 10 % de sérum autologue, une situation étant plus représentative de la réalité. Les auteurs ont rapporté en parallèle que les hormones estradiol (E2) et la progestérone retardaient davantage le taux d'apoptose spontané des NT de femmes comparativement aux NT mâles. Étonnamment, bien que les auteurs aient rapporté différents taux d'apoptose entre les sexes, des variations assez importantes (écarts-types de 15-20 %) s'observaient dans leurs résultats en dépit que du sérum de veau fœtal fût utilisé suggérant une variabilité dans la façon de dénombrer l'apoptose. Dans la présente étude, la variabilité peut justement s'expliquer par le fait que du sérum autologue connu pour être riche en divers protéines et facteurs incluant des hormones ait été volontairement utilisé. De plus, connaissant le phénomène de corona qui apparaît lorsque les NP sont en présence de sérum humain (Ahsan *et al.*, 2018 ; Ge *et al.*, 2015), cela respecte davantage les interactions NP-cellules sanguines pouvant avoir lieu *in vivo* après exposition aux NP en milieux de travail.

Ici, bien que l'objectif soit plutôt de déterminer si une NP peut avoir des effets différents sur le taux d'apoptose des NT et/ou EO mâles et femelles, il est possible de relever parallèlement qu'aucune différence significative n'est observée entre les taux de base d'apoptose des NT et EO mâles et femelles. Collectivement, ces observations expliquent, du moins en partie, les différences subtiles observées en réponse aux NP et poussent à poursuivre dans le futur des analyses en tenant compte du sexe. Une telle mesure ne fera que mieux documenter cet aspect de la recherche encore trop ignoré. En particulier, ceci

pourrait être important dans au moins deux situations : 1) il existe encore des métiers dont les travailleurs pouvant être exposés aux NP sont surreprésentés par un sexe ou l'autre (par exemple soudure chez les hommes, coiffure et esthétique chez les femmes) ; et 2) il y a une volonté croissante vers une médecine de plus en plus personnalisée, incluant l'utilisation de médicaments à base de NP. Connaissant l'existence d'un dimorphisme sexuel concernant le système immunitaire humain, il est important d'étudier les effets des NP sur des cellules, comme les NT et EO importantes en inflammation, en tenant compte du sexe.

Les résultats concernant la régulation du taux d'apoptose par les NP chez les NT et EO obtenus dans la présente étude (figure 3), concordent bien avec ceux préalablement obtenus en n'utilisant qu'un nombre restreint de donneurs(euses), sans tenir compte du sexe. En effet, par exemple, il a déjà été rapporté que les NP de TiO₂ (Goncalves *et al.*, 2010) et ZnO (Goncalves et Girard, 2014) retardent l'apoptose des NT de façon concentration-dépendante. Pour ce faire, de 3-5 expériences avaient été effectuées, ce qui est assez commun dans les recherches effectuées dans le domaine avec d'autres agents, incluant des cytokines, des lectines, diverses drogues, etc. Dans la présente étude, il a été confirmé que les NP de TiO₂ et ZnO agissent comme agents anti-apoptotiques en effectuant 42 expériences différentes pour TiO₂ et 39 pour ZnO. Toutefois, tel que mentionné auparavant, en faisant une analyse en tenant compte du sexe, il s'avère que les NP de TiO₂ affectent davantage les NT femelles alors que celles de ZnO agissent de façon très similaire chez les NT mâles et femelles. Ainsi, pour des études effectuées avec peu d'échantillons sanguins différents, les chances seraient plus grandes d'observer un effet anti-apoptotique des NP de TiO₂ si ceux-ci proviennent plutôt de femelles, alors que ceci ne s'appliquerait pas pour ZnO. Il est frappant de constater que la plupart des NP testées dans cette étude retardent l'apoptose des NT ou sont sans effet notable, sauf les AgNP₂₀ et les dendrimères G3 (et G0 à moindre degré) qui l'accélèrent chez les NT. Notons qu'une inhibition de l'apoptose des NT (et EO) n'est pas, en général, une situation souhaitable pour un organisme. En effet, un retard d'apoptose peut mener à un surplus de cellules et engendrer de l'inflammation. Ainsi, des travailleurs exposés aux NP ayant des propriétés anti-apoptotiques, pourraient développer des désordres inflammatoires alors que les cellules normalement éliminées lors de la résolution d'une inflammation aiguë, perdureraient plutôt et favoriserait le passage d'une inflammation aiguë à chronique. De plus, sachant que certaines NP agissent indépendamment du sexe, alors que d'autres ont plutôt un effet chez les NT mâles ou d'autres chez les NT femelles, cela pourrait s'appliquer à n'importe quel métier avec prédominance ou non d'un sexe ou l'autre. En général, les mêmes observations s'appliquent également aux EO, sauf pour les dendrimères G3. En effet, ces NP accélèrent clairement l'apoptose de façon significative, mais indépendamment du sexe. Tout comme le fait qu'un retard d'apoptose n'est pas souhaitable, une accélération n'est pas non plus avantageuse pour un organisme. Dans ce cas, cela peut mener à une diminution importante du nombre de NT (neutropénie) et/ou EO (éosinopénie), augmentant ainsi le risque aux infections.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

Il est bon de mentionner qu'en plus de ne pas observer de différence en ce qui concerne le taux apoptotique de base autant chez les NT que chez les EO mâles et femelles, les résultats démontrent qu'aucune différence liée au sexe ne soit en plus observée avec le témoin proapoptotique (VAA-I) et le témoin anti-apoptotique (GM-CSF) utilisés dans cette étude. Contrairement aux NP dont le mode d'action est encore méconnu, la lectine de plante VAA-I et la cytokine GM-CSF sont toutes deux bien connues pour activer une cellule en s'y liant sur un récepteur membranaire bien spécifique. Nous ne pouvons pas en dire autant en ce qui concerne les NP. Toutefois, comme mentionné précédemment, lorsque du sérum est ajouté dans les cultures de cellules traitées avec des NP, le phénomène de corona pourrait engendrer une certaine reconnaissance des NP par un récepteur normalement dirigé plutôt contre une certaine protéine spécifique ou encore agir comme un signal de danger reconnu par plusieurs types de récepteurs (Cronin *et al.*, 2020 ; Fadeel, 2012 ; Shirasuna *et al.*, 2019). Il s'agit d'un domaine en pleine expansion qui pourra certes éventuellement fournir des éléments de compréhension sur les interactions entre les NP et les cellules.

Contrairement aux mêmes conclusions obtenues en utilisant peu ou beaucoup d'échantillons sanguins différents pour observer l'effet anti-apoptotique des NP de TiO₂ chez les NT, ces mêmes NP n'ont pas ici augmenté significativement la production d'IL-8 en utilisant près de 40 échantillons différents, alors que dans le passé, la production de l'IL-8 était clairement augmentée par les NP de TiO₂ et ce, en utilisant peu d'échantillons différents (Goncalves *et al.*, 2010). Il est difficile de bien cerner ce qui peut causer cette différence. Toutefois, les NT étaient incubés en présence de sérum de veau fœtal et les NP de TiO₂ étaient sous la forme dite anatase alors que dans la présente étude, du sérum autologue et la forme rutille de TiO₂ ont été utilisés. Ceci n'est pas sans précédent puisqu'une étude a rapporté différents effets biologiques des NP de TiO₂ selon la forme de cristaux utilisées. En effet, la forme rutille activait davantage les neutrophiles que la forme anatase dans un modèle inflammatoire *in vivo* (Vandebriel *et al.*, 2018). Il serait intéressant d'effectuer ultérieurement d'autres expériences afin d'expliquer les différences observées ici. Ceci reste à déterminer.

Bien que la plupart des NP testées dans cette étude n'augmentent pas la production des cytokines étudiées, certaines exceptions peuvent être relevées. Une différence majeure est observable avec les AuNP₂₀ et AuNP₇₀ en ce qui concerne la production d'IL-1 β comme mentionnée auparavant dans la section résultats. En effet, alors que ces deux NP augmentent clairement la production de cette cytokine par les EO, aucun effet n'est observé chez les NT. De plus, alors que les AuNP₂₀ agissent de façon sexe-indépendante pour les EO, les AuNP₇₀ augmentent significativement la production d'IL-1 β seulement chez les EO femelles. Ceci indique qu'une NP peut agir différemment chez les NT et chez les EO et, en plus, selon un certain dimorphisme sexuel. Il serait intéressant de comprendre comment une NP comme l'AuNP₇₀ pourrait agir de la sorte comme de tenter de déterminer si cela est relié à la formation d'une corona différente.

Les résultats obtenus en ce qui concerne la capacité à exercer la phagocytose sont d'un intérêt particulier. Alors que la plupart des NP testées n'altèrent pas vraiment le taux basal de phagocytose des NT, plusieurs le diminuent significativement pour les EO. Une diminution de la phagocytose peut mener à des risques d'infections. Ainsi, comme cette fonction semble être de façon générale plus altérée pour les EO issus de sang de femme que pour ceux extraits de sang d'homme, les risques d'infection pourraient donc être plus importants chez les femmes que chez les hommes. Bien que les EO soient principalement connus pour combattre des vers parasites, ils sont aussi capables de phagocyter certains types de bactéries comme *Escherichia coli*, *Mycobacterium* et *Staphylococcus aureus* (Castro *et al.*, 1991 ; Hatano *et al.*, 2009). Ainsi, une exposition des travailleurs à l'une ou l'autre des NP testées ici qui diminue le taux basal de phagocytose des EO (et d'autres qui pourraient diminuer la capacité phagocytaire des NT) n'est probablement pas souhaitable et pourrait provoquer des infections pouvant ultimement participer à une augmentation du taux d'absentéisme chez certains travailleurs. Il serait intéressant d'étudier cette possibilité dans le futur, par exemple en faisant des études épidémiologiques visant à tenter de faire un lien entre une exposition des travailleurs aux NP et un taux d'absentéisme reliés ou non à des infections.

Bien que plusieurs NP soient connues pour induire une production de ROS chez certains types de cellules, l'effet direct des NP sur une augmentation de ROS n'est pas bien documenté chez les NT et EO. Ici, aucune des NP testées ne possède la capacité à augmenter la production de ROS et ce quelle que soit l'analyse, dépendante ou non de la variable sexe, réalisée. Ceci corrobore bien avec l'incapacité à accélérer l'apoptose. En général, la plupart des NP étudiées possèdent plutôt un effet anti-apoptotique ou sont sans effet notable. Dans la majeure partie des cas, une production de ROS chez les NT (et EO) provoque l'apoptose des cellules (Arruda et Barja-Fidalgo, 2009 ; Pérez-Figueroa *et al.*, 2021). Il est important de mentionner que seulement les effets directs des NP sur les NT et EO ont été analysés. Il serait intéressant éventuellement de déterminer si ces NP, ou d'autres peuvent altérer la production de ROS à la hausse ou à la baisse chez des cellules prétraitées ou traitées simultanément avec un agent inducteur de ROS (PMA, fMLP, etc.). Une équipe a confirmé l'incapacité des NP de TiO₂ à induire une production de ROS chez les NT humains, observée ici, mais qu'elles pouvaient cependant amplifier la production de ROS induite par un autre agent, en l'occurrence l'acide arachidonique (Masoud *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant de déterminer ultérieurement si les NP testées dans la présente étude, et d'autres, pourraient amplifier la production de ROS activée par d'autres agents inducteurs. Bref, chez des cellules déjà activées, une situation commune durant l'inflammation.

La plupart des NP testées dans cette étude possèdent la capacité d'augmenter l'adhérence et la migration des NT et/ou EO à divers degrés. Bien que l'objectif premier de cette étude ne soit pas de tenter d'expliquer quel serait le mode d'action de chacune des NP pour chacune des fonctions étudiées, il est plausible d'imaginer que les NP puissent augmenter l'adhérence des granulocytes (NT et EO) en exerçant un rôle sur

l'expression de certaines molécules de surface impliquée durant l'adhérence cellulaire. La littérature dans ce domaine est passablement anémique. Toutefois, une étude a déjà rapporté que les NP de TiO₂ augmentaient l'adhérence des EO sur les cellules endothéliales sans que l'expression des molécules d'adhésion cellulaire nommées *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, ICAM-3, CD11a, CD11b, CD18, CD29, CD49d et CD62L ne soient surexprimées (Murphy-Marion et Girard, 2018). En revanche, dans cette même étude, la capacité des NP de TiO₂ à augmenter l'adhérence des EO était en partie, attribuable à l'activation d'une voie signalétique intracellulaire, la voie *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K/AKT). Une autre étude démontre clairement que les microfilaments d'actine sont impliqués dans l'adhésion des EO activés avec des NP de Pd (Chhay *et al.*, 2018). Il est donc difficile de comprendre comment une NP donnée peut augmenter l'adhérence des granulocytes sur des cellules endothéliales. Plusieurs études restent donc à être effectuées dans ce domaine afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhérence cellulaire induite par des NP.

Rappelons que divers scénarios ont été observés ici en étudiant par exemple les effets des NP sur l'adhésion des NT. AgNP₇₀, AuNP₂₀, AuNP₇₀, Pt et G3 augmentent significativement l'adhérence sans tenir compte du sexe. Alors que AuNP₂₀ et G3 agissent sensiblement de la même façon chez les NT mâles et femelles, la capacité de AgNP₇₀ et Pt pour augmenter l'adhérence est attribué aux NT femelles. À l'inverse, les AuNP₇₀ agissent plutôt sur les NT mâles. Collectivement, les résultats montrent que la plupart des NP sont capables d'augmenter l'adhérence à divers degrés et que cette capacité est plus souvent élevée chez les NT et EO femelles. Ceci corrobore bien avec l'unique étude rapportant que le cadmium et le nickel (sous formes non nanoparticulaires cependant) augmentent davantage l'adhérence des NT femelles (Macia et Hernandez, 1995).

La façon dont les NP peuvent augmenter la migration des NT et EO est nébuleuse et comme pour d'autres fonctions comme l'adhérence, la littérature n'est pas très abondante dans ce domaine. Néanmoins, une étude effectuée avec des NP d'or et d'argent révèle que ces NP diminuent la migration. Toutefois, les cellules étudiées étaient des fibroblastes plutôt que des granulocytes comme les NT et EO et les concentrations de NP utilisées étaient moindres que celle qui a été utilisée (100 µg/mL) dans la présente étude (Vieira *et al.*, 2017). Il est bon de mentionner que bien que les NP d'or étudiées diminuaient la migration des fibroblastes, cette inhibition s'estompait de plus en plus que la concentration de NP augmentait (0.1, 1 et 10 µg/mL). De plus, à la plus forte concentration étudiée, le niveau basal de migration était pratiquement atteint. La concentration de 100 µg/ml n'ayant pas été testée, nous ne pouvons pas savoir si la migration aurait plutôt été augmentée, comme observée dans la présente étude. Une équipe de recherche a publié un chapitre décrivant une technique (très similaire à celle utilisée ici), pour déterminer le rôle direct des NP sur la migration des neutrophiles (Skoczen *et al.*, 2011). Malheureusement, aucune mention n'est faite sur les résultats obtenus ni sur les types de NP utilisés. Notons cependant que la présente étude n'est pas la première à rapporter la capacité de certaines NP à augmenter la migration des granulocytes. En effet, il a été

démontré que des NP d'or de 10 nm chargées soient positivement ou négativement augmentaient la migration des NT humains (Durocher *et al.*, 2017). Toutefois, un petit nombre d'échantillons sanguins a été utilisé et aucune analyse n'a été effectuée en tenant compte du sexe.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

CONCLUSION

La présente étude avait comme objectif principal de déterminer si les propriétés inflammatoires des NP peuvent différer selon le sexe en regard de la physiologie cellulaire des NT et EO humains. L'ensemble des données et des observations relevées permettent de répondre par l'affirmative. Toutefois, rappelons qu'il n'y a pas de différence majeure allant à l'opposée l'une de l'autre, c.-à-d. une NP ne va pas activer une réponse chez les NT et/ou EO mâles et l'inhiber ou la renverser chez les NT et/ou EO femelles. En général, lorsqu'une NP augmente ou diminue une fonction ou une réponse donnée, une analyse des résultats tenant compte du sexe des donneurs(euses) révèle que ce sont préférentiellement les cellules obtenues d'échantillons sanguins féminins qui sont davantage affectées. Ainsi, bien que cela soit au niveau cellulaire plutôt qu'un organisme entier, les NP semblent agir plus intensément sur les cellules du sexe féminin. Cela corrobore bien avec le dimorphisme sexuel observé pour le système immunitaire humain où les femmes possèdent en général une réponse immunologique plus intense. De plus, une différence liée au sexe a déjà été relevée en ce qui concerne la capacité à ingérer davantage de NP par des cellules souches amniotiques humaines femelles (Serpooshan *et al.*, 2018). Toutefois, les auteurs de cette étude n'ont pas observé cela en parallèle en utilisant plutôt des fibroblastes isolés des glandes salivaires révélant la complexité à étudier les effets et modes d'action des NP. Cela étant dit, rappelons que les résultats obtenus sont parmi les tout premiers relevant certaines différences physiologiques entre des cellules primaires sanguines, en l'occurrence des NT et EO, causées par des NP. Il reste certainement beaucoup de travail à faire dans ce domaine. En particulier, plusieurs autres types de NP pourraient être étudiés comme des nanotubes de carbone, des fullerènes, des puits quantiques, pour ne nommer que celles-là, afin de déterminer si une classe précise de NP peut agir d'une façon plus évidente chez des cellules d'un sexe ou l'autre. Notons cependant qu'il est présentement difficile de faire des liens entre les effets des NP sur la biologie d'une cellule ou sur un organisme vivant (rongeur, humain, etc.) et une caractéristique précise liée à la NP. Par exemple, en plus de la taille, la forme, la charge, l'agent utilisé (ou non) pour l'enrober, notons que d'autres variables inévitables sont impliquées, incluant par exemple la concentration utilisée, le milieu dans lequel elle se retrouve, le phénomène de la corona, etc. En plus de ces observations expliquant la complexité à étudier les propriétés biologiques des NP, il est important d'apporter une certaine mise en garde lorsque vient le temps d'en tirer des conclusions à partir d'une étude ou d'une autre sur les effets des NP. Nous ne pouvons pas nécessairement en faire une généralité. En effet, la plupart des études *in vitro* ont recours à l'utilisation de cellules cancéreuses transformées et immortalisées pour effectuer différentes expériences en laboratoire. Bien que cela puisse permettre d'en tirer certaines conclusions intéressantes, ces cellules sont bien différentes des cellules primaires et ne permettent pas d'effectuer non seulement des expériences permettant de reproduire la variabilité interindividuelle tant observée chez l'humain et encore moins de faire des analyses en tenant compte du sexe. Parmi les résultats obtenus dans la

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

présente étude, l'incapacité des NT et EO à produire des ROS en réponse aux diverses NP testées est un exemple parfait témoignant d'une différence majeure pouvant être observée avec des données obtenues avec des lignées cellulaires et des cellules primaires. En effet, il existe plusieurs études dans la littérature scientifique rapportant que les NP étudiées ici sont capables d'induire la production de ROS par une grande variété de cellules transformées parfois d'origine humaine, mais bien souvent d'origine animale. Par exemple les NP de TiO₂ avec un diamètre de 5, 25 ou 100 nm sous la forme anatase ou de 100 nm sous la forme rutile, à des concentrations de 12.5 à 600 µg/mL, sont toutes capables d'induire la production de ROS chez deux lignées de macrophages murins (Ana-1 et MH-S) (Zhang *et al.*, 2013). Rappelons que les NP de TiO₂ utilisées à 100 µg/mL possèdent un diamètre d'environ 10 nm, sous la forme de cristal rutile, ne provoquent pas une augmentation de ROS chez les NT et EO mesurée avec une technique très semblable à celle utilisée par ces auteurs. Pourtant, les NT sont parmi les cellules connues comme étant les plus grandes productrices de ROS. Notons cependant qu'elles possèdent également des mécanismes antioxydants pouvant s'opérer en parallèle qui sont peut-être défectueux ou inexistant dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Mentionnons également, que plusieurs des NP testées dans la présente étude sont présentées dans la littérature comme étant des inducteurs de l'apoptose, et c'est le cas également des NP de TiO₂ (Baranowska-Wójcik *et al.*, 2020). Il est curieux de constater dans un ouvrage de revue scientifique portant sur les effets des NP de TiO₂ sur la santé humaine, que les NP de TiO₂ soient présentées comme induisant un stress oxydatif et l'apoptose alors que les données ont été obtenues à partir de lignées cellulaires dont la majorité sont d'origine non humaine. D'un autre côté, il faut comprendre que l'utilisation de telles lignées est d'un certain intérêt pour tenter de comprendre par exemple le mode d'action d'une NP donnée. Ces deux études démontrent bien que les conclusions sont bien différentes de celles obtenues ici avec des cellules humaines primaires comme les NT et EO. Étonnamment, mentionnons que des cellules de la lignée cellulaire Raw 264.7, des macrophages de souris, sont présentement utilisées et incluses dans un protocole visant à déterminer si les NP peuvent induire la production de ROS (ISO/TS 19006:2016, <https://www.iso.org/standard/63697.html?browse=tc>). Les résultats de la présente étude suggèrent de valoriser l'utilisation de cellules primaires comme des NT (car plus facile à obtenir en grand nombre comparativement aux EO) pour améliorer et/ou développer de tels protocoles visant à utiliser les NP de façon plus sécuritaire en milieu de travail. De plus, en utilisant un bon nombre d'échantillons sanguins différents, il est possible d'effectuer en parallèle des analyses en tenant compte du sexe, ce qui ne peut pas toujours être le cas avec des lignées cellulaires.

- IRSST** ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

BIBLIOGRAPHIE

- Ahsan, S. M., Rao, C. M. et Ahmad, M. F. (2018). Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. *Adv Exp Med Biol*, 1048, 175-198.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. et Paknikar, K. M. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 236(3), 310-318.
- Arora, S., Rajwade, J. M. et Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258(2), 151-165.
- Arruda, M. A. et Barja-Fidalgo, C. (2009). NADPH oxidase activity: In the crossroad of neutrophil life and death. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 4546-4556.
- Babin, K., Antoine, F., Goncalves, D. M. et Girard, D. (2013). TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett*, 221(1), 57-63.
- Babin, K., Goncalves, D. M. et Girard, D. (2015). Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1850(11), 2276-2282.
- Baranowska-Wójcik, E., Sz wajgier, D., Oleszczuk, P. et Winiarska-Mieczan, A. (2020). Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health-a Review. *Biol Trace Elem Res*, 193(1), 118-129. 10.1007/s12011-019-01706-6
- Boraschi, D., Costantino, L. et Italiani, P. (2012). Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells: nanosafety considerations. *Nanomedicine (Lond)*, 7(1), 121-131.
- Brandenberger, C., Rowley, N. L., Jackson-Humbles, D. N., Zhang, Q., Bramble, L. A., Lewandowski, R. P., . . . Harkema, J. R. (2013). Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol*, 10(1), 26.
- Castro, A. G., Esaguy, N., Macedo, P. M., Aguas, A. P. et Silva, M. T. (1991). Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect Immun*, 59(9), 3009-3014.
- Chen, H., Dorrigan, A., Saad, S., Hare, D. J., Cortie, M. B. et Valenzuela, S. M. (2013). In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. *PLoS One*, 8(2), e58208.
- Chen, H. W., Su, S. F., Chien, C. T., Lin, W. H., Yu, S. L., Chou, C. C., . . . Yang, P. C. (2006). Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb j*, 20(13), 2393-2395.
- Chhay, P., Murphy-Marion, M., Samson, Y. et Girard, D. (2018). Activation of human eosinophils with palladium nanoparticles (Pd NPs): importance of the actin cytoskeleton in Pd NPs-induced cellular adhesion. *Environ Toxicol Pharmacol*, 57, 95-103.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

- Cho, W. S., Duffin, R., Poland, C. A., Duschl, A., Oostingh, G. J., Macnee, W., . . . Donaldson, K. (2012). Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 6(1), 22-35.
- Couto, D., Freitas, M., Vilas-Boas, V., Dias, I., Porto, G., Lopez-Quintela, M. A., . . . Fernandes, E. (2014). Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicol Lett*, 225(1), 57-65.
- Cronin, J. G., Jones, N., Thornton, C. A., Jenkins, G. J. S., Doak, S. H. et Clift, M. J. D. (2020). Nanomaterials and Innate Immunity: A Perspective of the Current Status in Nanosafety. *Chem Res Toxicol*, 33(5), 1061-1073.
- Daigle, I. et Simon, H. U. (2001). Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*, 126(2), 147-156. 10.1159/000049506
- Dong, M. S., Choi, J. Y., Sung, J. H., Kim, J. S., Song, K. S., Ryu, H. R., . . . Yu, I. J. (2013). Gene expression profiling of kidneys from Sprague-Dawley rats following 12-week inhalation exposure to silver nanoparticles. *Toxicol Mech Methods*, 23(6), 437-448.
- Durocher, I. et Girard, D. (2016). In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm Res*, 65(9), 745-755.
- Durocher, I., Noel, C., Lavastre, V. et Girard, D. (2017). Evaluation of the in vitro and in vivo proinflammatory activities of gold (+) and gold (-) nanoparticles. *Inflamm Res*, 66(11), 981-992.
- Endo C.-A., O. C., Dossa N.I., Emond C. (2014). Portrait de la nanotechnologie au Québec dans les milieux industriels et de la recherche universitaire et publique. *IRSST, Préventions des risques chimiques et biologiques, Rapport R-854*, 1-90.
- Fadeel, B. (2012). Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med Wkly*, 142, w13609.
- Ge, C., Tian, J., Zhao, Y., Chen, C., Zhou, R. et Chai, Z. (2015). Towards understanding of nanoparticle-protein corona. *Arch Toxicol*, 89(4), 519-539. 10.1007/s00204-015-1458-0
- Geering, B. et Simon, H. U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*, 18(9), 1457-1469.
- Goncalves, D. M., Chiasson, S. et Girard, D. (2010). Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro*, 24(3), 1002-1008.
- Goncalves, D. M. et Girard, D. (2011). Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol*, 21, 21.
- Goncalves, D. M. et Girard, D. (2014). Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro*, 28(5), 926-931.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

- Hatano, Y., Taniuchi, S., Masuda, M., Tsuji, S., Ito, T., Hasui, M., . . . Kaneko, K. (2009). Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. *Apmis*, 117(2), 115-123.
- Huang, K. L., Lee, Y. H., Chen, H. I., Liao, H. S., Chiang, B. L. et Cheng, T. J. (2015). Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *J Hazard Mater*, 297, 304-312.
- Hussain, S., Vanoirbeek, J. A., Luyts, K., De Vooght, V., Verbeken, E., Thomassen, L. C., . . . Hoet, P. H. (2011). Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J*, 37(2), 299-309.
- Ilmarinen, P., Moilanen, E. et Kankaanranta, H. (2014). Regulation of spontaneous eosinophil apoptosis—a neglected area of importance. *J Cell Death*, 7, 1-9.
- Inoue, K. et Takano, H. (2011). Aggravating impact of nanoparticles on immune-mediated pulmonary inflammation. *ScientificWorldJournal*, 11, 382-390.
- Jaillon, S., Berthenet, K. et Garlanda, C. (2019). Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 56(3), 308-321.
- Kang, H., Seo, J., Yang, E. J. et Choi, I. H. (2021). Silver Nanoparticles Induce Neutrophil Extracellular Traps Via Activation of PAD and Neutrophil Elastase. *Biomolecules*, 11(2).
- Kim, W. Y., Kim, J., Park, J. D., Ryu, H. Y. et Yu, I. J. (2009). Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A*, 72(21-22), 1279-1284.
- Larsen, S. T., Roursgaard, M., Jensen, K. A. et Nielsen, G. D. (2010). Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106(2), 114-117.
- Lavastre, V., Goncalves, D. et Girard, D. (2015). Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules. *IRSST, préventions des risques chimiques et biologiques, Rapport R-886*, 1-48.
- Lefevre, N., Corazza, F., Valsamis, J., Delbaere, A., De Maertelaer, V., Duchateau, J. et Casimir, G. (2019). The Number of X Chromosomes Influences Inflammatory Cytokine Production Following Toll-Like Receptor Stimulation. *Front Immunol*, 10, 1052.
- Lu, Y. J., Wang, Y. H., Sahu, R. S., Chen, J. P., Dash, B. S., Chung, P. J., . . . Hwang, T. L. (2020). Mechanism of Nanoformulated Graphene Oxide-Mediated Human Neutrophil Activation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 12(36), 40141-40152.
- Macia, M. et Hernandez, M. (1995). Modulation of the adherence of human polymorphonuclear leukocytes by cadmium and nickel: sexual differences. *Arch Environ Contam Toxicol*, 29(1), 15-19.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

- Masoud, R., Bizouarn, T., Trepout, S., Wien, F., Baciou, L., Marco, S. et Houée Levin, C. (2015). Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Superoxide Anion Production by Acting on NADPH Oxidase. *PLoS One*, *10*(12), e0144829.
- Mestas, J. et Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, *172*(5), 2731-2738.
- Miller, M. R., Raftis, J. B., Langrish, J. P., McLean, S. G., Samutrtai, P., Connell, S. P., . . . Mills, N. L. (2017). Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano*, *11*(5), 4542-4552.
- Molloy, E. J., O'Neill, A. J., Grantham, J. J., Sheridan-Pereira, M., Fitzpatrick, J. M., Webb, D. W. et Watson, R. W. (2003). Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood*, *102*(7), 2653-2659.
- Murphy-Marion, M. et Girard, D. (2017). Activation des éosinophiles humains par des nanoparticules. *IRSST, Études et recherches, préventions des risques chimiques et biologiques, rapport R-990*, 1-54.
- Murphy-Marion, M. et Girard, D. (2018). Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway. *Immunobiology*, *223*(2), 162-170.
- Noel, C., Simard, J. C. et Girard, D. (2016). Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro*, *31*, 12-22.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. et Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, *113*(7), 823-839.
- Pallardy, M. J., Turbica, I. et Biola-Vidamment, A. (2017). Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials? *Front Immunol*, *8*, 544.
- Pérez-Figueroa, E., Álvarez-Carrasco, P., Ortega, E. et Maldonado-Bernal, C. (2021). Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunol*, *12*, 631821.
- Poirier, M., Simard, J. C., Antoine, F. et Girard, D. (2014). 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*, *34*(4), 404-412.
- Poirier, M., Simard, J. C. et Girard, D. (2015). Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol*, 1-11.
- Pujari-Palmer, S., Chen, S., Rubino, S., Weng, H., Xia, W., Engqvist, H., . . . Ott, M. K. (2016). In vivo and in vitro evaluation of hydroxyapatite nanoparticle morphology on the acute inflammatory response. *Biomaterials*, *90*, 1-11.

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

- Raftis, J. B. et Miller, M. R. (2019). Nanoparticle translocation and multi-organ toxicity: A particularly small problem. *Nano Today*, 26, 8-12.
- Ratthe, C., Pelletier, M., Roberge, C. J. et Girard, D. (2002). Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin Immunol*, 105(2), 169-175.
- Ray, J. L., Fletcher, P., Burmeister, R. et Holian, A. (2020). The role of sex in particle-induced inflammation and injury. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 12(2), e1589.
- Rosas-Hernandez, H., Jimenez-Badillo, S., Martinez-Cuevas, P. P., Gracia-Espino, E., Terrones, H., Terrones, M., . . . Gonzalez, C. (2009). Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett*, 191(2-3), 305-313.
- Rossi, E. M., Pylkkänen, L., Koivisto, A. J., Vippola, M., Jensen, K. A., Miettinen, M., . . . Alenius, H. (2010). Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol Sci*, 113(2), 422-433.
- Sahu, D., Kannan, G. M. et Vijayaraghavan, R. (2014). Size-dependent effect of zinc oxide on toxicity and inflammatory potential of human monocytes. *J Toxicol Environ Health A*, 77(4), 177-191.
- Serpooshan, V., Sheibani, S., Pushparaj, P., Wojcik, M., Jang, A. Y., Santoso, M. R., . . . Mahmoudi, M. (2018). Effect of Cell Sex on Uptake of Nanoparticles: The Overlooked Factor at the Nanobio Interface. *ACS Nano*, 12(3), 2253-2266.
- Shirasuna, K., Karasawa, T. et Takahashi, M. (2019). Exogenous nanoparticles and endogenous crystalline molecules as danger signals for the NLRP3 inflammasomes. *J Cell Physiol*, 234(5), 5436-5450.
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Yanamala, N., Farcas, M. T., Menas, A. L., Williams, A., . . . Kagan, V. E. (2016). Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. *Part Fibre Toxicol*, 13(1), 28.
- Silva, L. R. et Girard, D. (2016). Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and IL-8. *Toxicol Lett*, 259, 11-20.
- Simard, J. C., Simon, M. M., Tessier, P. A. et Girard, D. (2011). Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol*, 186(6), 3622-3631.
- Skoczen, S. L., Potter, T. M. et Dobrovolskaia, M. A. (2011). Method for analysis of nanoparticle effects on cellular chemotaxis. *Methods Mol Biol*, 697, 247-253.
- Snoderly, H. T., Freshwater, K. A., Martinez de la Torre, C., Panchal, D. M., Vito, J. N. et Bennewitz, M. F. (2022). PEGylation of Metal Oxide Nanoparticles Modulates Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Biosensors (Basel)*, 12(2).

IRSST ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?

- Vandebriel, R. J., Vermeulen, J. P., van Engelen, L. B., de Jong, B., Verhagen, L. M., de la Fonteyne-Blankestijn, L. J., . . . de Jong, W. H. (2018). The crystal structure of titanium dioxide nanoparticles influences immune activity in vitro and in vivo. *Part Fibre Toxicol*, 15(1), 9.
- Verdon, R., Gillies, S. L., Brown, D. M., Henry, T., Tran, L., Tyler, C. R., . . . Johnston, H. J. (2021). Neutrophil activation by nanomaterials in vitro: comparing strengths and limitations of primary human cells with those of an immortalized (HL-60) cell line. *Nanotoxicology*, 15(1), 1-20.
- Vieira, L. F. A., Lins, M. P., Viana, I., Dos Santos, J. E., Smaniotto, S. et Reis, M. (2017). Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale Res Lett*, 12(1), 200.
- Zhang, J., Song, W., Guo, J., Zhang, J., Sun, Z., Li, L., . . . Gao, M. (2013). Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages. *Toxicol Ind Health*, 29(6), 523-533.

- IRSST** ■ Étude visant à mieux guider l'évaluation des risques des travailleurs exposés aux nanoparticules (NP): existe-t-il différentes propriétés inflammatoires des NP liées au sexe ?