

Université de Montréal

Biocompatibilité des nanoparticules de chitosane-siRNA in vitro pour la thérapie génique

Par

Elsa-Patricia Rondon-Cavano

Département de pharmacologie et physiologie, Institut de génie biomédical,

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph. D.) - Doctorat en
génie biomédical

Août 2021

© Elsa-Patricia Rondon-Cavano, 2021

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Institut de génie biomédical,

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Biocompatibilité des nanoparticules de chitosane-siRNA in vitro pour la thérapie génique

Présentée par

Elsa-Patricia Rondon-Cavanzo

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Xavier Banquy

Président-rapporteur

Julio César Fernandes

Directeur de recherche

Mohamed Benderdour

Codirecteur

Yves Durocher

Membre du jury

Denis Girard

Examineur externe

Richard Bertrand

Représentant du doyen

Résumé

Le chitosane est un polysaccharide naturel, généralement reconnu pour sa biocompatibilité et biodégradabilité. Sa notoriété se doit non seulement à la diversité de ses applications biomédicales, mais aussi à la disponibilité des groupes fonctionnels qui permettent la modification de ses caractéristiques physicochimiques. Dans le contexte de la thérapie génique, le chitosane est reconnu pour son potentiel en tant que nanovecteur, pour transporter du matériel génique à l'intérieur des cellules. Notre laboratoire a mis au point la synthèse d'un diéthylaminoéthyl-chitosane-polyéthylène glycol-acide folique (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂), qui a déjà démontré sa capacité de transfection *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires et son potentiel thérapeutique en tant que nanoparticule dans un modèle animal d'arthrite. Ces résultats prometteurs ont encouragé la suite de nos recherches. Ainsi, l'évaluation des propriétés cytotoxiques et hémotoxiques de notre chitosane modifié et de ses nanoparticules s'est avérée une étape essentielle pour continuer vers une potentielle application clinique. Étant donné les résultats contradictoires des rapports sur les caractéristiques hémocompatibles de ce polymère, en plus du manque de témoins d'interférence, de l'absence de données sur le niveau de contamination aux endotoxines des formulations et l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux dans la littérature, nous avons employé les lignes directrices de l'ISO, l'ASTM et le NCL pour estimer son profil toxicologique. Dans cette étude, nous avons approfondi les connaissances sur l'hémocompatibilité des nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA dans un cadre contrôlé et informatif. Cette évaluation a montré une faible réponse hémolytique et d'agrégation plaquettaire, et aucun effet sur le système du complément et sur le temps de coagulation du plasma. Également, la mesure du niveau de radicaux libres (ROS et NO) n'a pas décelé une réponse biologique liée au stress oxydatif. Cependant, la viabilité cellulaire et le niveau de libération de la lactate déshydrogénase (LDH) ont révélé une relation en fonction de la concentration, du temps d'exposition et du type cellulaire étudié. Enfin, l'expression de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-4 et l'IL-10 ont été comparables à ceux du témoin négatif, le PBS. Dans cette quête de l'estimation des propriétés biocompatibles de notre chitosane, notre projet s'est dirigé vers l'étude des mécanismes moléculaires. C'est ainsi que nous avons étudié les voies

de signalisation reliées aux récepteurs de surface cellulaire susceptibles de reconnaître le chitosane, notamment le récepteur toll-like 4 (TLR-4) et les récepteurs de lectine de type C (CLR). Nos données révèlent que les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA, à différentes concentrations et à différentes périodes d'incubation, n'activent pas les voies de signalisation des IKK/NF- κ B, MAPKs, AKT et SYK. Ces résultats ont été supportés par l'absence d'une réponse pro-inflammatoire mesurée à partir de l'expression de médiateurs clés comme le TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 et iNOS. Au vu de nos découvertes, nous pouvons déduire le potentiel d'innocuité de notre chitosane modifié (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂), indispensable pour son application dans la thérapie génique. Également, nous suggérerons la possibilité que des récepteurs cellulaires qui n'ont pas encore été identifiés soient impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation du chitosane, ce qui mérite la réalisation d'études plus approfondies.

Mots-clés : Chitosane, nanoparticules, siRNA, biocompatibilité, toxicité, transduction du signal, récepteurs, inflammation, stress oxydatif, thérapie génique.

Abstract

Chitosan is a natural polysaccharide, generally known for its biocompatibility and biodegradability. Its notoriety is due not only to the diversity of its biomedical applications but also to the presence of functional groups in its chain, which allow the modification of its physiochemical properties. In gene therapy applications, chitosan is known for its potential as a nanovector to transport genetic material to cells. Our laboratory has synthesized a modified-chitosan diethylaminoethyl-chitosan-polyethylene glycol-folic acid (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂), which has already shown in vitro transfection efficiency in several cell lines and a therapeutic potential as a nanoparticle in an animal arthritis model. These promising results encouraged further research. Thus, the evaluation of the cytotoxic and hemotoxic properties of our modified chitosan and its nanoparticles became an essential step to continue towards potential clinical applications. Given the existing contradictory outcomes about the hemocompatible characteristics of this polymer, as well as the lack of interference controls, the absence of data on endotoxin levels in nanoformulations and the diversity of the experimental protocols, we used ISO, ASTM and NCL's guidelines to estimate its toxicological profile. In this study, we discovered new information about DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle hemocompatibility, in a controlled and informative framework. This evaluation showed low hemolytic properties, low platelet aggregation capacity with no effect on the complement and coagulation systems. Moreover, detection of free radical levels (ROS and NO) did not show a biological response related to oxidative stress. Nevertheless, cell viability and the levels of lactate dehydrogenase (LDH) release revealed concentration-, incubation time- and cell-dependent outcomes. Regarding cytokine expression, TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10 levels were equivalent to those of the negative control, PBS. In the quest to evaluate the biocompatible properties of chitosan, our project focused on the study of its molecular mechanisms. Therefore, we studied signaling pathways related to receptors that have been associated to chitosan recognition such as toll-like receptor 4 (TLR-4) and C-type lectin receptors (CLRs). Our data revealed that DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles, at the studied concentrations and time courses, did not activate the IKK/NF- κ B, MAPKs, AKT nor SYK signaling pathways. These results were supported by the absence of an inflammatory response measured

by the expression of key mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS. In view of our findings, we deduced the safety potential of our modified chitosan (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂) which is mandatory for gene therapy applications. Moreover, we suggest the involvement of unidentified cellular receptors in the recognition and uptake of chitosan which warrant further investigation.

Keywords: Chitosan, nanoparticles, siRNA, biocompatibility, toxicity, signal transduction, receptors, inflammation, oxidative stress, gene therapy.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1 – Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 La thérapie génique.....	3
1.3 Le chitosane.....	5
1.3.1 Chitosane modifié DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂	7
1.3.1.1 Groupes diéthylaminoéthyle (DEAE).....	7
1.3.1.2 Polyéthylène glycol (PEG).....	8
1.3.1.3 L'acide folique (FA).....	8
1.3.2 Nanoparticules de chitosane.....	8
1.3.2.1 Les nanoparticules de DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ /siRNA-SSB.....	9
1.4 Les récepteurs du chitosane.....	10
1.5 Le sang, ses composants et leurs rôles.....	11
1.5.1 Les globules rouges.....	11
1.5.2 Les plaquettes.....	12
1.5.3 Le plasma.....	13

1.5.3.1	Les facteurs de coagulation	13
1.5.3.2	Le système du complément.....	17
1.5.4	Les Leucocytes (globules blancs).....	20
1.5.4.1	Les neutrophiles	20
1.5.4.2	Les éosinophiles.....	22
1.5.4.3	Les basophiles.....	22
1.5.4.4	Les monocytes	22
1.5.4.5	Les lymphocytes	23
1.6	Le système immunitaire	24
1.6.1	L'immunité innée	24
1.6.1.1	La réponse inflammatoire	24
1.6.1.2	Les macrophages	25
1.6.1.3	Le rôle des médiateurs pro- et anti-inflammatoires	26
1.6.2	L'immunité adaptative	28
1.6.3	Les récepteurs toll-like (TLRs)	29
1.6.3.1	TLR-4	30
1.6.3.2	TLR-3	34
1.6.4	Les récepteurs de lectine de type C (CLR).....	35
1.6.4.1	Dectin-1	36
1.6.4.2	Récepteur de mannose.....	38
1.7	La biocompatibilité des nanoparticules	40
1.7.1	Lignes directrices.....	41
1.7.2	Les études d'hémocompatibilité.....	43
1.7.2.1	Hémolyse	44

1.7.2.2	Hémagglutination	45
1.7.2.3	L'agrégation plaquettaire	47
1.7.2.4	Temps de coagulation du plasma	49
1.7.2.5	L'activation du système du complément	50
1.7.3	Études d'immunocompatibilité.....	51
1.7.3.1	Potentiel des nanoparticules à induire les cytokines	51
1.7.3.2	Tests additionnels pour évaluer la réponse immunitaire aux nanomatériaux	53
1.7.4	La cytotoxicité	54
1.7.5	Études de stress oxydatif	55
1.7.5.1	Génération de ROS	56
1.7.5.2	Production d'oxyde nitrique (NO)	57
1.7.5.3	Tests additionnels pour évaluer le stress oxydatif	58
1.7.6	D'autres types de toxicité	58
	Hypothèse du projet	59
	Objectifs du projet.....	60
	Objectif général.....	60
	Objectifs spécifiques	60
	Chapitre 2 – Présentation des manuscrits	61
	Article 1: Titre: Evidence supporting the safety of pegylated diethylaminoethyl-chitosan polymer as a nanovector for gene therapy applications.....	62
	Résumé.....	63
	Abstract	65
	Introduction.....	66
	Materials and Methods.....	68

Results	76
Discussion	87
Conclusion	94
Article 2: Titre: Investigation of signaling pathways-induced by pegylated diethylaminoethyl-chitosan nanoparticles: are TLR-4 and C-type lectin receptors involved?.....	115
Résumé	116
Abstract	118
1. Introduction.....	119
2. Materials and methods	121
3. Results and discussion.....	125
4. Conclusion	142
Chapitre 3 – Discussion	149
3.1 L’importance de l’harmonisation	150
3.2 Les nanoparticules de DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ /siRNA sont hémocompatibles.....	152
3.3 Les nanoparticules DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ /siRNA n’induisent pas le stress oxydatif et leur cytotoxicité est concentration-, temps- et type cellulaire-dépendants	156
3.4 La capacité des nanoparticules à induire la sécrétion d’IL-1 β est dépendante du type cellulaire	157
3.5 Les nanoparticules de DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ /siRNA n’activent pas les voies de signalisation reliées au TLR-4	158
3.6 Les nanoparticules de DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ /siRNA n’activent pas SYK	161
3.7 Limitation du projet de recherche	163
3.7.1 Le test de génotoxicité <i>in vitro</i>	163
3.7.2 Étude de l’activation des voies de signalisation sur des PBMC humaines.....	163
3.7.3 Étude de l’activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 reliée au FR.....	164

3.8 Perspectives	165
Conclusion	166
Références bibliographiques.....	167
Annexe 1.....	180

Liste des tableaux

Tableau 1. – Description de différents types de TLRs chez l’humain.	30
Tableau 2. – Liste des normes ou lignes directrices reliées aux tests de toxicité sur les nanomatériaux.	43

Liste des figures

Figure 1. –	Systèmes de livraison utilisés dans la thérapie génique.	4
Figure 2. –	Structure chimique de la chitine, du chitosane et du chitosane protoné.	6
Figure 3. –	Cascade de coagulation.....	16
Figure 4. –	Cascade du complément.....	18
Figure 5. –	Complexe d'attaque membranaire.	19
Figure 6. –	Vue générale sur les différentes voies de signalisation du TLR-4.....	33
Figure 7. –	Représentation des voies de signalisation du TLR-3.....	35
Figure 8. –	Voie de signalisation du dectin-1.....	37
Figure 9. –	Voie de signalisation du récepteur de mannose.....	39
Figure 10. –	Images représentatives de l'échelle de notation du test d'hémagglutination.	46

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Force atomique

Akt : Protein kinase B

AP-1 : Protéine activatrice 1

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Protéine de type speck-like associée à l'apoptose contenant une CARD

ASTM: American Society for Testing and Materials

BCR : Récepteur des cellules B

CH : Chitosane

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CLR : Récepteurs de lectine de type C

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COS : Oligosaccharides de chitosane

CR : Récepteur du complément

DAMP : Motifs moléculaires associés aux dégâts

DC : Cellule dendritique

DCFH-DA : Diacétate de dichlorofluorescéine

DDA : Degré de déacétylation

DEAE : Diéthylaminoéthyl

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline

dsARN: ARN double brin

ERK: Extracellular signal-regulated protein kinase

FA: Acide folique

FDA: Food and Drug Administration

FPA : Fibrinopeptide A

FR : Récepteur de folate

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

ICH : International Council for Harmonisation

IFN : Interféron

IKK : IκB kinase

IL : Interleukine

iNOS : Monoxyde d'azote synthase inductible

IRF-3: Interferon regulatory factor 3

ISO : International Organization for Standardization

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JNK: C-jun NH2-terminal kinase

LAL : Lysat d'amoebocytes de limule

LBP : Protéine de liaison au LPS

LDH : Lactate déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharide

Mal : MyD88-adapter-like

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MBL : Mannan-binding lectin

MDA : Malondialdéhyde

MLA : Cellules de lymphome de souris

MPS : Système phagocytaire mononucléé

MR : Récepteur du mannose

MTS :3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium)

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium

MW : Poids moléculaire

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

N/P : Groupes amine/groupes phosphate

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NCI : Institut National du Cancer

NCL : Nanotechnology Characterization Laboratory

NFAT: nuclear factor of activated T cells

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B

NIST: National Institute of Standards and Technology

NK : Cellules tueuses naturelles

NO : Oxyde nitrique

OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development

PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PEG : Polyéthylène glycol

PF-4 : Facteur plaquettaire 4

PRR : Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires

PT : Temps de prothrombine

RNS : Espèces azotées réactives

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

siRNA : Petits ARN interférents

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

ssARN : ARN simple brin

SYK: Spleen tyrosine kinase

TBK1: TANK binding kinase 1

T_c : Lymphocytes T cytotoxiques

TCA : Temps de céphaline activée

TCR : Récepteur des cellules T

T_h : Lymphocyte T helper

TIR : Toll-IL-1-resistance

TLR : Récepteur toll-like

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TPC : Concentration plasmatique théorique

TRAF6: tumour necrosis factor receptor associated factor 6

TRAM: TRIF-related adaptor molecule

T_{reg} : Lymphocyte T régulateur

TRIF : TIR domain-containing adaptor inducing interferon β

TT : Temps de thrombine

vWF : Facteur de von Willebrand

XTT : (2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide)

β -TG : Bêta thromboglobuline

À ma fille bien-aimée, Emma, ma plus grande joie.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mon parcours atypique. À commencer par la personne qui m'a accordé sa confiance et offert l'opportunité de tracer mon chemin en recherche scientifique, mon directeur Dr Julio Fernandes. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir donné la chance de réaliser ce projet de recherche dans votre laboratoire, même si je n'avais aucune expérience à mon arrivée. Merci de m'avoir transmis de votre positivisme et de m'avoir toujours appuyé, dirigé, et encouragé.

Mon appréciation et un grand merci à mon codirecteur Dr Mohamed Benderdour, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis d'y rester sans restriction. Merci pour tout le temps consacré à mon projet et vos précieux conseils.

Merci à mon collègue Francis. Il n'y a pas suffisamment de mots pour te remercier de toute l'assistance et la rigueur durant mon parcours. Merci de ta générosité, de m'avoir accompagné, épaulé et orienté sur la bonne piste.

Je tiens également à remercier ma chère amie Houda. Tu as été avec moi depuis le début et tu as su m'écouter et me soutenir jusqu'à la fin. Merci d'avoir été toujours présente.

Un merci aussi au Dr Marcio Tiera, Maicon, Ricchard, Isadora, Aline et Grazieli. Je me suis senti bien accueilli chez vous au Brésil. Également, un grand merci à Caroline Bouchard et Josée Delisle.

Je remercie pareillement les personnes les plus chères à mes yeux, mes parents et mon frère. Je vous remercie de m'avoir encouragé, soutenu et de n'avoir jamais cessé de croire en moi.

Merci à mon époux David, de ton soutien, d'avoir fait preuve de patience durant toutes ces années, et de t'être occupé de notre fille Emma pour que je puisse retourner au laboratoire et terminer le doctorat. Cet accomplissement t'appartient aussi.

Enfin, merci à ma fille Emma qui a fait toute la différence dès sa naissance. Tu as été ma force, ma joie et la source d'énergie nécessaire pour ne jamais renoncer. Je t'aime de tout mon cœur.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Mise en contexte

La thérapie génique est une approche thérapeutique qui se développe depuis des décennies pour traiter divers types de pathologies comme les maladies inflammatoires, le cancer, les affections cardiaques et neurologiques. Cette approche thérapeutique utilise diverses stratégies, comme les vecteurs qui complexent des acides nucléiques et les transfèrent aux cellules cibles pour traiter une maladie. Ainsi, les vecteurs peuvent être modifiés et fonctionnalisés, afin que les nanoparticules qu'ils forment avec le matériel génique ciblent adéquatement les tissus avec un minimum de toxicité. La biocompatibilité est une propriété essentielle pour les particules à l'échelle nanométrique, car celles-ci peuvent activer les cellules et induire l'expression d'une avalanche de médiateurs comme les cytokines, augmenter le stress oxydatif et/ou affecter les facteurs de coagulation, ce qui peut conduire à des effets biologiques très défavorables comme la formation des thrombus et l'occlusion des artères. Dans la course au développement de nanoparticules avec une toxicité limitée, l'utilisation des polymères cationiques s'est répandue. Parmi eux, le chitosane attire l'attention, car il est reconnu de manière générale comme étant biocompatible et biodégradable.

Bien qu'il existe dans la littérature des études sur la biocompatibilité du chitosane, les protocoles expérimentaux utilisés pour son évaluation sont très hétérogènes, ce qui donne des résultats contradictoires difficiles à interpréter. De surcroît, les rapports sur ses propriétés d'héماغglutination, la génération d'une réponse oxydative, et les niveaux de contamination aux endotoxines des nanoformulations sont limités. Les deux premiers objectifs de cette thèse de doctorat sont donc, la synthèse du diéthylaminoéthyl-chitosane-polyéthylène glycol-acide folique (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂) sans endotoxines et l'évaluation *in vitro* de la réponse biologique de composants du sang humain exposés aux nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/petits ARN interférents (siRNA)-SSB, en utilisant des lignes directrices adaptées aux nanomatériaux. Notre

premier article montre le développement de cette étude avec la mesure de la cytotoxicité, l'hématotoxicité, la réponse inflammatoire et le stress oxydatif en réponse à nos nanoparticules.

Dans ce même contexte d'évaluation toxicologique des nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB, l'étude de leurs mécanismes moléculaires s'est avérée incontournable. Si bien des études sur les dérivés du chitosane ont montrés leur implication dans l'activation des cellules dendritiques à travers un mécanisme dépendant du récepteur toll-like 4 (TLR-4) et d'autres ont proposés leur internalisation via le récepteur de mannose (MR) chez les macrophages, l'interaction directe entre ce polymère et ces récepteurs n'a pas encore été démontrée. C'est ainsi que l'activation des principales voies de signalisation associées aux récepteurs TLR-4 et certains récepteurs de lectine de type C (CLR) en réponse à nos nanoparticules a été évaluée. Ceci constitue donc le troisième objectif de cette thèse, où la phosphorylation des protéines clés dans les voies de signalisation des récepteurs mentionnés a été explorée.

La réalisation de ce projet permettra d'évaluer l'innocuité de nos nanoparticules de chitosane modifié (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA) et apportera des nouvelles avancées dans le cadre de la thérapie génique, où l'utilisation des nanovecteurs avec faible toxicité et immunogénicité est essentielle dans le traitement de nombreuses maladies.

Cette thèse de doctorat est divisée en trois grands chapitres. Le premier chapitre présente une revue de la littérature sur le chitosane, les composants du sang, les études de biocompatibilité, les lignes directrices des nanomatériaux et la toxicité reliée aux dérivés de chitosane, ce qui résume les éléments clés de notre projet de recherche. Le deuxième chapitre présente un article publié et un autre soumis. Le premier montre les résultats *in vitro* des études d'hémocompatibilité et le deuxième l'activation des voies de signalisation étudiées. Finalement, le troisième chapitre présente la discussion et la conclusion du projet de recherche, en soulignant les contributions de ces résultats à l'avancement des connaissances dans le domaine de la thérapie génique.

1.2 La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie en plein essor, qui ne cesse d'évoluer à travers ses divers champs d'application et le développement de la vectorisation. La diversité d'essais cliniques complétés ou en cours au niveau mondial témoigne du potentiel de cette technique dans une panoplie de maladies neurologiques, inflammatoires, oculaires, cardiovasculaires et cancéreuses [1]. La thérapie génique est définie comme une stratégie visant à modifier l'expression d'un gène ou corriger ou remplacer un gène défectueux, en utilisant l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'acide ribonucléique (ARN) afin de produire un effet thérapeutique ou traiter une maladie [2]. Étant donné que l'administration directe des acides nucléiques peut s'avérer inefficace à cause de leur dégradation par des nucléases, l'utilisation de vecteurs qui les protègent et les transportent aux cellules cibles est devenue courante [3]. L'efficacité de transfection et une faible immunogénicité sont des aspects recherchés dans cette approche. Il existe trois types de systèmes ou de méthodes de livraison dans la thérapie génique à savoir : viral, chimique, et physique [4]. Le premier système est constitué de vecteurs viraux tels que le rétrovirus, le lentivirus, l'adénovirus et le virus adénoassocié, lesquels sont reconnus pour leurs hauts niveaux de transfection. Cependant, ils sont aussi coûteux, difficiles à produire et sont associés à de fortes réponses immunitaires [5]. Les systèmes chimiques sont constitués de plateformes non virales comme les vecteurs polymériques, inorganiques ou lipidiques. Les exemples les plus représentatifs des vecteurs polymériques sont le chitosane, le polyéthylèneimine (PEI), les dendrimères et le dextrane, parmi d'autres. Les plus étudiés dans le groupe des vecteurs inorganiques sont les nanoparticules métalliques (particules d'or ou d'argent), les nanotubes de carbone et les boîtes quantiques. Finalement, les liposomes sont les vecteurs les plus connus du groupe lipidique [5]. Les vecteurs non viraux sont moins performants que les viraux, mais ils peuvent être développés à partir de multiples matériaux, et modifiés ou fonctionnalisés afin d'augmenter leur niveau de transfection, améliorer le ciblage de cellules et réduire la réponse immunitaire indésirable [6]. Finalement, les méthodes physiques utilisent des techniques directes pour le transfert génique comme les micro-injections, ou des méthodes qui créent des pores temporaires sur les membranes cellulaires afin d'introduire le matériau génique à l'intérieur.

L'électroporation, la sonoporation et la magnétoporation utilisent des impulsions électriques, des ultrasons et des champs magnétiques, respectivement, pour déstabiliser la membrane et transférer le matériel génique [5]. Les méthodes physiques ne sont pas très utilisées à cause de la difficulté de la technique et le risque de dommages cellulaires et tissulaires [5]. La figure 1 résume les systèmes mentionnés ci-dessus. Parmi toutes ces plateformes, les vecteurs non viraux polymériques à base de chitosane seront décrits tout au long de ce chapitre.

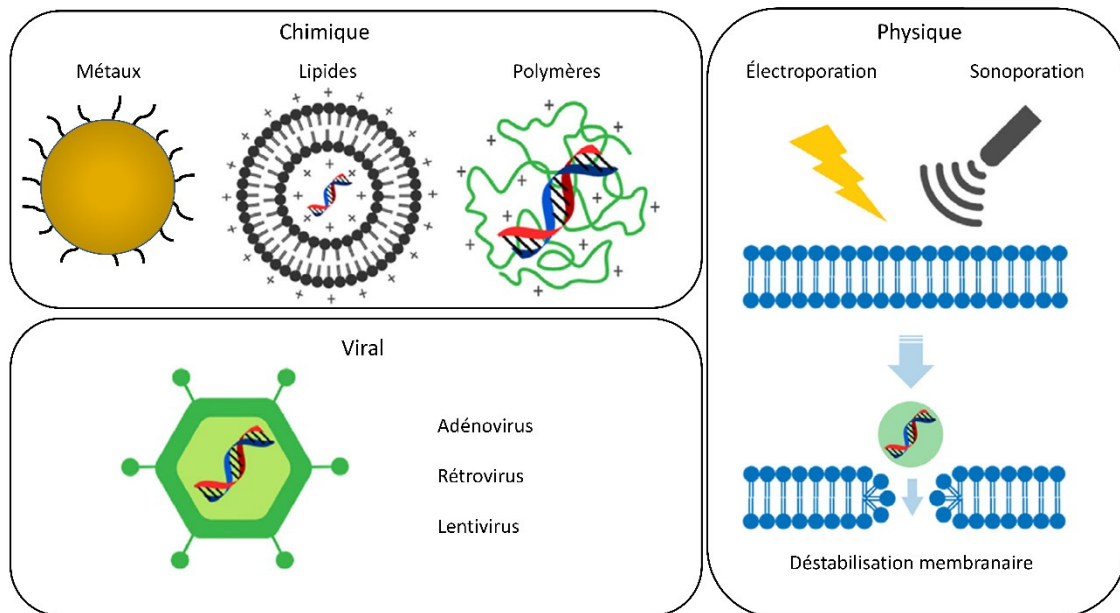


Figure 1. – Systèmes de livraison utilisés dans la thérapie génique.

Le système chimique est constitué des nanoparticules métalliques, comme l'or ou l'argent, des polymères comme le chitosane et des liposomes, entre autres. Cette méthode permet l'utilisation d'une variété de matériaux et des modifications afin d'améliorer l'efficacité de transfection des vecteurs. Les virus désactivés, comme les adénovirus, sont le plus performants dû à leur bon taux de transfection, mais comportent des risques d'immunogénicité. Finalement, la méthode physique crée des pores temporaires sur les membranes cellulaires qui facilitent l'introduction de matériel génique, cependant, son utilisation est limitée à cause de possibles dommages tissulaires. Adaptée et modifiée de Salameh et al [4].

1.3 Le chitosane

Le chitosane est un polymère linéaire naturel qui est constitué des unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées par des ponts β -(1-4) [3, 7]. En général, il est reconnu pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité [3]. Parmi ses multiples applications biomédicales, son utilisation dans la thérapie génique [8], l'ingénierie tissulaire et la délivrance de médicaments [9] sont les plus étudiées. Ce polysaccharide est obtenu à partir de la déacétylation de la chitine, laquelle se trouve dans l'exosquelette des crustacés et la paroi cellulaire des champignons [9, 10]. La déacétylation est une réaction chimique où la chitine perd des unités acétylées (groupes de N-acétyl-D-glucosamine) en présence d'un milieu alcalin [11] Figure 2. La quantité d'unités de D-glucosamine (unité désacétylée) présente dans la chaîne principale du chitosane déterminera le degré de déacétylation (DDA) du polymère. Le pourcentage (%) de DDA influence la solubilité, la densité de charge, la dégradation et la cristallinité du polymère [7, 10]. Un DDA élevé représente plus d'amines libres dans la chaîne du chitosane [11]. Dans un milieu acide, la protonation des amines permet la dissolution du chitosane et augmente la densité de charge (charges positives) de celui-ci [3]. Ceci se traduit par une meilleure interaction électrostatique entre le chitosane et des acides nucléiques chargés négativement, comme les petits ARN interférents (siRNA), améliorant l'efficacité de liaison [7, 10]. Le pH de la formulation du chitosane joue un rôle important, car il est soluble dans des solutions au-dessous de sa valeur de pKa ($\text{pH} < \sim 6.3$) [3, 10]. En revanche, dans un milieu neutre ou basique, le chitosane n'est plus soluble et précipite, sauf si celui-ci contient des modifications chimiques l'aidant à améliorer ses propriétés.

Une autre propriété importante dans les caractéristiques physicochimiques du chitosane est son poids moléculaire (MW), représenté par la longueur de la chaîne. Celui-ci peut être modifié à partir de la dépolymérisation du polysaccharide (conversion du polymère en monomères) par la méthode d'hydrolyse [3]. Le MW peut influencer l'efficacité de liaison et la protection du matériel génique. Une fois l'interaction électrostatique établie entre le chitosane et l'acide nucléique, un MW élevé renforcerait la complexation par un effet d'enchevêtrement [12]. Dans ce contexte, le

DDA et le MW du chitosane ont un effet décisif sur la complexation du matériel génique, leur décomplexation dans les cellules et l'efficacité de transfection [7, 10, 12, 13].

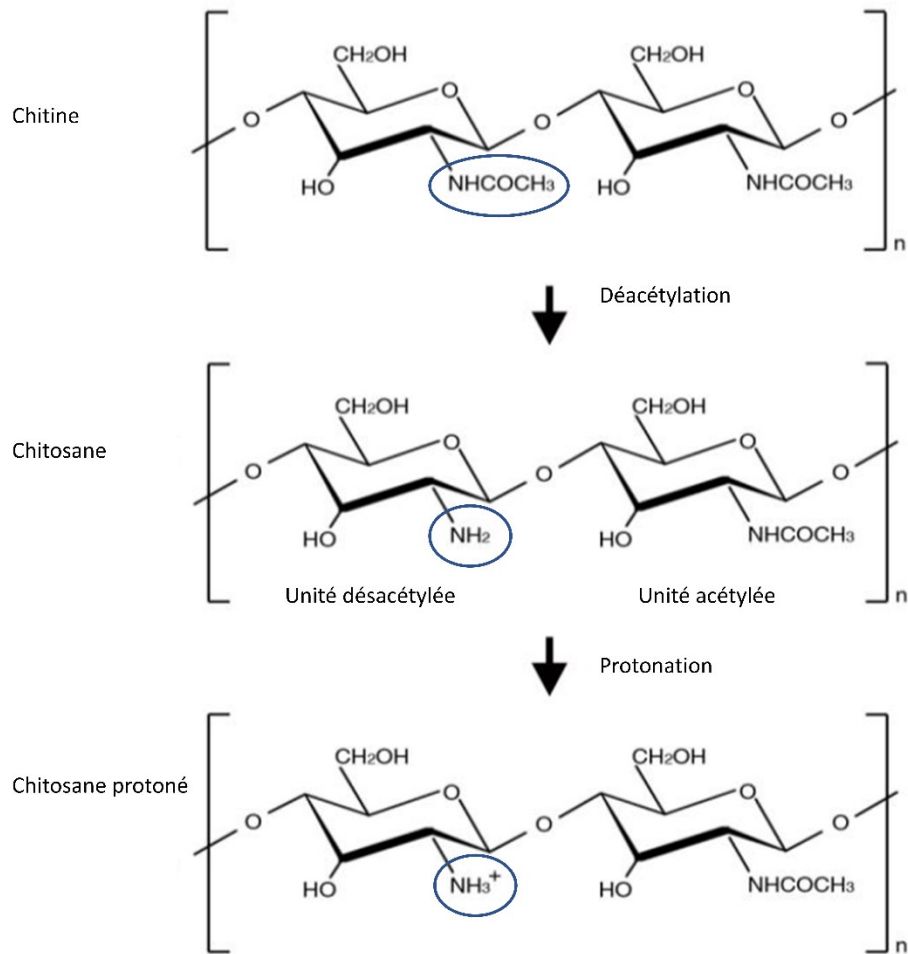


Figure 2. – Structure chimique de la chitine, du chitosane et du chitosane protoné.

La chitine, produite à partir de l'exosquelette des crustacés, est constituée principalement des unités acétylées, représentées par la présence de groupes N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane provient de la déacétylation de la chitine et comporte majoritairement des unités de D-glucosamine. La suspension du chitosane dans des solutions à $\text{pH} < 6.3$ permet la protonation de leur groupes amines et sa dissolution dans la solution. Adaptée et modifiée de Yang et al [14].

1.3.1 Chitosane modifié DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂

La modification chimique du chitosane est possible grâce à ses groupes fonctionnels amine (-NH₂) et hydroxyle (-OH) qui sont hautement réactifs [3]. Ces modifications servent à améliorer la solubilité, la stabilité colloïdale [15], la capacité tampon et par conséquent l'échappement endosomal de la nanoparticule [15], l'efficacité de transfection [16] et/ou le ciblage des cellules [17, 18]. Notre laboratoire a mis au point la synthèse du chitosane modifié DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂, libre d'endotoxines, lequel a déjà démontré une bonne capacité tampon et une efficacité de transfection *in vitro* [8], avec un remarquable potentiel comme nanovecteur pour la délivrance des siRNA thérapeutiques dans un modèle animal de polyarthrite rhumatoïde [19]. Dans les sections suivantes, le rôle de chaque groupe présent dans la modification est expliqué.

1.3.1.1 Groupes diéthylaminoéthyle (DEAE)

La modification de la structure du chitosane avec des groupes DEAE se réalise par la substitution de groupes amines du polymère en position C-2. Cette modification convertit des groupes amines primaires en amines secondaires et crée des groupes d'amines tertiaires [8, 15]. Ceci accroît la disponibilité d'amines libres protonées (charges positives) qui peuvent interagir de façon électrostatique avec la charge négative des acides nucléiques (siRNA, dans notre cas), ce qui augmente la force d'interaction et donne une meilleure stabilité à la nanoparticule [8, 15]. Plus important encore, les groupes d'amines tertiaires permettent la dissolution du chitosane dans des conditions physiologiques grâce à leur valeur de pKa plus élevée [20]. Ceci signifie que les amines seront protonées même à pH 7.4 permettant ainsi la solubilité du chitosane, contrairement au chitosane non-modifié qui précipiterait dans ces mêmes conditions. Cette modification augmente également la capacité tampon du chitosane [15], ce qui s'avère utile dans l'échappement endosomal de la nanoparticule. La théorie de l'éponge à protons figure parmi les hypothèses qui expliquent l'échappement endosomal des polymères cationiques [21]. Celle-ci postule que dans un milieu acide comme celui du compartiment endolysosomal, la protonation des amines provoque l'accumulation de protons et donc l'afflux de contre-ions pour maintenir l'équilibre des charges. L'afflux continu de contre-ions augmente leur concentration et cause

l'entrée d'eau pour rétablir l'équilibre osmotique. Ceci produit le gonflement et la rupture de l'endosome, et finalement la libération de la nanoparticule dans le cytosol [22].

1.3.1.2 Polyéthylène glycol (PEG)

En général, la pégylation consiste à attacher des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) aux groupes amines du chitosane afin d'améliorer son hémocompatibilité [23] et d'offrir une meilleure stabilité aux nanoparticules [8]. Le caractère cationique du chitosane facilite son interaction électrostatique avec des membranes cellulaires chargées négativement comme les érythrocytes [24], ce qui peut conduire à une thrombose. L'encombrement stérique créé par le PEG diminue l'interaction des nanoparticules avec des protéines et des cellules [23, 25], rendant le chitosane plus hémocompatible et sécuritaire pour des applications en contact direct avec le système sanguin. Dans notre cas, l'attachement de PEG sert spécialement comme pont de liaison entre le chitosane et l'acide folique [17]. Le PEG permet à l'acide folique de rester éloigné de la chaîne du chitosane et libre pour cibler le récepteur de folate dans les cellules qui le surexpriment.

1.3.1.3 L'acide folique (FA)

La fonctionnalisation des nanoparticules avec des ligands comme l'acide folique (FA) permet de cibler les cellules qui expriment le récepteur de folate (FR) sur leurs surfaces membranaires, grâce à leur grande affinité [26]. Dans ce type de modifications, le FA est attaché à la chaîne du chitosane par l'intermédiaire du PEG [17]. Les cellules cancéreuses [26] et les macrophages activés [27] sont reconnus pour surexprimer le FR, ce qui fait du FR une cible idéale pour les traitements thérapeutiques de plusieurs maladies comme le cancer et les maladies inflammatoires [17, 26].

1.3.2 Nanoparticules de chitosane

Les nanoparticules sont définies comme des matériaux avec des dimensions à l'échelle nanométrique [28]. Les nanoparticules de chitosane sont formées grâce à l'interaction électrostatique entre ce polymère (chargé positivement) et les molécules d'acide nucléique (chargées négativement), sous agitation mécanique à température pièce [10]. Cette association protège le matériel génique de la dégradation par des nucléases [3]. L'efficacité de complexation

des acides nucléiques par le chitosane est liée au ratio entre les groupes amine du polymère (N) / et les groupes phosphate de l'acide nucléique (P) à complexer (N/P) [10]. La complexation, à un ratio N/P déterminé, peut être vérifiée facilement par électrophorèse sur gel d'agarose, et elle est dépendante du pH de la solution. En effet, dans un milieu acide, les amines protonées du polymère permettent une meilleure interaction avec le matériel génique [10]. L'efficacité de transfection est un compromis entre un ratio N/P qui permet une complexation efficace, mais qui en même temps permet la libération des acides nucléiques une fois à l'intérieur de la cellule [7, 10].

Deux des caractéristiques les plus importantes des nanoparticules sont la taille et le potentiel zêta. Ces deux propriétés sont reliées au DDA, le MW [8, 29], le ratio N/P et le pH de la formulation du chitosane [15, 30]. Le potentiel zêta est non seulement représentatif de la charge nette de la nanoparticule, mais témoigne également de l'homogénéité entre les préparations [31] et de la stabilité des nanoparticules dans la suspension [32]. Dans le cas du chitosane, la protonation d'amines augmente la charge positive de surface et donc le potentiel zêta. Un potentiel zêta positif facilite l'interaction électrostatique entre les nanoparticules et les membranes cellulaires portant une charge négative [17].

1.3.2.1 Les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB

La thérapie génique se sert non-seulement des acides nucléiques comme l'ADN et l'ARNm pour stimuler ou inhiber l'expression d'un gène, mais aussi des siRNA utilisés pour le silençage génique post-transcriptionnel [33]. Le mécanisme utilisé par le siRNA permet la dégradation de l'ARNm qui code pour une protéine cible, évitant ainsi sa traduction et donc diminuant son expression. Cette stratégie est utile dans des maladies où la surexpression d'une protéine est la cause principale de celle-ci [33].

Notre projet de recherche utilise le siRNA- « Sjogren syndrome antigen B » (SSB) pour la formation de la nanoparticule et l'évaluation de la toxicité de la formulation. Le SSB est un gène qui code pour la protéine La. Cette protéine se lie aux transcrits produits par l'ARN polymérase III afin de faciliter leur repliement et maturation et les protéger contre la dégradation par les exonucléases [34]. Les ARN polymérases réalisent la transcription de l'ADN en ARN chez les cellules eucaryotes.

L'ARN polymérase III transcrit spécifiquement les gènes qui codent pour l'ARN ribosomique 5S, les ARN de transfert et d'autres petits ARN [35]. Le SSB est associé à des maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjögren et le lupus érythémateux disséminé (LED) [36]. Le syndrome de Sjögren est caractérisé par une perturbation des glandes exocrines (lacrymales et salivaires) se traduisant dans une sécheresse buccale et oculaire [37]. Le LED pour sa part est caractérisé par la production d'auto-anticorps et la formation et le dépôt des complexes immuns dans les tissus, ce qui provoque l'inflammation [38]. Bien que le siRNA-SSB pourrait être utilisé éventuellement comme ingrédient actif dans une nanoformulation à des fins thérapeutiques, notre projet de recherche se sert de la nanoparticule comme plateforme afin d'évaluer son profil d'innocuité, plutôt que comme moyen de traitement médicamenteux.

L'utilisation du siRNA-SSB pour la formation de la nanoparticule présente comme avantage l'expression ubiquitaire du SSB, ceci signifiant qu'il est présent dans la plupart des tissus [39], ce qui a déjà permis d'évaluer l'efficacité de transfection de notre chitosane dans une variété de cellules [8]. De plus, la séquence du siRNA-SSB utilisée pour ce projet a déjà montré une production limitée des cytokines [39], ce qui est indispensable pour éviter toute interférence avec le test qui évalue la capacité des nanoparticules à produire la sécrétion des médiateurs pro- et anti-inflammatoires, cet essai faisant partie des tests d'hémocompatibilité.

1.4 Les récepteurs du chitosane

La littérature identifie plusieurs récepteurs de cellules immunitaires qui sont susceptibles de reconnaître le chitosane et/ou la chitine, à savoir: le TLR-4 [40-43], le MR [44-46], le récepteur CD14 [47, 48] et le récepteur du complément 3 (CR3) [47]. La chitine pour sa part est reconnue par les récepteurs de lectine de type C (CLR) tel que dectin-1 [49] et le MR [50], en plus du récepteur toll-like 2 (TLR-2) [51, 52].

Les détails concernant les récepteurs TLR-4, MR et dectin-1 seront discutés dans la section 1.6.3.

1.5 Le sang, ses composants et leurs rôles

Le sang est un tissu conjonctif fluide qui transporte l'oxygène et des nutriments à travers les vaisseaux sanguins ainsi que les déchets des différents tissus pour les acheminer aux organes d'excrétion. Il est constitué de plasma, d'une variété de cellules ainsi que de protéines responsables des réponses immunitaires et de l'hémostase [53]. Les composants du sang et leurs rôles seront décrits plus en détail dans cette section.

1.5.1 Les globules rouges

Les globules rouges ou érythrocytes sont des cellules anucléées et biconcaves qui constituent 45% du volume total du sang. Les érythrocytes sont formés dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques, lors d'un processus appelé érythropoïèse. Ces cellules sont d'origine myéloïde et leurs précurseurs sont les réticulocytes, lesquels perdent leur noyau avant de se différencier en érythrocytes [53, 54]. L'hémoglobine, le composant principal des érythrocytes, est une molécule constituée de la portion globine (protéine) et de l'hème (cofacteur contenant du fer) [53, 54]. Le rôle principal des érythrocytes est d'acheminer l'oxygène (O_2) aux tissus à travers l'hémoglobine, qui fixe les molécules d'oxygène sur l'hème. Ces protéines transportent non seulement l'oxygène, mais aussi le dioxyde de carbone (CO_2) des tissus vers les poumons, et jouent un rôle clé dans la capacité tampon du sang. Enfin, la durée de vie des érythrocytes est de 120 jours. Ils sont éliminés de la circulation sanguine par la rate [54].

La libération de l'hémoglobine par des érythrocytes endommagés, ou hémolyse, est l'un des indicateurs de la toxicité hématologique des agents exogènes. Étant donné que l'hémoglobine est un pigment de couleur rouge [54], des dosages colorimétriques sont utilisés pour quantifier l'hémolyse induite par des agents exogènes, tels que les nanomatériaux.

L'interaction entre les érythrocytes et les nanomatériaux peut conduire dans certains cas à des effets toxiques sur ces cellules. Les effets délétères les plus connus sont: l'hémolyse [55] et l'hémagglutination [56] qui se traduisent généralement par une anémie. L'hémagglutination est caractérisée par la formation d'amas cellulaires. Ces agglutinats peuvent mener à la formation de caillots sanguins qui obstruent les vaisseaux sanguins et empêchent les érythrocytes de réaliser

leurs fonctions [56]. Des changements de la morphologie normale de ces cellules peuvent aussi être observés avec l'agglutination. Étant donné l'importance des effets nocifs décrits, l'évaluation du potentiel hémolytique et d'agrégation cellulaire des nanomatériaux est incontournable dans l'estimation de l'hémocompatibilité de ceux-ci.

1.5.2 Les plaquettes

Les plaquettes ou thrombocytes sont des cellules anucléées [54] formées dans la moelle osseuse à partir des mégacaryocytes, dans un processus appelé thrombopoïèse [53]. Elles ont un rôle essentiel dans l'hémostase, définie comme l'arrêt du saignement ou de l'hémorragie [54]. L'hémostase comprend trois étapes : la vasoconstriction, la fermeture de la blessure par le thrombus plaquettaire et la coagulation sanguine [54]. La vasoconstriction, qui est définie comme un spasme vasculaire, diminue la perte du sang en ralentissant son écoulement. De son côté, le thrombus plaquettaire est formé à la suite de plusieurs événements qu'on peut décrire comme suit: la blessure de la paroi de l'endothélium des vaisseaux sanguins expose le collagène, auquel va s'attacher le facteur de von Willebrand (vWF) présent dans le plasma [54]. Ce dernier est reconnu par les récepteurs membranaires des plaquettes en circulation et sert de pont entre celles-ci et la lésion endothéliale. Dans un deuxième temps, le collagène active les plaquettes et déclenche la libération de l'adénosine diphosphate et de la thromboxane A₂. Ces dernières favorisent l'adhésion des autres plaquettes ainsi que leur activation et leur agrégation, conduisant ainsi à la formation du thrombus plaquettaire. Ce thrombus ferme la blessure par une action mécanique et libère des molécules qui stimulent davantage la vasoconstriction et la coagulation sanguine [54]. La formation d'un caillot de sang par-dessus du thrombus plaquettaire est le résultat de l'action des multiples facteurs de coagulation présents dans le plasma. La coagulation sanguine, qui est la dernière étape de l'hémostase, sera discutée dans la section des facteurs de la coagulation.

Dans certains cas, l'interaction des plaquettes avec des nanoparticules peut déclencher leur adhésion, activation et agrégation, en absence de toute lésion et en dehors du cadre de l'hémostase. Cette perturbation de la fonction normale de plaquettes peut conduire à la formation d'un thrombus plaquettaire et l'occlusion des vaisseaux sanguins. Ceci pourrait

éventuellement provoquer un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral [56]. Ainsi, on parle de la thrombogénicité, définie comme la capacité d'un matériau à induire la production des thrombus [57]. Des tests spécialisés pour estimer la thrombogénicité des matériaux permettent d'évaluer l'activation des plaquettes et leur agrégation en réponse à l'interaction avec ces agents exogènes. Ces tests font donc partie de l'évaluation toxicologique des matériaux destinés à être administrés dans l'organisme.

1.5.3 Le plasma

Le plasma est un liquide complexe, qui représente 55% du volume total du sang. Il est composé d'eau à 90% et représente le milieu dans lequel les cellules et les protéines du sang se trouvent en suspension [54]. Il est constitué d'ions tel que le sodium (Na^+), le chlore (Cl^-) et le calcium (Ca^{2+}) et de protéines plasmatiques qui jouent un rôle dans l'équilibre et/ou la pression osmotique du sang et sa capacité tampon. Parmi les protéines plasmatiques, on peut nommer l'albumine, le fibrinogène et les globulines qui se trouvent en grande quantité. Les protéines du système du complément et les facteurs de coagulation font partie du groupe des globulines. D'autres substances organiques comme des nutriments (acides aminés, lipides et vitamines) et des hormones sont aussi transportés par le plasma [54]. Parmi les éléments du plasma, les facteurs de coagulation et les protéines du système du complément seront décrits dans cette section.

1.5.3.1 Les facteurs de coagulation

La majorité des facteurs de coagulation sont des protéines plasmatiques synthétisées par le foie. Ils sont présents dans le plasma sous forme inactive et constituent une cascade de molécules qui s'activent de façon consécutive, afin de déclencher le processus de coagulation [54]. L'activation de la cascade de coagulation peut être induite par la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque. La première coagule le sang directement au site de la blessure et la dernière coagule le sang qui s'échappe aux tissus environnants [54].

La voie intrinsèque

Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (facteur Hageman), à la suite du contact de ce dernier avec le collagène exposé lors d'une blessure ou par l'interaction avec une surface

étrangère. Ensuite, une série de réactions en chaîne se poursuit avec l'activation d'autres facteurs de coagulation, comme le facteur X, pour aboutir à la formation de la fibrine puis du caillot sanguin, qui est le but ultime de la coagulation (figure 3) [54].

La voie extrinsèque

Cette voie est déclenchée par des tissus endommagés qui libèrent la thromboplastine (facteur tissulaire), laquelle active le facteur X (figure 3). La séquence d'activation de la voie intrinsèque et extrinsèque est la même à partir de l'activation du facteur X [54]. Cette séquence commune est connue sous le nom de la voie commune qui finalise la formation du caillot sanguin.

Le caillot sanguin

La fonction principale de la cascade de coagulation est la formation du caillot sanguin. C'est un processus complexe où le fibrinogène est converti en fibrine par l'intermédiaire de la thrombine (figure 3). La thrombine se trouve dans le plasma sous forme inactive, la prothrombine. Cette dernière est activée par le facteur X activé, issu des voies intrinsèque et/ou extrinsèque [54]. Une fois la fibrine est produite, celle-ci forme une maille qui attrape les cellules sanguines comme les érythrocytes et les agrégats plaquettaires formés lors de l'activation des plaquettes. La formation finale du caillot est un processus simultané avec celui de la formation du thrombus plaquettaire. Les deux processus se complètent et scellent le vaisseau sanguin endommagé. Enfin, un processus de réparation tissulaire est mis en place, ce qui aboutit à la dissolution du caillot par un processus de fibrinolyse [54].

L'évaluation toxicologique des nanomatériaux vérifie si l'interaction entre ceux-ci et le plasma affecte les facteurs de coagulation, entre autres systèmes. Ainsi, la fonction des protéines de la cascade de coagulation de la voie intrinsèque, extrinsèque et commune peut être vérifiée par trois tests séparés. Le temps de prothrombine (PT) représentatif de la voie extrinsèque évalue l'activité des facteurs VII, X, V et II [58]. Le temps de céphaline activée (TCA) associé à la voie intrinsèque examine la fonctionnalité des facteurs XII, XI, IX, VIII, X, V et II [58]. Finalement, le temps de thrombine (TT) évalue la fonctionnalité de la voie commune [58]. Chaque voie possède un intervalle de référence du temps de coagulation ($11 \leq PT \leq 15s$, $28 \leq TCA \leq 40s$ et $14 \leq TT \leq 21s$) [59]. Ces tests permettent donc d'estimer les propriétés anti- ou pro-coagulantes des

formulations nanométriques comme les nanoparticules. Une altération du temps de coagulation normal peut conduire à des coagulopathies comme des saignements incontrôlés ou, au contraire, la formation de caillots en absence d'une lésion tissulaire. Comme exemple, la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est une coagulopathie qui peut être générée par certains nanomatériaux [60]. Cette pathologie est caractérisée par l'activation généralisée du système de coagulation avec la formation de la fibrine et l'occlusion des petits vaisseaux sanguins [61]. Ces faits signalent donc l'importance de l'estimation des effets de l'interaction entre les nanomatériaux et les facteurs de coagulation [60].

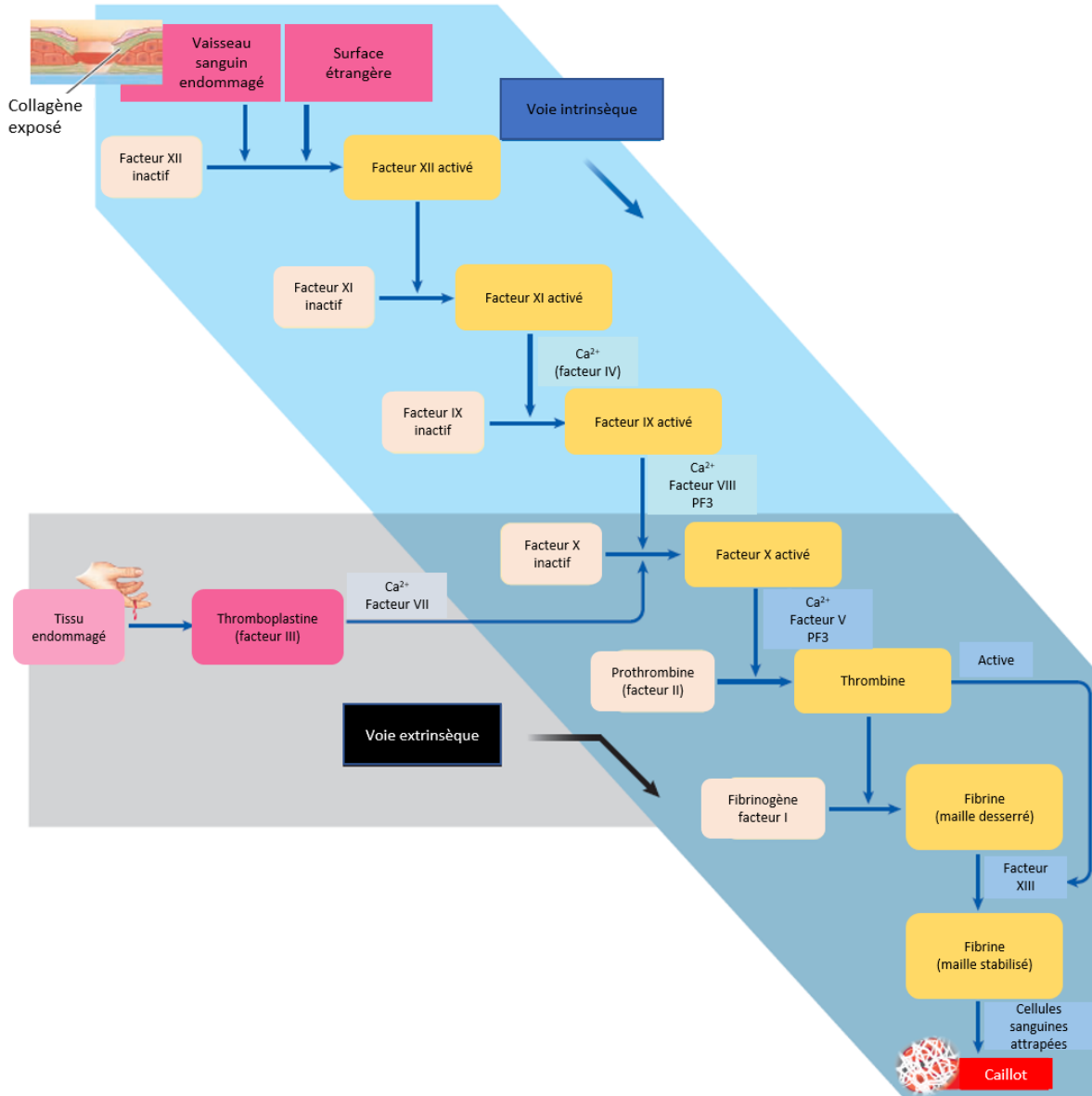


Figure 3. – Cascade de coagulation.

La cascade est constituée des facteurs de coagulation présents dans le plasma sous forme inactive. Celle-ci peut être activée par la voie intrinsèque ou extrinsèque lesquelles convergent dans la voie commune à partir du facteur X. Ce dernier active la prothrombine qui en devient la thrombine, laquelle participe dans la conversion du fibrinogène en fibrine. La fibrine attrape les érythrocytes et les agrégats plaquettaires formant ainsi le caillot sanguin qui scelle le vaisseau sanguin endommagé. Adaptée et modifiée de Sherwood et al [54]

1.5.3.2 Le système du complément

Le système du complément fait partie de l'immunité innée et complète la réponse des anticorps contre les organismes étrangers. Il s'agit de protéines plasmatiques inactives, synthétisées par le foie, qui adhèrent de manière non spécifique aux agents pathogènes et s'activent de manière consécutive dans une cascade de clivages protéolytiques [62]. Ce système est activé par la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines [63]. La voie classique est activée par des anticorps produits de manière spécifique contre des organismes étrangers. La voie alterne est activée par des micro-organismes et la voie des lectines par la « mannan-binding lectin » (MBL) [63], qui se lie aux polysaccharides de la surface des agents pathogènes [64]. La cascade est constituée de molécules de C1 à C9 et de facteurs B, D, H, I et P [63] (figure 4). Les molécules C5 à C9 du complément forment des complexes d'attaque membranaire sur la membrane des cellules pathogènes. Ces molécules s'introduisent dans la membrane des micro-organismes construisant un canal en forme de cylindre par lequel l'eau entre à l'intérieur de la cellule dû au flux osmotique, ce qui cause son gonflement et sa rupture (figure 5) [62]. Ces trous produisent une perte de la fonction membranaire et détruisent les cellules, constituant ainsi une façon directe et efficace d'éliminer les microbes [64]. Les molécules de la cascade ont également d'autres fonctions telles qu'attirer les phagocytes aux sites d'invasion microbienne, s'adhérer aux microbes afin de les rendre plus visibles pour être phagocytés (opsonisation), promouvoir la vasodilatation, stimuler les mastocytes pour libérer l'histamine et finalement activer les kinines [62].

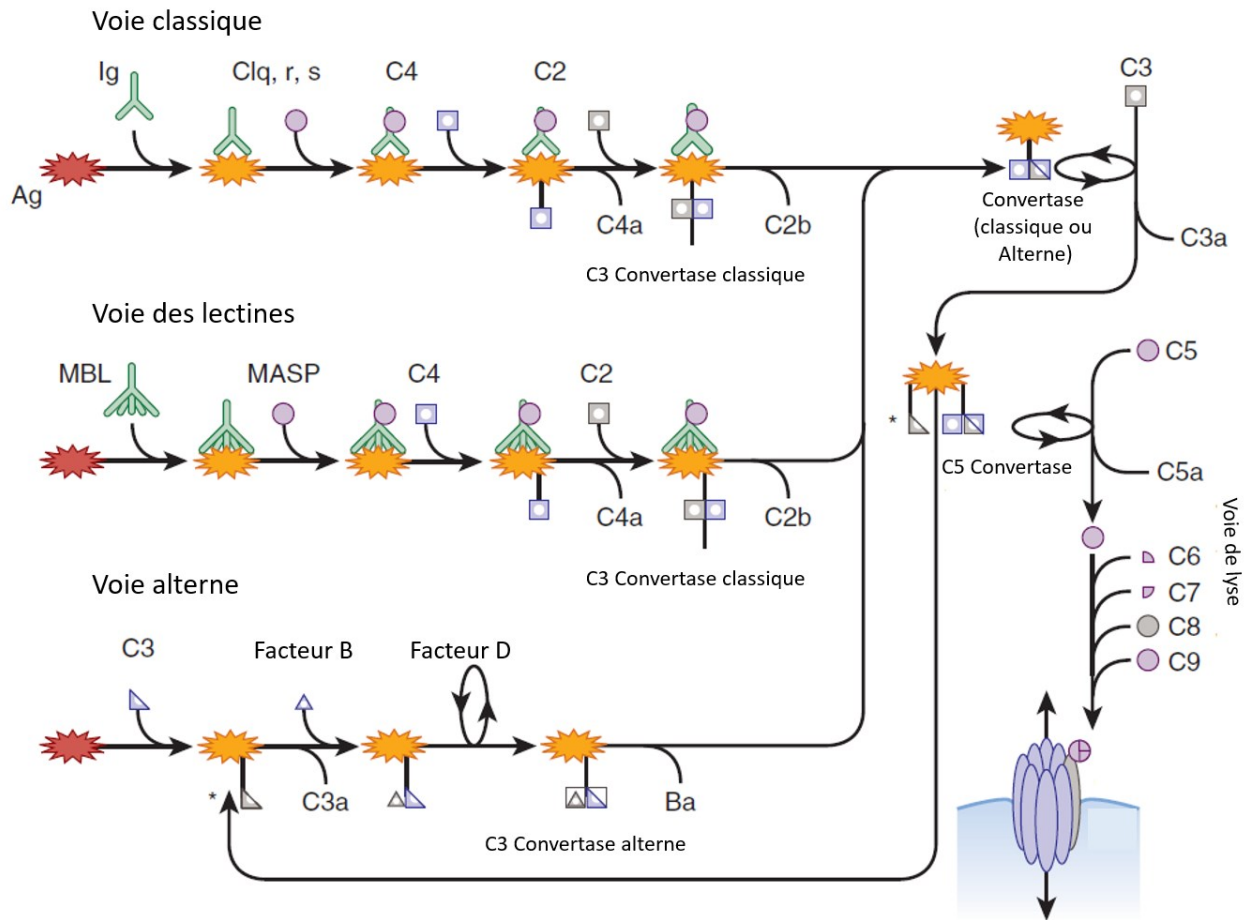


Figure 4. – Cascade du complément.

Le système du complément est composé par des protéines qui s'activent de manière consécutive les uns aux autres dans un processus protéolytique. Il est activé par trois voies distinctes, classique, lectines ou alterne. La voie classique est activée par des anticorps liés de façon spécifique sur un antigène ou directement par des molécules appartenant aux agents pathogènes. La voie des lectines est activée par la fixation de la MBL aux polysaccharides présents sur la surface des micro-organismes. La voie alterne est activée par l'invasion d'organismes étrangers. Les trois voies convergent sur la chaîne C3 dont les produits des clivages sont détectés pour mesurer l'activation du système. Adaptée et modifiée de Hoffman et al [64].

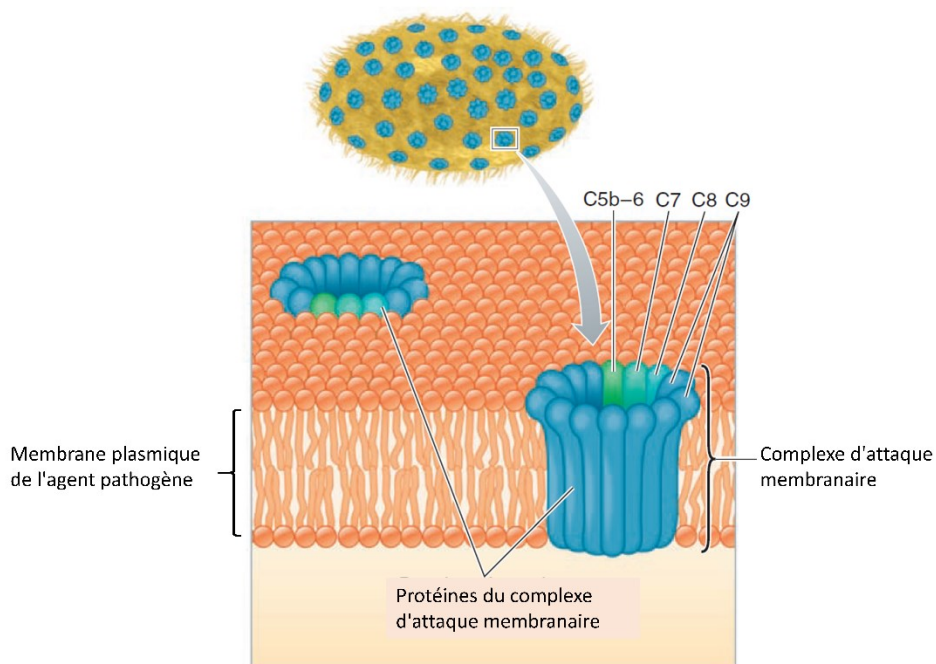


Figure 5. – Complexe d’attaque membranaire.

Les molécules C5 à C9 du système du complément se regroupent et s’enfoncent dans la membrane plasmique de cellules pathogènes créant des trous par lesquels l’eau s’infiltré. Ceci cause le gonflement et l’éclatement de la cellule. Cette lyse cellulaire est exécutée rapidement et constitue un moyen d’éliminer les microbes sans les phagocyter. Adaptée et modifiée de Sherwood et al [62].

L’altération du fonctionnement normal du système du complément par les nanomatériaux peut conduire à une réaction d’hypersensibilité ou une anaphylaxie [55]. L’hypersensibilité est définie comme une réaction immunitaire inappropriée face à un antigène, où une réponse inflammatoire exagérée peut causer des dommages aux tissus [65]. L’anaphylaxie est une réaction allergique exacerbée qui peut être mortelle [65]. Ces conditions peuvent déclencher une production élevée de fragments C3a et C5a, connus comme des anaphylatoxines, qui stimulent la libération de l’histamine par les mastocytes [64]. La réaction allergique déclenchée est similaire à celle associée aux anticorps IgE [64]. La gravité de ces réactions fait de l’évaluation des effets des nanomatériaux

sur le système du complément un test indispensable pour des applications systémiques. Étant donné que l'activation de chacune des voies du système du complément converge au clivage de la molécule C3 et la formation des produits de clivage tels que C3c et iC3b [63], ces molécules sont couramment utilisées dans l'estimation de l'activation du complément par les nanoparticules.

1.5.4 Les Leucocytes (globules blancs)

Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules du système immunitaire produites dans la moelle osseuse. Ces cellules en collaboration avec certaines protéines plasmatiques montent une réponse inflammatoire pour éliminer les agents pathogènes ou les cellules étrangères [54]. Les leucocytes utilisent le sang comme moyen de transport pour arriver aux sites d'invasion où ils exécutent leur fonction de défense immunitaire. Ainsi, leur quantité dans le sang peut varier dépendamment des besoins de défense du corps. Les leucocytes peuvent être divisés dans deux grandes catégories dépendamment de la présence de granules dans leur cytoplasme: les granulocytes et les agranulocytes [54]. Les granulocytes sont représentés par les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules, d'origine myéloïde, contiennent des noyaux segmentés en plusieurs lobes et des granules dans leur cytoplasme. Les monocytes et lymphocytes, d'origine myéloïde et lymphoïde respectivement, constituent les agranulocytes et contiennent un seul noyau [54]. Ces types cellulaires seront brièvement décrits dans les lignes subséquentes.

1.5.4.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires qui font partie de la première ligne de défense du système immunitaire inné principalement contre des bactéries et champignons [54]. Les neutrophiles utilisent différents mécanismes afin d'éliminer les pathogènes. D'abord, ils détruisent les bactéries après les avoir phagocytées à l'aide de leurs granules intracellulaires, qui contiennent des protéines antimicrobiennes [54] ou par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'intérieur des phagolysosomes [66]. Dans un processus de dégranulation, ils peuvent également libérer le contenu de leurs granules par exocytoses attaquant ainsi directement les bactéries. Ces granules cytoplasmiques peuvent être classifiés comme suit:

primaires (azurophiles), secondaires (spécifiques) ou tertiaires (granules de gélatinase). Des exemples représentatifs des molécules dans chaque groupe sont : des myéloperoxydases et des défensines pour les primaires, des lactoferrines et des ficolines-1 pour les secondaires et des métalloprotéinases matricielles 9 (MMP9) pour les tertiaires [67]. Étant donné le contenu hautement pro-inflammatoire des granules, la réponse inflammatoire de neutrophiles et leur dégranulation sont des processus contrôlés afin d'éviter des dommages tissulaires [67]. Finalement, ils utilisent un mécanisme de mort cellulaire programmée, la nétose, où ils se détruisent et éliminent simultanément les cellules pathogènes [54]. La nétose est un processus dans lequel les membranes du noyau et des granules des neutrophiles activés sont dégradées [66] et des fibres composées de la chromatine décondensée, d'histones [68] et de protéines antimicrobiennes sont libérées dans le liquide extracellulaire [54]. Ces fibres, appelées « neutrophil extracellular traps (NETs) », forment une maille qui attrape, immobilise et détruit les micro-organismes au site de l'inflammation [66]. De manière générale, les NETs font partie de la réponse immunitaire aux infections bactériennes, fongiques et parasitaires, cependant, ils sont associés aussi à des maladies auto-immunes [68].

La mort des neutrophiles lorsque l'infection est maîtrisée est un mécanisme préconditionné qui fait partie du processus de résolution de l'inflammation. Ceci évite une réponse inflammatoire exagérée avec des conséquences néfastes sur les tissus environnants à cause de la libération du contenu des granules [67]. Cette mort constitutive est connue comme l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire organisée et contrôlée qui est exécutée au niveau moléculaire par des membres de la famille des caspases. Ce processus implique la fragmentation de l'ADN et du noyau, le rétrécissement cellulaire et l'agrégation d'éléments cytoplasmiques. Les cellules apoptotiques sont rapidement phagocytées par les macrophages évitant ainsi une réaction inflammatoire [69]. Étant donné les armes hautement efficaces de neutrophiles contre les agents pathogènes qui comprennent des enzymes protéolytiques et la production des ROS et des NETs, l'inhibition de leur afflux au site d'infection, la régulation de leur fonctions de défense, conjointement avec leur apoptose une fois l'infection est contrôlée, constituent des processus essentiels dans la résolution de l'inflammation, la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie [70].

1.5.4.2 Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des cellules spécialisées qui attaquent les parasites comme les vers, interviennent dans les réactions allergiques [62] et contribuent dans la réponse immunitaire aux infections bactériennes et virales [67]. Semblable aux neutrophiles, les éosinophiles contiennent des granules cytoplasmiques dont leur contenu peut être libéré à la suite de leur activation. Cette dégranulation peut être le résultat d'une cytolyse programmée ou de la libération du contenu des granules dans l'espace extracellulaire [67]. Parmi les molécules effectrices des granules, il se trouvent des protéines cationiques, des cytokines, des facteurs de croissance et des médiateurs lipidiques. Certaines de ces molécules contribuent soit au maintien de la réponse immunitaire par une fonction cytolytique soit à la résolution de celle-ci, participant à la restauration de l'homéostasie [67].

1.5.4.3 Les basophiles

Les basophiles se caractérisent par la présence de récepteurs FcεRI sur leur surface membranaire qui ont une haute affinité pour les anticorps IgE. Ces cellules mûrissent dans la moelle osseuse et migrent vers les tissus en présence des médiateurs comme l'interleukin-3 (IL-3) [67]. Une fois les basophiles sont activées par la fixation des antigènes aux IgE précédemment liés aux récepteurs FcεRI, un processus de dégranulation est déclenché. Parmi les médiateurs libérés, il se trouvent de l'histamine, des cytokines et de l'héparine. Leur niveau de sécrétion est relié à la charge d'allergènes, ce qui détermine le degré de la réaction allergique [67].

1.5.4.4 Les monocytes

Les monocytes sont des phagocytes qui jouent un rôle important dans la détection d'agents pathogènes. Ils sont produits dans la moelle osseuse et circulent dans le sang pour quelques heures avant de s'installer dans les tissus où ils finissent leur maturation et deviennent des macrophages [54]. S'ils ne sont pas recrutés au niveau tissulaire, ils déclenchent un processus d'apoptose spontanée. Dans des conditions inflammatoires, ils sont attirés vers la zone cible par des chimiokines où ils internalisent les antigènes. Ces cellules accomplissent la phagocytose, la sécrétion de cytokines, la production ROS et de l'oxyde nitrique (NO) pour combattre les agents

exogènes. Ils stimulent la réparation tissulaire et se différencient en macrophages pro-inflammatoires M1 [67].

1.5.4.5 Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules du système immunitaire adaptatif. La réponse immunitaire produite par ces cellules est adaptée à chaque agent pathogène. Ils se trouvent dans les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus et les amygdales, et en petite quantité en transit dans le sang. Même si leurs précurseurs sont produits dans la moelle osseuse, une partie de leur production vient des tissus lymphoïdes [54].

Les lymphocytes sont divisés en lymphocytes B et T. Les lymphocytes B sont les cellules spécialisées dans la production des anticorps [71]. La liaison de l'antigène à son récepteur sur les cellules B (BCR) active leur différenciation en plasmocytes. Ces derniers produisent des anticorps spécifiques de l'antigène rencontré. Ces anticorps se lient aux antigènes afin de les neutraliser et de les empêcher de nuire comme dans le cas des toxines ou des virus. Ils peuvent également assister le système immunitaire inné dans l'identification d'antigènes en se liant à ceux-ci, ce qui attire les molécules du complément ou directement les phagocytes [62].

Les lymphocytes T sont spécialisés dans les réponses à médiation cellulaire. Il en existe 3 sous-populations, à savoir, les lymphocytes T auxiliaires (T_H), les lymphocytes T cytotoxiques (T_C) et les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}). À l'opposé des lymphocytes B qui peuvent être activés par le contact direct avec l'antigène, l'activation de lymphocytes T dépend non seulement de la liaison de leur récepteur (récepteurs des lymphocytes T (TCR)) avec l'antigène exogène, mais aussi avec un antigène du soi (molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)) [62]. L'activation de cellules T_H induit leur différenciation en cellules effectrices qui potentialisent l'activation des cellules B, T_C et macrophages. L'activation de cellules T_C leur permet d'attaquer directement les cellules pathogènes, les cellules infectées par des virus et les cellules cancéreuses. Pour leur part, les cellules T_{reg} ont un rôle dans la suppression ou la régulation de la réponse immunitaire [72].

Une revue de la littérature sur certains constituants clés du système immunitaire sera faite plus bas, afin de compléter cette dernière section et couvrir les modèles biologiques utilisés dans les études de biocompatibilité décrits à la section 1.7.

1.6 Le système immunitaire

Le système immunitaire est un système complexe équipé d'une variété d'organes, de cellules et de protéines qui participent dans la reconnaissance des agents pathogènes (virus, bactéries et parasites) et produisent une réponse immunitaire adaptée à cette menace. Il reconnaît également les cellules anormales comme les cellules cancéreuses et celles infectées par des virus. Il est divisé en deux grandes catégories. L'immunité innée et l'immunité adaptative [62].

1.6.1 L'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense du système immunitaire. Elle entre en fonction une fois les barrières épithéliales, telles que la peau et les muqueuses, ont été traversées par les micro-organismes [71]. Elle est constituée de cellules et de protéines qui reconnaissent les agents pathogènes et les attaquent de manière non spécifique. Ses principaux intervenants sont les neutrophiles, les macrophages et certaines protéines plasmatiques. Ce système est mis en marche par des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) présents sur les agents pathogènes et les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) libérés par des cellules endommagées [62]. Ces motifs sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR), comme les récepteurs toll-like (TLR), présents sur les membranes cellulaires ou endosomales des phagocytes. Ainsi, les phagocytes identifient leur cible grâce aux TLR ou par les opsonines (anticorps et protéines du complément) qui recouvrent les envahisseurs et les marquent pour être phagocytés. L'activation des phagocytes déclenche donc l'englobement des agents pathogènes, leur élimination et la production des médiateurs inflammatoires comme les cytokines [62].

1.6.1.1 La réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse immunitaire non spécifique déclenchée par l'invasion des agents pathogènes ou par des dommages tissulaires. Cette réaction enchaîne une série d'évènements où des phagocytes et des protéines plasmatiques sont attirés vers la zone cible, afin d'éliminer les pathogènes et retirer les débris, ce qui amène à la guérison et au retour à l'homéostasie [62]. La présence des microbes dans une blessure active les macrophages résidents et les mastocytes.

Les premiers commencent le processus de phagocytose et de destruction intracellulaire du pathogène, conjointement avec la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Les derniers libèrent l'histamine qui dilate les vaisseaux sanguins locaux et augmente la perméabilité capillaire. La vasodilatation permet l'arrivée des leucocytes phagocytaires et des protéines plasmatiques, comme celles du système du complément ainsi que des facteurs de coagulation [62]. Les chimiokines sécrétées par les phagocytes activés guident alors le recrutement des neutrophiles et des monocytes. Ces cellules émigrent de la circulation sanguine vers la zone affectée par des processus de ralentissement, roulement, adhésion et transmigration [73]. Ces étapes sont assistées par les sélectines (molécules d'adhésion cellulaire) qui participent au ralentissement et au roulement des cellules sur les parois intérieures du vaisseau, et également par les intégrines qui interagissent avec les phagocytes pour faciliter leur adhérence [74]. Une fois sur place, les monocytes se différencient en macrophages, qui entament le processus d'engloutissement et d'élimination des pathogènes. Suite au recrutement cellulaire et à l'afflux des protéines plasmatiques, il apparaît les signes caractéristiques de l'inflammation tels que le gonflement, la rougeur, la chaleur et la douleur [62]. Finalement, le retour à l'homéostasie est atteint, après que le « nettoyage » des pathogènes et des débris ait été achevé par les phagocytes et que les mécanismes de réparation tissulaire aient été mis en marche.

1.6.1.2 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires qui ont un rôle crucial dans la réponse inflammatoire du système immunitaire contre les agents pathogènes. Ils sont impliqués dans l'activation, la régulation et la résolution de l'inflammation [67]. Leurs précurseurs sont les monocytes, lesquels migrent vers les tissus pour se différencier en macrophages [72]. Les macrophages sont équipés d'une variété de récepteurs de surface comme les TLR qui les aident à reconnaître les agents envahisseurs. L'opsonisation des microorganismes par des molécules du complément ou des anticorps les guident également dans la reconnaissance des éléments à phagocyter. Parmi ces cibles, on retrouve les agents pathogènes, les particules exogènes, ainsi que les débris cellulaires et les cellules mortes [72]. Le processus de phagocytose, qui active les cellules, est déclenché par la liaison des antigènes à leurs récepteurs et la formation d'un phagosome. Ce dernier fusionne ensuite avec un lysosome pour former un phagolysosome. Les

lysosomes contiennent des enzymes hydrolytiques qui aident à digérer les agents pathogènes. [72]. Une fois activés, ils augmentent leur capacité phagocytaire et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que les interleukines -1 et -6 (IL-1 et IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), qui déclenchent la réponse inflammatoire aiguë [72].

Parmi les armes qui aident les macrophages à combattre les microbes, on retrouve les ROS et les espèces azotées réactives (RNS). La phagocytose déclenche la production des ROS par le complexe enzymatique nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, et les microbes se font attaquer par les ROS à l'intérieur du phagosome [74]. L'association du superoxyde, généré par le complexe NADPH, avec le NO produisent les RNS. Ces derniers ont une puissance antimicrobienne supérieure à celle du NO. De surcroît, les macrophages activés augmentent l'expression de la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) qui produit le NO. Le NO à son tour élargit le pouvoir antimicrobien des macrophages [74].

Bien que la production de ROS et du NO est bénéfique pour combattre les microbes dans une réponse inflammatoire, leur production élevée par des nanomatériaux nuit aux cellules et conduit au stress oxydatif. Le stress oxydatif est produit quand le niveau de ROS dépasse la capacité antioxydante de la cellule [28]. Une production élevée de ROS peut conduire à une réponse inflammatoire, une cytotoxicité, une génotoxicité et/ou une peroxydation lipidique, parmi d'autres effets [28, 75, 76]. Étant donné que certaines nanoparticules ont la propriété d'induire la production des ROS et de NO, l'évaluation des effets liés au stress oxydatif est primordiale dans l'estimation de leur profil d'innocuité.

1.6.1.3 Le rôle des médiateurs pro- et anti-inflammatoires

Les cytokines sont des molécules de signalisation de petit poids moléculaire [77] qui servent de moyen de communication cellulaire afin de coordonner les réponses pro- et anti-inflammatoires. L'intensité et la durée de ces réponses sont contrôlées par ces médiateurs [78]. Elles sont sécrétées par les cellules immunitaires telles que les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T, ainsi que par d'autres cellules comme les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les cytokines exercent des fonctions endocrines ou paracrines sur d'autres

cellules et les stimulent pour organiser les réactions de défense contre les agents pathogènes [62] ou pour participer à la réparation tissulaire [77].

Parmi les cytokines les plus importantes dans les réponses immunitaires, on retrouve l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α [62]. Elles servent à promouvoir l'inflammation aiguë et sont aussi des agents pyrogènes qui, en stimulant la libération de prostaglandines, augmentent la température corporelle pour contrôler la propagation des pathogènes dans le sang. De surcroît, elles sont aussi impliquées dans l'activation des cellules endothéliales [77] et la réduction de la concentration plasmatique du fer, élément essentiel à la multiplication des bactéries [62].

De manière séparée, le TNF- α a d'autres fonctions, comme la stimulation des mastocytes afin de libérer l'histamine requise pour la vasodilatation, dans les premières étapes de la réponse inflammatoire. Également, le TNF- α participe au recrutement des neutrophiles et la stimulation de cellules endothéliales vasculaires pour augmenter l'expression des molécules d'adhésion [79]. Il augmente sa propre production et celle de l'IL-1 et de l'IL-6 en stimulant les macrophages. De son côté, l'IL-1 intervient dans la prolifération et l'activation des lymphocytes B et T [62, 71]. L'IL-6 a un rôle dans la différenciation des cellules B et le recrutement des neutrophiles [79]. Une autre molécule avec un rôle important dans les réponses inflammatoires est la chimiokine ou l'interleukine-8 (IL-8), qui participe au recrutement et à l'activation des leucocytes, spécialement les neutrophiles [77].

Le but de la réponse inflammatoire est l'élimination des agents pathogènes, et/ou l'initiation du processus de réparation et retrait des débris cellulaires à la suite d'une lésion tissulaire [62]. Cependant, une réponse inflammatoire exagérée peut causer des dommages tissulaires. Afin de contrôler ce risque et de garantir le retour à l'homéostasie, d'autres types de cytokines sont secrétées avec un rôle opposé. L'interleukine-10 (IL-10) est produite pour réguler et contrebalancer l'inflammation excessive, en diminuant l'expression des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 [79]. Pour sa part, l'interleukine-4 (IL-4) est impliquée dans l'activation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire M2, qui jouent un rôle dans la réparation tissulaire [80]. L'IL-4 a aussi un rôle dans la régulation de la réaction allergique et dans la réponse immunitaire contre les parasites [79].

Bien que les mécanismes de régulation de la production des cytokines soient bien établis, l'interaction des nanomatériaux avec les cellules immunitaires peut altérer cet équilibre et déclencher des réponses d'immunostimulation ou, au contraire, d'immunosuppression [81]. Une production élevée des cytokines pro-inflammatoires par des nanoparticules a déjà été associée à une hypercytokinémie, une CIVD [82] ou un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) [83]. L'hypercytokinémie ou la tempête de cytokines est une condition caractérisée par une réponse inflammatoire exagérée, avec une production excessive de cytokines, déclenchée par un agent pathogène. La fièvre, l'éruption cutanée et la diarrhée, entre autres, sont les symptômes associés à cette condition [84]. La progression incontrôlée de l'hypercytokinémie peut conduire au SIRS [83] et à la CIVD [84]. Le SIRS est une réponse inflammatoire généralisée induisant diverses manifestations cliniques telles que la tachycardie, l'hyperthermie, la leucocytose ou la leucopénie, entre autres [85]. La CIVD, telle que discutée auparavant, est caractérisée par la formation de thrombus et l'occlusion des vaisseaux sanguins, en plus d'être accompagnée d'hémorragies étant donné que les éléments nécessaires pour une coagulation normale ne sont pas disponibles [61]. En vue de ces pathologies graves, l'évaluation de la capacité inhérente de nanoparticules à stimuler la sécrétion de cytokines fait partie intégrante de la batterie des tests de toxicité. À cette fin, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), constituées de lymphocytes et de monocytes [86], sont considérées comme des modèles prédictifs de l'induction des médiateurs pro-inflammatoires par les nanoparticules dans les systèmes biologiques [83].

1.6.2 L'immunité adaptative

L'immunité adaptative est constituée des lymphocytes T et B qui élaborent une réponse immunitaire coordonnée et spécifique à chaque agent pathogène envahissant [71]. Chaque lymphocyte ne reconnaît qu'un seul agent pathogène. Ainsi, ce système s'adapte en créant des colonies de lymphocytes spécifiques pour la menace à laquelle il fait face. De surcroît, les lymphocytes sont capables de reconnaître les pathogènes auxquels ils ont déjà été exposés, grâce à la mémoire immunologique, ce qui favorise une réponse plus rapide et efficace [62]. Il existe deux mécanismes dans la réponse immunitaire adaptative, à savoir : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. La première est médiée par des anticorps produits par les plasmocytes, dérivés des lymphocytes B, et la deuxième est médiée par les lymphocytes T activés. Les

lymphocytes B reconnaissent les agents pathogènes et les attaquent en produisant des anticorps spécifiques. En revanche, les lymphocytes T attaquent directement les cellules envahissantes ou les cellules endogènes comme les cellules infectées ou cancéreuses [62].

1.6.3 Les récepteurs toll-like (TLRs)

Les TLRs sont un groupe de récepteurs membranaires ou endosomales appartenant à la famille des PRRs et qui sont exprimés spécialement par les cellules du système immunitaire. Ces récepteurs reconnaissent des PAMPs présents sur les bactéries, les virus et les parasites [74]. Il existe 11 TLRs identifiés chez l'humain (tableau 1) et 12 chez la souris. Les TLRs sont constitués d'un domaine extracellulaire, un transmembranaire et un intracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé de motifs riches en leucine (LRR) qui contiennent le site de fixation des PAMPs [74]. Le domaine intracellulaire du récepteur est connu comme le domaine « Toll-IL-1-resistance » (TIR), lequel s'associe aux protéines adaptatrices qui permettent la transduction du signal, ce qui aboutit généralement à la production des médiateurs pro-inflammatoires [74]. Certains TLRs fonctionnent en dimères avec eux-mêmes (homodimères) ou avec d'autres TLRs (hétérodimères). Ainsi, cette association définit le type de PAMPs qu'ils reconnaissent [74]. Parmi les voies de signalisation des différents TLRs, celles des récepteurs TLR-4 et TLR-3 seront décrites plus en détail.

TLRs	Ligands	Microbes
TLR-1	Lipopeptides de Triacyl	Mycobactéries
TLR-2	Peptidoglycanes, lipoprotéines, zymosane	Bactéries Gram positif, mycobactéries, levure et champignons
TLR-3	ARN double brin (dsARN)	Virus
TLR-4	Lipopolysaccharide (LPS)	Bactéries Gram négatif
TLR-5	Flagelline	Bactéries
TLR-6	Lipopeptides de diacyl, zymosane	Mycobactéries, levure et champignons
TLR-7	ARN simple brin (ssARN)	Virus
TLR-8	ARN simple brin (ssARN)	Virus
TLR-9	ADN avec des séquences CPG non méthylées, virus de l'herpès	ADN bactérien, virus de l'herpès
TLR-10, TLR-11	Inconnu	Inconnu

Tableau 1. – Description de différents types de TLRs chez l'humain.

Adapté et modifié de Kindt et al [74]

1.6.3.1 TLR-4

Le TLR-4 est l'un des TLRs les plus étudiés grâce à son rôle dans la reconnaissance du LPS et l'activation de la réponse immunitaire. Le LPS est une molécule constituée d'une portion A lipidique et d'un polysaccharide (antigène O et noyau), qui se trouve dans les parois de bactéries Gram négatif, comme l'*Escherichia coli* et la *Salmonella spp.* [87]. La portion A lipidique, connue également sous le nom d'endotoxine, est responsable de l'activation de la réponse inflammatoire. La reconnaissance du LPS par le TLR-4 est un processus qui implique plusieurs groupes de protéines [87]. Suite à une infection, la réplication et la mort des bactéries libèrent le

LPS ancré dans leurs parois. Une fois dans le sérum, le LPS est lié par la protéine de liaison au LPS (LBP) et ensuite transféré à la protéine CD14 qui est présente soit en forme soluble ou ancrée dans la membrane des cellules immunitaires. Le CD14, dont le rôle est l'amélioration de l'affinité de la liaison du LPS au récepteur, transfère le LPS au complexe TLR-4/MD-2 [87]. Une fois le TLR-4 activé, celui-ci forme un homodimère et son domaine TIR recrute des protéines adaptatrices afin que le signal soit transduit. Il existe deux voies intracellulaires pour la transduction du signal, à savoir: la voie de « Myeloid differentiation primary response 88 » (MyD88) qui est activée au niveau de la membrane plasmique et la voie « TIR domain-containing adaptor inducing interferon β » (TRIF) qui est activée par l'endocytose du complexe TLR-4/LPS [87]. Un schéma représentant les voies de signalisation du TLR-4 est présenté dans la figure 6.

La voie dépendante de MyD88 : la transduction du signal au niveau de la membrane plasmique recrute la protéine « MyD88-adaptor-like » (Mal) au domaine TIR, qui à son tour recrute MyD88. Ensuite, l'activation d'une série de protéines intermédiaires aboutit à l'activation de la voie d'I κ B kinase (IKK) / facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) [87]. Le NF- κ B est un facteur de transcription qui se trouve dans le cytoplasme sous forme inactive grâce à son association avec la protéine inhibitrice I κ B. Une fois que le complexe IKK (IKK α , IKK β) est activé par un signal en amont, celui-ci phosphoryle I κ B, ce qui conduit à sa dégradation, puis à la libération de NF- κ B. L'activation de NF- κ B permet sa translocation au noyau, l'activation de la transcription de ses gènes cibles et la production de médiateurs pro-inflammatoires [88]. Le NF- κ B régule l'expression des divers gènes qui sont impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, parmi d'autres fonctions biologiques [89]. La voie de MyD88 peut également aboutir à l'activation de la famille des « mitogen activated protein kinases » (MAPKs). Cette famille est constituée de p38 MAP kinase, de c-Jun NH2-terminal kinases (JNK) et de « extracellular signal-regulated protein kinases » (ERK). Les MAPKs jouent un rôle important dans la transduction du signal et participent à la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'inflammation [89]. Cette famille active différents facteurs de transcription comme la protéine activatrice 1 (AP-1) [88]. L'activation d'AP-1 et NF- κ B induit la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-12, IL-6 et le TNF- α [89].

La voie dépendante de TRIF : la transduction du signal au niveau de la membrane endosomale commence par le recrutement de « TRIF-related adaptor molecule » (TRAM) et TRIF et aboutit à l'activation de la voie de « Interferon regulatory factor 3 » (IRF-3), de la voie de NF- κ B ou de la voie de MAPKs, avec la production d'interférons de type I pour la première voie et des cytokines pour les deux dernières, respectivement [87].

Bien que l'activation de TLR-4 ait un rôle clé dans la réponse immunitaire, une production excessive de médiateurs pro-inflammatoires à la suite de son activation, peut conduire à une tempête de cytokines, à la CIVD [82] et au SIRS [83], comme discuté dans la section 1.6.1.3.

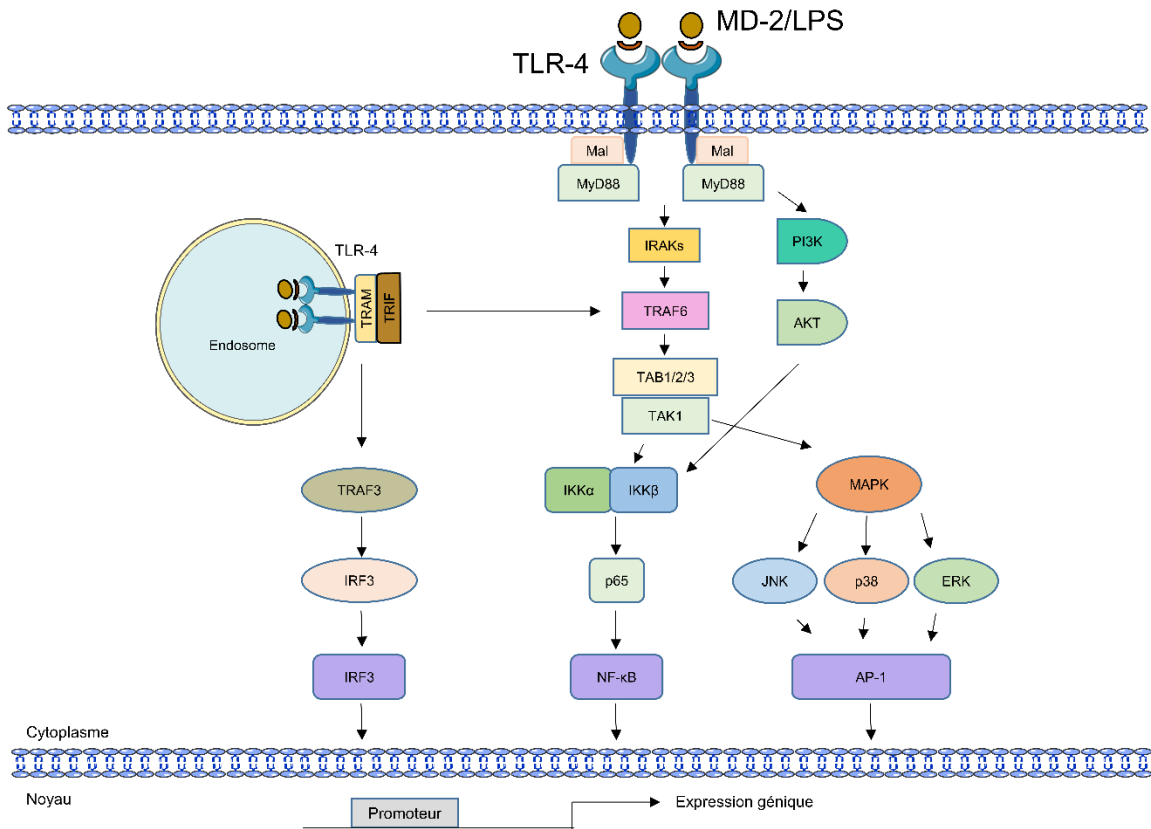


Figure 6. – Vue générale sur les différentes voies de signalisation du TLR-4.

La détection du LPS par le complexe TLR-4/MD-2 active le récepteur ce qui provoque la formation d'un homodimère. La transduction du signal intracellulaire est faite par deux voies distinctes. La voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF. La première voie débute la transduction du signal à partir de la membrane plasmique et recrute les protéines adaptatrices Mal et MyD88 au domaine TIR du récepteur. Ensuite le signal est transduit par une série de protéines jusqu'à l'activation du complexe IKK et/ou les MAPKs. Ceci aboutit à l'activation des facteurs de transcription tels que NF-κB et AP-1 qui stimulent la production des cytokines pro-inflammatoires. De son côté, la voie dépendante de TRIF débute la transduction du signal dans la membrane endosomale et recrute les protéines TRAM et TRIF au domaine TIR pour aboutir dans l'activation de la voie d'IRF-3 et/ou les voies d'IKK et de MAPKs. Adaptée de Monie et al [87].

Le TLR-4 a été associé à la reconnaissance du chitosane spécialement par deux études. Ces dernières ont conclu que le chitosane a la capacité d'activer les cellules dendritiques (DC) et que cette activation est médiée par le TLR-4. La première étude a démontré cette hypothèse par l'exposition des DC au chitosane où une surexpression des marqueurs membranaires qui témoignent de leur activation, telles que les molécules du CMH de classe II, a été observée, comparée à la diminution de ces mêmes molécules avec des cellules dendritiques dérivées de souris déficientes en TLR-4 [40]. La deuxième étude a également montré que les oligosaccharides de chitosane induisent la surexpression des CMH de classe II et le corécepteur CD86, en plus d'augmenter la sécrétion de TNF- α . Cependant, l'expression de ces molécules et la production de cette cytokine ont diminué dans des DC transfectées avec le siRNA-TLR-4 en présence du chitosane [42]. Bien que ces deux études montrent de façon convaincante que le TLR-4 peut être impliqué dans la reconnaissance des dérivés du chitosane, aucune de ces publications n'a testé le niveau de contamination du chitosane par les endotoxines, ce qui nuit à l'interprétation des résultats, car le LPS est un activateur du TLR-4 et donc des DC.

1.6.3.2 TLR-3

Le TLR-3 est un des TLR localisé dans l'endosome. L'activation du récepteur TLR-3 par l'ARN double brin (dsARN) viral, induit la formation d'un homodimère et le recrutement de TRIF au domaine TIR du récepteur. La transduction du signal passe par des protéines intermédiaires et aboutit à l'activation du facteur de transcription IRF-3, qui induit l'expression des interférons de type I tels que l'IFN α et l'IFN β [67] (figure 7). Les interférons, connus comme des cytokines antivirales, ont un rôle dans l'inhibition de la réplication du virus et de la prolifération cellulaire, parmi d'autres fonctions [79]. Le signal peut aboutir également à l'activation de la voie NF- κ B via « tumour necrosis factor receptor associated factor 6 » (TRAF6) et la production de cytokines pro-inflammatoires [90].

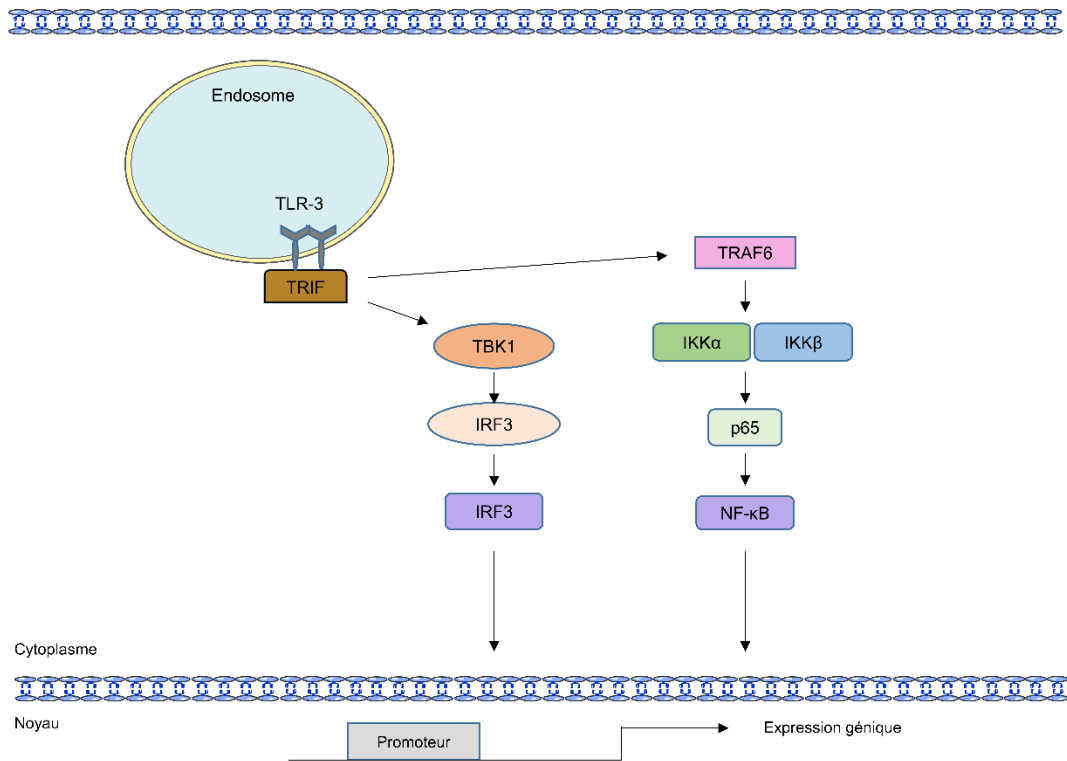


Figure 7. – Représentation des voies de signalisation du TLR-3.

L'activation du récepteur TLR-3 recrute TRIF qui transduit le signal vers « TANK binding kinase 1 » (TBK1) ou TRAF6 pour aboutir à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB, respectivement, lesquels stimulent la production d'interférons de type I pour le premier et des cytokines pro-inflammatoires pour le deuxième. Adaptée de Akira et al [90]

1.6.4 Les récepteurs de lectine de type C (CLR)

Les CLR sont une grande famille de récepteurs et molécules, dont certains appartiennent au grand répertoire des PRRs. De la même manière que les TLRs, ils reconnaissent des motifs moléculaires spécifiques des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus et les champignons [67]. Les CLR avec des fonctions de PRR peuvent être divisés en 4 groupes selon

leur domaine cytoplasmique, à savoir : « immunoreceptor tyrosine-based activation motif » (ITAM), hemITAM, couplé à l'ITAM et ITIM. Ces domaines sont des groupes clés de la transduction du signal et le recrutement de « spleen tyrosine kinase » (SYK), une protéine kinase nécessaire pour certains CLRs [67]. Parmi tous les récepteurs CLRs, le dectin-1 et le MR seront décrits plus en détail.

1.6.4.1 Dectin-1

Le dectin-1 est un récepteur exprimé par des macrophages, monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques, entre autres. Il reconnaît des β -glucanes présentes au niveau de la paroi des levures. Notamment, il participe à la reconnaissance et la réponse antifongique contre la *Candida albicans*, le *Pneumocystis carinii* et l'*Aspergillus fumigatus*. L'activation du dectin-1 par son ligand est suivie de la formation d'un homodimère et le recrutement de SYK au niveau du domaine hemITAM [67]. SYK est une protéine clé pour la transduction du signal et sa phosphorylation déclenche la formation d'un complexe de protéines CARD9/Bcl-10/MALT-1, connu sous le nom de « signalosome ». L'activation de ce complexe peut activer à son tour la voie d'IKK/NF- κ B et de MAPKs (figure 8). L'activation de dectin-1 déclenche la phagocytose, la production de ROS et des cytokines pro-inflammatoires et/ou l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 [67]. Parmi les cytokines induites par l'activation de ce récepteur se trouvent: IL-2, IL-10, IL-6, TNF- α et IL-23. De plus, l'IL-1 β est aussi produit en conséquence de l'activation de la voie NLRP3 [91].

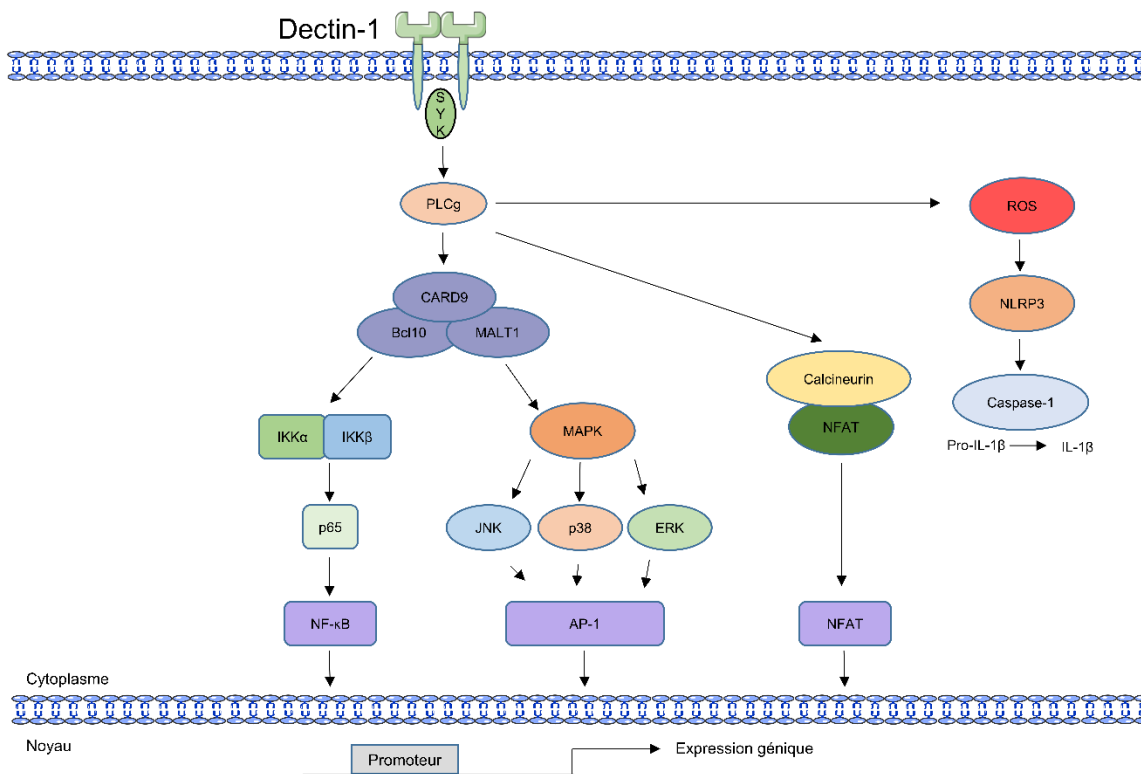


Figure 8. – Voie de signalisation du dectin-1.

La fixation de l'agoniste du récepteur Dectin-1 provoque l'activation et l'homodimérisation du récepteur, en plus du recrutement de la protéine kinase SYK. La phosphorylation de SYK recrute et active le complexe CARD9/Bcl-10/MALT-1, qui à son tour peut activer les voies de NF-κB et de MAPKs. La phosphorylation de SYK peut également mener à l'activation du facteur de transcription « nuclear factor of activated T cell » (NFAT) ou stimuler la production de ROS qui a un rôle dans l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 et la subséquente sécrétion d'IL-1β. Adaptée de Sancho et al [91].

1.6.4.2 Récepteur de mannose

Le MR est un récepteur exprimé principalement par des macrophages et des cellules dendritiques, où il joue un rôle dans l'endocytose et la phagocytose. Ses 8 domaines de reconnaissance des glucides participent à la détection et la fixation du mannose, le fucose, le N-acétylglucosamine et les glycanes sulfatés présents dans certains agents pathogènes [91]. Il a également un rôle dans la reconnaissance des molécules endogènes comme certaines glycoprotéines et dans leur élimination [92]. Parmi ses fonctions, il participe à la reconnaissance et la phagocytose du *Pneumocystis spp.* chez les macrophages alvéolaires humains [93] et certaines études suggèrent que le MR favorise la signalisation et/ou la phagocytose d'autres récepteurs [91], comme le DC-SIGN dans l'internalisation du *Candida albicans* [94]. Bien que la voie de signalisation du MR ne soit pas connue à ce jour, l'activation du MR a déjà été associée à la phosphorylation de la protéine kinase SYK, dans la phagocytose du *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)* chez les macrophages humains (figure 9) [95].

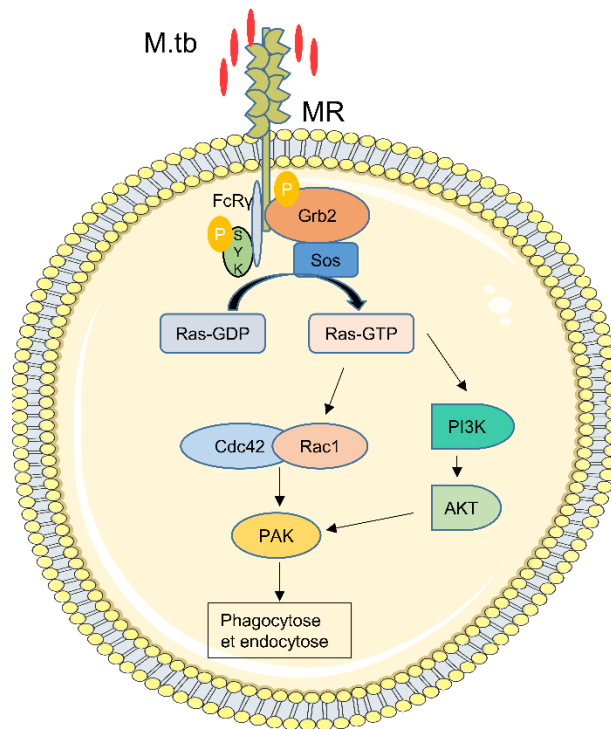


Figure 9. – Voie de signalisation du récepteur de mannose.

Malgré que la voie de signalisation intracellulaire du MR est inconnue, une étude sur la phagocytose du M.tb médiée par le MR a associé le recrutement de SYK à la partie cytoplasmique du récepteur, aussi bien que le recrutement et l'activation de la molécule adaptatrice Grb2 et des protéines Cdc42, Rac1 et PAK qui ont un rôle important dans la phagocytose de cette bactérie. Adaptée de Rajaram et al [95].

Le MR a été associé à la reconnaissance des dérivés du chitosane, tel que décrit par deux études. La première montre la diminution de l'internalisation d'oligochitosanes en présence des ligands du MR, comme le mannose et le fucose, ce qui suggère une compétition au niveau du récepteur [45]. La deuxième étude montre une réduction dans la capacité de ces mêmes dérivés à induire la sécrétion du TNF- α suite au blocage du MR par des anticorps anti-MR [44]. À notre

connaissance, il n'existe pas de démonstration directe de la liaison du chitosane au MR et les seules preuves de la reconnaissance du chitosane par le MR reposent sur les résultats de ces deux études mentionnées ci-haut.

1.7 La biocompatibilité des nanoparticules

La biocompatibilité est une propriété cruciale pour les matériaux qui sont en contact direct avec les tissus biologiques. Elle est définie comme la capacité d'un biomatériau à effectuer sa fonction sans causer de la toxicité aux tissus environnants [96]. Le potentiel toxique des nanoparticules a été associé à leurs caractéristiques physicochimiques comme la taille, la charge, la composition chimique, la morphologie [97, 98], l'agrégation, la solubilité [99] et la superficie [98] sans oublier la route d'administration [97]. Les trois premières propriétés sont les plus étudiées dans la littérature. Ainsi, la taille influence la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé (MPS) [98], la distribution et l'accumulation dans des organes comme le foie, la rate et les reins [99]. La charge détermine l'interaction électrostatique avec des protéines et des cellules, en plus d'améliorer l'internalisation cellulaire [25]. Finalement, la composition est un facteur décisif qui influence la toxicité, car des matériaux naturels et biodégradables sont plus biocompatibles que les nanomatériaux inorganiques, comme les particules métalliques qui ont tendance à s'accumuler dans le corps et présentent une toxicité à long terme [100].

Les études de biocompatibilité comprennent une panoplie de tests qui évaluent l'effet des nanomatériaux sur les cellules, les composants du sang et le système immunitaire, parmi d'autres. Actuellement, il n'existe aucune harmonisation dans l'évaluation toxicologique des nanomatériaux. L'hétérogénéité des protocoles expérimentaux utilisés dans la littérature et l'omission d'informations sur les propriétés physicochimiques des nanoformulations et leur niveau de contamination aux endotoxines, complexifient l'interprétation des résultats. Cependant, le cadre réglementaire applicable aux dispositifs médicaux et/ou aux médicaments sert de guide pour l'évaluation de l'innocuité préclinique de nouvelles formulations basées sur la nanotechnologie [101]. La norme ISO 10993-1 :2009 [102] et l'ASTM F748 – 06 [103] présentent de façon détaillée les catégories des essais pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux.

La pertinence de chaque test dépendra de la fonction du matériau et du type de contact que celui-ci aura avec les tissus biologiques [102]. Ces normes ont été vérifiées et adaptées aux nanomatériaux et de nouvelles publications font partie du cadre normatif.

1.7.1 Lignes directrices

L'introduction de la nanotechnologie dans les applications biomédicales a représenté un défi au niveau de l'évaluation toxicologique des nouvelles nanoformulations, car les propriétés physicochimiques particulières de celles-ci les situent en dehors du cadre des lignes directrices existantes. Cette situation a encouragé les organismes de normalisation comme le « International Organization for Standardization » (ISO) et la « American Society for Testing and Materials » (ASTM) à créer de nouvelles normes adaptées aux nanomatériaux, ou à réévaluer celles déjà publiées comme c'est le cas de « Organisation for Economic Co-operation and Development » (OECD) [104, 105]. Dans le même effort de standardisation, le « Nanotechnology Characterization Laboratory » (NCL) a été créé par l'Institut National du Cancer (NCI) des États-Unis en collaboration avec la « Food and Drug Administration » (FDA) et le « National Institute of Standards and Technology » (NIST) afin de réaliser et faciliter l'évaluation réglementaire des nouvelles nanoformulations [106]. De son côté, l'agence sanitaire FDA a créé le Groupe de Travail sur la Nanotechnologie « Nanotechnology Task Force » pour faire face et guider le processus de soumission de produits qui intègrent la nanotechnologie [107].

Un résumé des lignes directrices applicables aux nanomatériaux est présenté dans le tableau 2.

Comité technique: ISO/TC 229 - Nanotechnologie [108]		
Norme	Description	Test / Objectif
ISO/TR 22019:2019	Nanotechnologies - Considérations pour réaliser des études toxico-cinétiques de nanomatériaux	Contexte pour des études toxico-cinétiques.
ISO 19007:2018	Nanotechnologies - Analyse du MTS <i>in vitro</i> pour la mesure de l'effet cytotoxique des nanoparticules	Viabilité cellulaire
ISO/TR 10993-22:2017 * Comité ISO/TC 194	Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 22: Lignes directrices sur les nanomatériaux	Évaluation biologique de dispositifs médicaux qui contiennent des nanomatériaux
ISO/TR 16196:2016	Nanotechnologies — Compilation et description de la préparation des échantillons et des méthodes de dosage pour les nanomatériaux d'ingénierie et manufacturés	Préparation des échantillons
ISO/TS 19337:2016	Nanotechnologies — Caractéristiques des suspensions de nano-objets utilisées pour les tests <i>in vitro</i> évaluant la toxicité inhérente aux nano-objets	Préparation des échantillons pour les tests toxicologiques
ISO/TS 19006:2016	Nanotechnologies — Essai au diacétate de 5-(et 6)-Chlorométhyle -2',7' Dichloro-dihydro-fluorescéine (CM-H2DCF-DA) pour l'évaluation de la génération intracellulaire des ROS induites par les nanoparticules sur la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7	Production de ROS
ISO/TR 16197:2014	Nanotechnologies — Compilation et description des méthodes de criblage toxicologique pour les nanomatériaux manufacturés	Résumé de tests toxicologiques
Comité technique: ASTM E56.03 [109]		
ASTM E2524 - 08 (2013)	Méthode d'essai standard pour l'analyse des propriétés hémolytiques des nanoparticules	Dommages aux globules rouges mesurés par la libération d'hémoglobine
ASTM E2526 - 08 (2013)	Méthode d'essai standard pour l'évaluation de la cytotoxicité des matériaux nanoparticulaires dans les cellules rénales porcines et les cellules d'hépatocarcinome humain	Viabilité cellulaire
NCL [110]		
ITA-1	Hémolyses	Dommages aux globules rouges mesurés par la libération d'hémoglobine
ITA-2.1, ITA-2.2	Agrégation plaquettaire	Agrégation plaquettaire
ITA-5.1, ITA-5.2	Activation du complément	Activation du complément détecté par le clivage du complément 3 (C3).
ITA-12	Temps de coagulation plasmatique	Mesure du temps de prothrombine (TP), le temps de thromboplastine partielle activée (APTT) et le temps de thrombine (TT)
ITA-7	Production de NO	Production de NO.
ITA-10	Préparation de sang total humain et de PBMC pour l'analyse de cytokines, de chimiokines et d'interférons	Mesure de cytokines.

GTA-1, GTA-2	Cytotoxicité	Viabilité cellulaire
GTA-7	Dosage des ROS	Production des ROS
Comité technique: OECD Groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés SG4 [111]		
ENV/JM/MONO(2018)4	Évaluation des méthodes <i>in vitro</i> utilisées pour estimer les risques pour l'homme appliquées dans le programme d'essais de l'OECD pour la sécurité des nanomatériaux manufacturés	Révision des normes et leur applicabilité aux nanomatériaux
ENV/JM/MONO(2016)24	Toxicocinétique des nanomatériaux fabriqués	Études toxicocinétiques pour les nanomatériaux
ENV/JM/MONO(2009)21	Examen préliminaire des lignes directrices de l'OECD pour leur applicabilité aux nanomatériaux manufacturés	Révision des normes et leur applicabilité aux nanomatériaux

Tableau 2. – Liste des normes ou lignes directrices reliées aux tests de toxicité sur les nanomatériaux.

Dans ce contexte, la sélection des normes et des tests à accomplir dépend de la voie d'administration des nanoformulations et de la fonction que ces nanomatériaux doivent remplir. Les tests de biocompatibilité sont regroupés en plusieurs catégories. Les plus couramment utilisées pour évaluer le profil toxicologique des nanoformulations sont l'hémocompatibilité, l'immunocompatibilité, la cytotoxicité, et le stress oxydatif.

1.7.2 Les études d'hémocompatibilité

L'hémocompatibilité est définie par l'ISO 10993-1 comme l'ensemble des tests utilisés pour évaluer les effets des matériaux sur le sang et les composants du sang [102]. L'administration intraveineuse des nanomatériaux conduit à l'interaction entre les nanoparticules et les constituants du sang. Dépendamment des caractéristiques physicochimiques de la nanoformulation, cette interaction peut déclencher l'hémolyse, l'activation et l'agrégation plaquettaire, et activer la cascade de coagulation menant à une thrombose [100]. Ce phénomène fait que l'évaluation des propriétés hémocompatibles des nanoparticules est primordiale pour définir leur profil d'innocuité. La taille et la charge de la nanoparticule figurent parmi les propriétés physicochimiques qui influencent le plus l'hémotoxicité [23, 112]. Dans le cas du chitosane, la toxicité rapportée est liée aux modifications structurelles, aux concentrations utilisées, dans certains cas le MW et le DDA, mais principalement à la charge de surface. L'interaction des groupes amines du polymère et des groupes acides des cellules sanguines pourrait mener à la formation des complexes polyélectrolytiques [113, 114] et affecter la fonction

normale des cellules. Les tests les plus utilisés pour évaluer l'hémocompatibilité des nanomatériaux seront décrits dans cette section.

1.7.2.1 Hémolyse

L'importance d'estimer le profil hémolytique des nanoformulations réside dans le fait que les nanoparticules cationiques, comme les nanoparticules du chitosane, sont reconnues pour interagir de façon électrostatique avec les membranes des érythrocytes chargés négativement [113, 115, 116]. Cette interaction endommage les cellules dans certains cas et conduit à la libération de l'hémoglobine [55]. Une importante libération d'hémoglobine peut conduire à une anémie ou à la jaunisse, et devenir toxique pour les tissus biologiques [117].

L'hémolyse est définie comme le dommage ou la destruction des érythrocytes conduisant à la libération de l'hémoglobine [118]. Le dosage colorimétrique décrit par l'ASTM E2524 - 08 consiste à mesurer de manière quantitative l'hémoglobine libérée par les érythrocytes endommagés, à la suite de l'incubation du sang total humain avec les nanomatériaux [119]. La norme considère qu'un matériau possède des propriétés hémolytiques s'il produit plus de 5% d'hémolyse [119].

De manière générale, des dérivés de chitosane présentent de faibles propriétés hémolytiques grâce aux modifications faites sur la structure du polymère. Ainsi, des nanogels de chitosane glycol [120], d'oligosaccharides de chitosane [121], le chitosane lauroyl sulfaté [113] et les nanoparticules d'arginine-chitosane [115] révèlent une hémolyse < 5%, tandis que le N-succinyl-chitosane [116] et le N-acyl chitosane [122] montrent une hémolyse < 10%. Les modifications du chitosane avec l'attachement des molécules ou d'autres polymères cherchent de façon générale à réduire ou bloquer les amines libres et neutraliser la charge positive de surface, rendant le chitosane plus hémocompatible [23]. Une charge positive élevée facilite l'interaction des groupes amines du polymère avec les charges négatives des érythrocytes grâce à la présence de glycoprotéines anioniques sur leurs membranes [113, 123]. Le résultat final est l'agglutination et/ou la destruction des cellules, ce qui entraîne l'hémolyse. La solution de dispersion de la nanoformulation affecte également le pourcentage d'hémolyse directement [124]. Ainsi, le pourcentage hémolytique de différentes formulations de nanoparticules de chitosane a été diminué quand celles-ci ont été dispersées dans une solution saline, comparé à leur préparation

dans une solution d'acide lactique [124]. Ceci met en évidence que la préparation de la nanoformulation influence l'hémocompatibilité de celle-ci.

1.7.2.2 Hémagglutination

L'hémagglutination est complémentaire à l'hémolyse et une partie essentielle de l'évaluation de la toxicité des nanomatériaux sur les globules rouges. Les nanoparticules peuvent adhérer aux érythrocytes et les agglutiner. Ceci peut provoquer une obstruction des vaisseaux sanguins et endommager certains tissus [56], raison pour laquelle il est indispensable d'effectuer l'essai.

L'hémagglutination fait référence à l'agglutination ou agrégation d'érythrocytes [56]. Bien qu'il n'existe pas une norme spécifique pour évaluer les nanomatériaux, de manière générale l'essai se base sur l'observation et l'estimation qualitative de l'effet résultant de l'incubation d'une solution d'érythrocytes avec les nanomatériaux [24, 125, 126]. L'échelle de notation proposée par Stavitsky et al [126] et des images représentatives de celle-ci sont montrées dans la figure 10 :

- « + + + + Agglutinat granulaire compact ;
- + + + Tapis lisse sur le fond du tube avec des bords repliés;
- + + Tapis lisse sur le fond du tube, avec des bords assez irréguliers;
- + Anneau étroit rouge autour du bord du tapis lisse;
- ± Zone du tube recouverte plus petite que +, et anneau plus lourd autour du bord ;
- Bouton rouge discret au centre du fond du tube. »

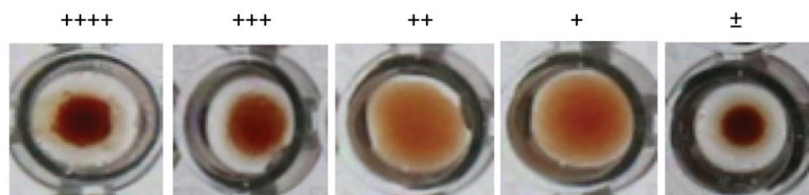


Figure 10. – Images représentatives de l'échelle de notation du test d'hémagglutination.

L'échelle de Stavitsky et al [126] permet de classer les agrégats d'érythrocytes dépendamment de leur forme et de leur apparence. Cette notation considère un petit bouton rouge comme résultat négatif en opposition au tapis de cellules avec des bords irréguliers qui montrent une forte agglutination. Adaptée de Lima et al [24].

Ainsi, la similitude au témoin positif ou négatif déterminera s'il y a une agrégation et l'échelle dira le degré de celle-ci. D'autres types de tests sont utilisés pour évaluer la morphologie des globules rouges par microscopie optique à la suite de l'interaction avec les nanoparticules.

Des rapports dans la littérature montrent des dérivés du chitosane qui ne produisent aucune agrégation comme le chitosane lauroyl sulfaté [113] et des nanoparticules de chitosane pégylé [124], où les érythrocytes conservent leur morphologie normale. Cependant, d'autres formulations de chitosane, telles que des oligosaccharides de chitosane (COS) [121], ont montré une capacité d'agrégation des érythrocytes qui est dose-dépendante, allant d'agrégations réversibles à la formation d'amas de cellules irréversibles qui affectaient la morphologie normale des cellules. Des mélanges de COS à des concentrations élevées ont également montré des effets sur les surfaces des érythrocytes augmentant leur adhésion et rugosité [127]. Ces deux dernières publications montrent l'influence de la concentration de COS sur l'adhésion des érythrocytes et la formation d'amas. La formation d'un filet entre le chitosane et les érythrocytes a déjà été suggérée pour expliquer l'agglutination de ces cellules [24]. Ces faits montrent l'importance non seulement des propriétés physicochimiques du chitosane, mais aussi de la concentration de la formulation dans le déclenchement de l'agglutination des érythrocytes.

1.7.2.3 L'agrégation plaquettaire

L'interaction des nanoparticules avec des plaquettes dans le système sanguin joue un rôle dans l'activation de la thrombine, qui à son tour, catalyse la conversion de fibrinogène en fibrine. Ce dernier facilite l'agrégation des plaquettes et d'autres cellules sanguines, ce qui produit la formation des thrombus qui peuvent obstruer des vaisseaux sanguins et entraîner une crise cardiaque [56]. Étant donné la capacité des nanomatériaux d'adsorber le fibrinogène et d'activer les plaquettes, ce qui éventuellement affecte l'hémostase [56], l'estimation des propriétés thrombogènes des nanoformulations est incontournable pour des applications qui impliqueront un contact avec le sang.

Le test d'agrégation plaquettaire évalue la capacité des nanomatériaux à agréger les plaquettes humaines. L'essai décrit par le protocole NCL ITA-2.2 [128] utilise une méthode turbidimétrique. Dans celui-ci, un agrégomètre enregistre le changement dans la transmission de la lumière qui traverse un échantillon de plasma riche en plaquettes incubé avec les nanoparticules. Ainsi, la turbidité de l'échantillon montrera l'état normal des plaquettes en suspension. La diminution de la turbidité, et par conséquent l'augmentation dans la transmission de la lumière, indiquera l'agrégation des plaquettes suite à l'effet des nanoparticules sur celles-ci [128].

L'ISO 10993-4 [118] décrit une panoplie de tests additionnels qui évaluent l'effet des matériaux sur le nombre, la structure (morphologie altérée) et la fonction des plaquettes (le temps que prennent les plaquettes à s'agréger). L'activation plaquettaire peut être détectée par ELISA, en mesurant la libération de facteurs responsables de la formation de thrombus comme la bêta thromboglobuline (β -TG) et le facteur plaquettaire 4 (PF-4). D'autres marqueurs d'activation, comme la génération de microparticules (surexpression de la sélectine P (GMP-140 ou CD62P) et des glycoprotéines IIB/IIIa (CD41)), peuvent être détectés par la cytométrie en flux [56, 118].

La littérature montre des résultats contradictoires sur la capacité des dérivés du chitosane à agréger les plaquettes. Ainsi, des nanoparticules de chitosane pégylé préparées dans une solution d'acide lactique (110 nm (taille), +25.9 mV (potentiel zêta)) montrent un pourcentage d'agrégation élevé, comparées à la même formulation dispersée dans une solution saline (105 nm, +2.18 mV) [124]. Ceci peut être expliqué par une charge de surface supérieure dans la

solution acide qui permet l'interaction électrostatique avec les cellules. De plus, en utilisant la solution saline, les nanoparticules pégylées ont montré une diminution dans le pourcentage d'agrégation de plaquettes, comparées à celles non-pégylées. Ce fait pourrait être expliqué par l'encombrement stérique offert par la pégylation qui augmente la compatibilité sanguine [124]. D'autres dérivés du chitosane, comme les particules de chitosane lauroyl sulfaté (-6.06 mV), n'ont pas eu d'effet sur la morphologie ni l'agrégation des plaquettes, comparées au chitosane non modifié (+5.19 mV) qui a induit une légère agrégation [113]. Ceci s'explique à cause de l'attachement de groupes sulfatés et de lauroyl à la structure du chitosane qui donne une charge négative globale, et qui cause la répulsion électrostatique des plaquettes. Dans le même sens, des COS n'ont pas eu d'effet ni sur l'activation ni sur l'agrégation de plaquettes [121]. Étant donné que les COS ont de petits MW, la charge est réduite en même temps que leurs effets sur les cellules, comparés au chitosane original dont la charge totale est supérieure [121]. Ces constats sont appuyés par les propriétés hémostatiques d'un chitosane non modifié avec un DDA >90% qui a présenté une augmentation significative dans l'adhésion, l'agrégation et l'activation des plaquettes de manière dose-dépendante, comparé à la solution de dispersion [129]. Également, des nanoparticules de chitosane non modifié avec un 93% DDA (292 nm, +20 mV) ont démontré la capacité d'agréger les plaquettes comparées à celles de 80% DDA (127 nm, +29 mV) qui n'ont pas eu cet effet [130]. Les modifications de la structure du chitosane non seulement améliorent ses propriétés physicochimiques, mais aussi augmentent son hémocompatibilité [23]. Ainsi, des particules de chitosane/poly acide lactique-co-glycolique (-5.7 mV) ou du chlorure de chitosane (+12.1 mV) de la même taille ont démontré n'avoir aucun effet sur l'activation ni l'agrégation plaquettaire [131]. Cette dernière étude a aussi démontré que la charge n'était pas un facteur influent, étant donné qu'aucun des deux dérivés n'a déclenché l'agrégation de plaquettes. L'intégralité de ces études permet d'observer que différentes propriétés physicochimiques influencent l'agrégation plaquettaire. Dans certains cas, la charge [113, 124] est mentionnée comme étant la propriété impliquée, mais dans d'autres cas c'est le DDA du polymère [130] et/ou la modification structurelle du chitosane [124, 131]. Ces faits illustrent l'importance d'évaluer chaque formulation pour estimer son potentiel thrombogène.

1.7.2.4 Temps de coagulation du plasma

L'interaction des nanoparticules avec le système de coagulation peut conduire au dérèglement de celui-ci et la génération de coagulopathies [60]. L'adsorption des facteurs de coagulation par des nanomatériaux pourrait les inactiver et retarder l'activation des voies de coagulation, ce qui serait représenté par une augmentation dans le temps de PT, TCA ou TT. Dans le cas contraire, l'activation de ces facteurs par les nanomatériaux, accompagnée de l'activation des plaquettes, pourrait conduire à la formation de thrombus et l'occlusion des vaisseaux sanguins [60]. L'étude de l'effet des nanomatériaux sur les plaquettes et la cascade de coagulation définissent la thrombogénicité des nanoparticules [55].

Le test de coagulation évalue l'effet des nanomatériaux sur le temps de coagulation du plasma. Le protocole NCL ITA-12 [58] décrit la mesure quantitative de la coagulation du plasma, avec un coagulomètre, à la suite de l'incubation du plasma humain avec des nanoparticules. Dans cette méthode, trois mesures sont réalisées, chacune représentative d'une voie de coagulation, à savoir: le temps de prothrombine (PT) représentatif de la voie extrinsèque, le temps de céphaline activée (TCA) associé à la voie intrinsèque, et le temps de thrombine (TT) caractéristique de la voie commune [58]. Chaque voie possède un intervalle de référence du temps de coagulation ($11 \leq PT \leq 15s$, $28 \leq TCA \leq 40s$ et $14 \leq TT \leq 21s$) [59], ce qui permet de conclure si la nanoformulation testée a un effet anti- ou pro-coagulant.

L'ISO 10993-4 [118] décrit des tests complémentaires comme la mesure de la production de thrombine, de fibrinogène, des produits de la dégradation de la fibrine et du fibrinogène (FDP) et des facteurs de coagulation spécifiques. De plus, le dosage par ELISA de fibrinopeptide A (FPA), du fragment d'activation de la prothrombine 1 + 2 (F_{1+2}) et du complexe thrombine-antithrombine (TAT) témoignent de l'activation du mécanisme de coagulation.

Les effets des dérivés du chitosane sur le temps de coagulation dépendent de chaque formulation et si certaines montrent des propriétés anti-coagulantes, d'autres n'ont aucun effet sur la coagulation. Ainsi, des nanoparticules de chitosane non modifié (100 nm, +10 mV) [132] et (127 nm, +29 mV) [130] ont montré un léger effet anticoagulant du plasma en prolongeant le PT ou le TCA, respectivement. De la même manière, des COS [121], le N-succinyl-chitosane [116] et les

nanoparticules d'arginine-chitosane (153 nm, +6.41 mV) [115] ont augmenté le TCA, confirmant l'effet anticoagulant du polymère. Cet effet a été expliqué par l'affinité et/ou adsorption des facteurs de coagulation par les nanoparticules [124, 130], qui dépend de la concentration utilisée [116, 121, 130], de la présence des groupes hydroxyles [121], de la densité de groupes amines [116] ou de la modification apportée dans la structure du chitosane [115]. Bien que ce polysaccharide soit connu pour son potentiel hémostatique [23, 124], les modifications apportées à sa structure changent ses caractéristiques physicochimiques et lui confèrent de nouvelles propriétés. Ainsi, un chitosane-poly(N-hydroxy éthyl acrylamide) [133] et des nanoparticules de chitosane pégylé dispersées dans une solution saline (105 nm, +2.18 mV) [124] n'ont montré aucun effet sur le PT et le TCA. Il est possible d'observer que la taille et la charge ne semblent pas être des propriétés déterminantes dans la capacité anticoagulante des dérivés du chitosane, mais plutôt les concentrations utilisées et certaines modifications structurelles. Comme mentionné dans les sections précédentes, il est important d'évaluer chaque formulation étant donné la difficulté de généraliser les propriétés qui affectent le temps de coagulation normal.

1.7.2.5 L'activation du système du complément

L'administration intraveineuse des nanoparticules peut conduire à leur reconnaissance et opsonisation par des anticorps et les protéines du système du complément [56]. Ce processus active la cascade du complément, ce qui pourrait éventuellement déclencher une réaction d'hypersensibilité ou une anaphylaxie [55]. Ces faits font du test du complément, un essai incontournable dans l'estimation du profil d'innocuité des nanoformulations.

Le test du complément évalue de manière qualitative l'effet des nanomatériaux sur le système du complément. Ainsi, l'activation de ce système par les nanoparticules est analysée à la suite de l'exposition du plasma humain aux différents échantillons. Le protocole NCL ITA-5.1 [63] utilise la méthode de buvardage de Western pour détecter la chaîne C3 native et ses produits clivés (c3c, iC3b). L'absence ou la diminution de l'intensité de la bande C3 native (MW ~115 kDa), de concert avec l'apparition d'une bande au niveau du MW ~43 kDa, représente le clivage de la chaîne C3 et l'activation du système. Le système du complément constitué par la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines, est composé de plusieurs protéines et facteurs, lesquels convergent aux

produits clivés de la chaîne C3, une fois activé [63]. Si l'intensité de la bande de ~43 kDa pour les échantillons testés est deux fois celle du témoin négatif, le complément a été activé [63].

L'ISO 10993-4 [118] propose des analyses supplémentaires, comme la détection de la production des convertases C3 et C5. Également, la détection des produits clivés de C3 et C5 (C3a, C5a), et le dosage des produits de l'activation du complément tel que Bb (voie alterne), iC3b (centrale C), C4d (voie classique), et SC5b-9 (complexe terminal) figurent parmi les mesures recommandées.

Les rapports concernant l'activation du système du complément par le chitosane sont limités et contradictoires. D'une part, des dérivés du chitosane ont montré une activation du complément dépendante de son poids moléculaire [134, 135] et de son degré de déacétylation [136]. Cependant, il existe également des rapports où l'activation du système du complément n'a pas été observée telle qu'illustrée par des nanogels de chitosane glycol [120], des COS [121], le chitosane lauroyl sulfaté [113] et le chitosane-glycérol phosphate [137]. Ces données contradictoires peuvent être expliquées par la différence entre les nanoformulations, les conditions expérimentales et le paramètre évalué : la déplétion de C3 versus les produits de clivage de celui-ci. Bien qu'il ait déjà été démontré qu'il existe une interaction électrostatique entre le chitosane et les protéines sanguines anioniques, et que les chaînes C3 et C5 natives se lient à lui (causant une déplétion), le chitosane n'active pas nécessairement le système du complément [137].

1.7.3 Études d'immunocompatibilité

1.7.3.1 Potentiel des nanoparticules à induire les cytokines

Les nanoparticules ont la capacité d'interagir avec les cellules immunitaires et de déclencher la production des cytokines pro-inflammatoires. Une production élevée de cytokines a été associée avec le syndrome de réponse inflammatoire systémique [83] et la coagulation intravasculaire disséminée [82]. Les cytokines sont donc des biomarqueurs de l'immunotoxicité des nanoparticules [138], et leur dosage figure parmi les tests qui déterminent le profil de sécurité des nanoformulations.

Le test de cytokines évalue la capacité des nanomatériaux à produire la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Le protocole NCL ITA-10 [83] utilise la méthode ELISA pour mesurer de manière quantitative les niveaux de cytokines à la suite de l'incubation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humain avec les nanoparticules. Afin d'accomplir cet essai dans les règles de l'art, les nanoformulations doivent être testées d'avance pour détecter le niveau de contamination aux endotoxines [139]. Il a été largement démontré que la présence d'endotoxines dans les formulations active la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 [140] conduisant à de fausses interprétations. Également, l'utilisation des témoins d'interférence est de mise, car l'interaction des nanoparticules avec des cytokines pourrait diminuer les niveaux de ces dernières et donner de faux résultats négatifs [83, 139].

De façon générale, les caractéristiques physicochimiques associées à la production de cytokines sont la taille, la charge, l'hydrophobicité et le revêtement [81], ainsi que les ligands attachés et les molécules qu'elles complexent et transportent telles que les acides nucléiques (ADN, siRNA) et les biomacromolécules (protéines, peptides) [138]. Le type cellulaire, le modèle animal et la voie d'administration (orale, intraveineuse, cutanée, intrapéritonéale) influencent également la réponse du système immunitaire et la sécrétion des cytokines [138].

Les nanoparticules cationiques sont susceptibles d'induire une réponse inflammatoire plus importante, comparées aux particules neutres ou anioniques [97, 138], étant donné l'interaction électrostatique entre les particules chargées positivement et les membranes cellulaires [100]. Concernant le chitosane, il est connu pour ses propriétés immunostimulantes et l'induction des cytokines pro- et anti-inflammatoires [141]. Cependant, il existe des résultats contradictoires dans la littérature examinant sa capacité d'induire la production de ces médiateurs. Ainsi, des nanoparticules de chitosane pégylé dispersées dans une solution saline n'ont pas induit de manière significative la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-10 dans les PBMC, comparées au témoin négatif [124]. Ceci peut être expliqué par la protection stérique du PEG et la solution de suspension du chitosane qui diminuent la charge de surface (amines protonées) [124]. Également, des préparations de chitosane non modifié avec 80 et 93% DDA et leurs nanoparticules n'ont pas stimulé la production de TNF- α ni de l'IL-6 dans les PBMC [130]. De plus, des nanoparticules de chitosane n'ont pas stimulé la production d'IL-1 β , IL-6, IL-12p70 et TNF- α à la suite de leur

incubation avec des cellules dendritiques de la moelle osseuse de souris [142]. D'autre part, des oligochitosanes [45] et des chitosanes de faible poids moléculaire [143] ont induit de manière significative la production de TNF- α et d'IL-1 β ou de TNF- α , d'IL-6 et d'INF- γ , respectivement, chez des macrophages Raw 264.7. De la même manière, le chitosane a induit un niveau d'expression élevé d'IL-1 β chez des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMM Φ), les macrophages péritonéaux de souris et les PBMC humaines, dont la stimulation a été reliée à l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 [144]. Toutefois, ces cellules avaient été préalablement stimulées avec le LPS (amorçées) et aucune production des cytokines n'a été détectée avec des cellules non stimulées incubées avec le chitosane [144]. De surcroît, il a déjà été rapporté que l'effet immunogène du chitosane est relié à l'état initial d'activation des cellules et à la concentration du polymère dans l'essai [145]. Les résultats contradictoires de la littérature peuvent être expliqués, en partie, par la différence entre les caractéristiques physicochimiques des nanoformulations, le modèle cellulaire utilisé [145] et par le fait que la présence des endotoxines dans les solutions de chitosane n'est pas toujours vérifiée [59, 145].

1.7.3.2 Tests additionnels pour évaluer la réponse immunitaire aux nanomatériaux

L'interaction des nanoformulations avec le système immunitaire peut entraîner une immunostimulation ou une immunosuppression [138], désirée ou non, qui dépend de l'application de biomatériaux. Le niveau de cette réponse doit être scruté afin d'identifier le profil toxique ou sécuritaire des formulations. Afin d'évaluer l'immunotoxicité des nanomatériaux et leur effet sur les composants du système immunitaire, les lignes directrices S8 [146] et S6 [147] de la « International Council for Harmonisation » (ICH), qui ont été conçues pour les produits pharmaceutiques, sont actuellement utilisées [100].

De son côté l'ISO/TR 16197:2014 propose le système de construction modulaire immunitaire *in vitro*, qui imite le système immunitaire humain en utilisant des cellules immunitaires humaines provenant de multiples donneurs, où la réponse de celles-ci à l'exposition aux nanomatériaux peut être prédite [28]. Également, ISO recommande l'utilisation d'études de toxicité standards (STS) conçues pour vérifier les modifications hématologiques et histologiques [28, 146].

Finalement, l'ISO/TR 16197:2014 [28] et le NCL [110] listent une série de tests où l'effet des nanoformulations sur la fonction des macrophages, neutrophiles, cellules tueuses naturelles (NK) et lymphocytes T est estimé. Par exemple, l'activité phagocytaire des cellules promyélocyaires HL-60 peut être estimée avec l'évaluation du taux d'internalisation des nanoparticules [148] ou en contrepartie l'effet des nanoparticules sur la capacité phagocytaire de ces mêmes cellules à internaliser le Zymosane A peut être évalué [149]. D'autres essais, comme l'estimation de la capacité des nanoparticules à produire ou supprimer une réponse proliférative des lymphocytes humains [150] ou l'évaluation de la capacité des nanoparticules à interférer sur la fonction de NK à lyser des cellules cibles *in vitro* [151], peuvent aider à définir le profil d'immunotoxicité des nanoformulations.

1.7.4 La cytotoxicité

Il existe une variété de tests de cytotoxicité dans la littérature. Ces essais peuvent être divisés en deux grandes catégories. La première évalue l'activité métabolique des mitochondries associée à la viabilité, comme le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), le 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5(3-carboxyméthoxyphényl)-2(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS), le (2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide) (XTT) et le dosage au bleu d'alar. La deuxième évalue l'intégrité membranaire associée à la mort cellulaire, comme la lactate déshydrogénase (LDH), le bleu de trypan et l'iodure de propidium [56, 152]. D'autres essais, comme le dosage au rouge neutre, évaluent l'intégrité de la membrane lysosomale liée à la viabilité cellulaire [152].

Le test de cytotoxicité mesure la viabilité des cellules à la suite de l'incubation de celles-ci avec des nanomatériaux pour un temps d'exposition déterminé [153]. L'ASTM E2526 – 08 propose deux tests colorimétriques qui mesurent de manière quantitative mais différente la cytotoxicité, à savoir: le MTT et la LDH. Le premier évalue l'activité des mitochondries qui témoigne de la survie des cellules et le deuxième mesure la libération de la LDH qui est associée au dommage membranaire et à la mort cellulaire. L'ISO 10993-5 considère un matériau cytotoxique si la viabilité cellulaire est inférieure à 70% [154].

Les rapports dans la littérature sur la cytotoxicité induite par les dérivés du chitosane sont hétérogènes, allant d'une viabilité de 100% à une légère toxicité et, dans certains cas, une cytotoxicité élevée. Ainsi, la viabilité des fibroblastes L929 n'a pas été affectée après 24 h d'exposition aux particules de chitosane lauroyl sulfaté (2 mg/mL) [113]. Des nanoparticules de chitosane non modifié (0.0050 – 0.5 mg/mL) n'affectent pas la viabilité cellulaire de cardiomyocytes HL-1 après 24 et 48 h d'exposition, cependant celle-ci a diminué après 72 h d'exposition [132]. Des nanogels de chitosane glycol (0.1 et 0.5 mg/mL) ont induit une légère toxicité cellulaire sur des macrophages Raw 264.7, des fibroblastes 3T3 et des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC) après 24, 48 et 72 h d'incubation [120]. La viabilité des cellules musculaires lisses de l'artère ombilicale humaine (HUASMC) n'a pas été affectée après leur exposition au chitosane/acide polyglutamique, cependant des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ont montré une légère toxicité selon la taille, la charge et le temps d'incubation (6, 12, 24 et 48 h) [112]. De plus, des nanoparticules de chitosane non modifié (10 – 50 µg/mL) ont réduit la viabilité des cellules de leucémie lymphoblastique (BCL2 (AAA) Jurkat) en fonction de la concentration, mais non celle des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK 293), après 24 h d'exposition [155]. Finalement, les nanoparticules de chitosane avec 80 et 93% DDA (2.44 - 5000 µg/mL), mais pas leurs polymères respectifs (non-complexés), ont induit une réduction de la viabilité cellulaire de manière concentration-dépendante dans les macrophages Raw 264.7 et les PBMC après 24 h d'incubation [130]. De manière générale, il est possible d'observer que la concentration, le temps d'exposition et le type cellulaire utilisé sont très variables entre les protocoles expérimentaux et influencent de manière déterminante les résultats de cytotoxicité [152]. Ceci fait que la comparaison de cytotoxicité entre les dérivés de chitosane ne soit pas évidente.

1.7.5 Études de stress oxydatif

L'interaction entre les nanomatériaux et les cellules peut conduire à l'induction du stress oxydatif et/ou nitrosatif, causé par la production des ROS ou des RNS [75], partiellement expliqué par la présence de groupes fonctionnels pro-oxydants sur la surface des nanoparticules [75, 156]. Ceci génère des dommages cellulaires si le système de défense des cellules n'arrive pas à contrebalancer la production des ROS et/ou des RNS et rétablir l'homéostasie redox [28]. Certains

nanomatériaux ont un potentiel oxydatif [157] et génèrent des radicaux libres ou libèrent des ions métalliques [28]. Également, la présence des métaux de transition tels que le fer (Fe), le cuivre (Cu) et la silice (Si) sur la surface de nanoparticules peuvent générer des radicaux libres, comme les hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), qui induisent les ROS et endommagent l'ADN [75]. Étant donné la capacité des nanoparticules à induire le stress oxydatif, la quantification des ROS est un test prioritaire dans le profil de sécurité des nanomatériaux.

1.7.5.1 Génération de ROS

Les ROS sont des produits dérivés des processus cellulaires normaux, comme la respiration aérobie. Les ROS sont utilisés dans la signalisation cellulaire et dans les réponses inflammatoires par les macrophages pour la destruction des microbes [74]. Cependant quand le niveau de ROS dépasse la capacité antioxydante de la cellule, le stress oxydatif s'installe [28]. Une production excessive de ROS peut conduire au stress oxydatif, une réponse inflammatoire, la cytotoxicité, la génotoxicité et/ou la peroxydation lipidique, parmi d'autres effets [28, 75, 76].

Le protocole NCL GTA-7 utilise un dosage fluorométrique pour mesurer la génération de ROS intracellulaires, suite à l'incubation des cellules avec les nanoparticules. Cette méthode utilise une sonde de diacétate de dichlorofluorescéine (DCFH-DA) qui est oxydée par les ROS générés par les nanomatériaux, produisant ainsi un composé fluorescent qui est quantifié [158].

Bien que le chitosane en vrac (non modifié) soit reconnu pour ses propriétés antioxydantes, grâce à sa capacité de neutraliser les radicaux libres (« scavenger »), la littérature indique des résultats contradictoires pour sa version à l'échelle nanométrique [76]. Ainsi, des nanoparticules de chitosane/pDNA, ont réduit l'induction des ROS, comparées au témoin chez des cellules HeLa, monocytes THP-1 et des cellules épithéliales MDA-MB-231 [159]. Pareillement, des nanoparticules de chitosane non modifié n'ont pas montré une différence significative dans la production de ROS, comparées au niveau de référence, chez des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) dérivées de la moelle osseuse de souris (MBMC) [160]. En revanche, des nanoparticules de chitosane non modifié ont également présenté la capacité d'induire une forte production de ROS chez des cellules de leucémie BCL2(AAA) Jurkat [155], des macrophages Raw 264.7 [130] et des embryons de poisson zèbre [161], d'une manière dépendante de la

concentration pour les deux premiers exemples et à une concentration fixe pour le dernier. Étant donné que dans la majorité des cas, les nanoparticules sont constituées de chitosane non-modifié, la diversité dans les types cellulaires et les concentrations semblent être des facteurs ayant une influence sur la capacité de ces nanoparticules à induire ou non les ROS.

1.7.5.2 Production d'oxyde nitrique (NO)

Le NO est un messager utilisé par le corps pour réguler plusieurs fonctions, tel que la relaxation des muscles lisses au niveau artériolaire et digestive, ce qui lui donne un rôle dans le contrôle du flux sanguin et le péristaltisme [162]. Ce médiateur joue également un rôle clé dans la cytotoxicité, l'apoptose, l'inflammation [163], la cancérogenèse [164] et la peroxydation lipidique, parmi d'autres effets. Au niveau inflammatoire, cette molécule gazeuse est utilisée par les macrophages pour éliminer les bactéries [162]. Le NO s'associe avec le superoxyde, un des produits de ROS, pour former les RNS qui sont de puissants antimicrobiens utilisés dans les infections [74]. Cependant, une production élevée de RNS conduit au stress nitrosatif, lequel est nocif pour les cellules induisant des effets génotoxiques [164], d'où l'importance d'estimer la capacité des nanoformulations à induire la surproduction de NO et donc les RNS.

Étant donné que le NO a une courte demi-vie et se décompose pour produire des produits plus stables comme le nitrite (NO_2^-), c'est celui-ci qui est mesuré dans les essais. Le protocole NCL ITA-7 utilise le réactif de Greiss pour quantifier la production du nitrite (NO_2^-), à la suite de l'exposition des macrophages Raw 264.7 à des nanomatériaux [165].

Les rapports dans la littérature montrent que certains dérivés du chitosane ont non seulement la propriété de ne pas stimuler la production de NO, mais aussi la capacité de diminuer le niveau de libération de NO chez des macrophages activés avec le LPS. Néanmoins, il existe également des composés de chitosane qui induisent la production de ce médiateur inflammatoire de manière significative. Dans cet ordre d'idées, un chitosane hydrosoluble de poids moléculaire élevé [166] et des nanoparticules de chitosane non modifié (80% et 93 % DDA) [130] n'ont pas la capacité d'induire la production de NO chez les macrophages Raw 264.7. D'autre part, des dérivés de chitosane tels que des COS [167-169] et des nanoparticules de chitosane non modifié [130] ont démontré la capacité de réduire la production de NO chez des macrophages Raw 264.7

préalablement stimulés avec le LPS, ce qui suggère un effet anti-inflammatoire de ces formulations. Finalement, et en contradiction avec les résultats précédents, des nanoparticules de chitosane ont induit une augmentation significative de la production de NO, d'une manière dépendante de la concentration chez les PBMC, ce qui suggère un possible effet stimulant [170]. De façon similaire, des chitosanes de faible poids moléculaire ont stimulé la libération de NO d'une manière dépendante du poids moléculaire du polymère et de sa concentration chez des macrophages Raw 264.7 [143]. D'après ces résultats, l'induction de NO par les dérivés du chitosane est reliée au poids moléculaire du polymère et à sa concentration, cependant le type cellulaire et les propriétés physicochimiques de chaque formulation pourraient également jouer un rôle.

1.7.5.3 Tests additionnels pour évaluer le stress oxydatif

Des essais supplémentaires comme le dosage du glutathion (glutathion réduit (GSH) versus glutathion oxydé (GSSG)) sont proposés par l'ISO/TR 16197:2014 [28] et le protocole NCL GTA-3 [171]. Également, le test de peroxydation lipidique NCL GTA-4 [172] (mesure de malondialdéhyde (MDA)) est indiqué dans la batterie de tests proposés par le NCL.

1.7.6 D'autres types de toxicité

L'évaluation de la biocompatibilité des nanomatériaux comprend une vaste batterie de tests qui sont choisis dépendamment de l'application et du type de contact (la durée d'exposition) avec les tissus biologiques. L'ISO 10993-1 [102] et l'ISO/TR 16197:2014 [28] listent une panoplie de tests plus complexes afin d'étudier la génotoxicité, la neurotoxicité, la toxicité pour le développement, l'embryotoxicité, la mutagénicité et la cancérogénicité, sans oublier l'évaluation toxicologique in vivo (toxicité systémique, études toxicocinétiques, parmi d'autres).

Hypothèse du projet

Les possibilités d'utilisation du chitosane comme nanovecteur dans la thérapie génique sont de plus en plus innovatrices. Bien que de manière générale ce polymère soit reconnu comme étant biocompatible, les modifications chimiques réalisées sur sa structure et son utilisation à l'échelle nanométrique doivent être scrutées au niveau biologique afin de garantir la sécurité de son application. La littérature montre une panoplie de travaux de recherche sur les divers champs d'application de ce polymère. Cependant, les études qui caractérisent son niveau de contamination aux endotoxines, ses propriétés d'hémocompatibilité, de stress oxydatif, de même que son interaction avec les récepteurs de surface et les voies de signalisation activées sont limitées. Étant donné que la biocompatibilité des nanoparticules est essentielle pour des applications thérapeutiques en contact avec le sang, et que leurs mécanismes moléculaires font partie de leur toxicité inhérente, une étude qui définit le profil toxicologique de nos nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA s'impose, dans un cadre contrôlé et défini par des lignes directrices standardisées. L'hypothèse de cette thèse de doctorat s'appuie sur les résultats *in vitro* et *in vivo* de nos travaux antérieurs, où notre nanoformulation a montré une efficacité de transfection ou thérapeutique, sans effets secondaires évidents liés à la toxicité. Elle s'appuie aussi sur les rapports issus de la littérature et le fait que la synthèse de notre chitosane modifié a testé négatif à la contamination aux endotoxines. Ainsi, cette hypothèse est formulée comme suit:

Les nanoparticules de chitosane modifié (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB), sans endotoxines, sont sécuritaires pour leur utilisation dans le cadre de la thérapie génique et n'activent pas des voies de signalisation qui mènent à la production des médiateurs pro-inflammatoires.

Objectifs du projet

Objectif général

Étudier l'hémocompatibilité des nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA *in vitro*, ainsi que les voies de signalisation associées aux récepteurs cellulaires susceptibles d'être impliqués dans leur reconnaissance.

Objectifs spécifiques

1. Synthétiser le chitosane modifié DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ et les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA libres de contamination aux endotoxines.
2. Évaluer le profil toxique *in vitro* des nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA, en se basant sur les lignes directrices de l'ISO, l'ASTM et le NCL, notamment en accomplissant les tests de la cytotoxicité, l'hémocompatibilité, la réponse immunitaire et le stress oxydatif.
3. Étudier l'activation des voies de signalisation associées au TLR-4 et certains CLRs (IKK/NF- κ β , MAPKs, AKT et SYK) et l'expression des médiateurs pro-inflammatoires.

Chapitre 2 – Présentation des manuscrits

Article 1: Titre: Evidence supporting the safety of pegylated diethylaminoethyl-chitosan polymer as a nanovector for gene therapy applications

Ordre des auteurs : Elsa Patricia Rondon, Houda Abir Benabdoun, Francis Vallières, Maicon Segalla Petrônio, Marcio José Tiera, Mohamed Benderdour, Julio Cesar Fernandes.

Cet article a été publié dans la revue: International Journal of Nanomedicine (2020): 15 p.6183.

Contribution du premier auteur: recherche de littérature, émission des hypothèses, conception des expériences, mise au point des conditions pour l'exécution des essais, réalisation des expériences, obtention des données, analyses de résultats, rédaction et correction de l'article.
Contribution : 85%.

Description de la contribution des différents coauteurs :

Houda Abir Benabdoun, Francis Vallières et Maicon Segalla Petrônio: participation à la conception et réalisation des expériences préliminaires, analyses de résultats et révision de l'article.

Marcio José Tiera, Mohamed Benderdour et Julio Cesar Fernandes: participation à l'émission des hypothèses, conception des expériences, analyses de résultats et révision de l'article. Acquisition des fonds de recherche et/ou responsables de l'intégrité du travail.

La contribution des coauteurs est de 15%.

Résumé

Le dérivé diéthylaminoéthyl-chitosane (DEAE-CH) montre un excellent potentiel en tant que vecteur de livraison pour des applications dans la thérapie génique. Le but de cette étude est d'évaluer son profil toxicologique pour de futures applications cliniques. Un CH sans endotoxines modifié avec du DEAE, de l'acide folique (FA) et du polyéthylène glycol (PEG) a été utilisé pour complexer des petits ARN interférents (siRNA) afin de former la nanoparticule DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/anti-SSB siRNA. Les lignes directrices de « International Organization for Standardization » (ISO), la « American Society for Testing and Materials » (ASTM) et le « Nanotechnology Characterization Laboratory » (NCL) ont servi de guide pour évaluer les effets de l'interaction entre ces nanoparticules et les composants du sang. Des essais *in vitro* tels que l'hémolyse, l'hémagglutination, l'activation du complément, l'agrégation plaquettaire, le temps de coagulation, l'induction des cytokines et les espèces réactives, telles que l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ont été effectués sur les érythrocytes, le plasma, les plaquettes, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et les macrophages Raw 264.7. De surcroît, des essais de MTS et de la libération de la LDH ont été également performés en utilisant des macrophages Raw 264.7, des PBMC et des ostéoblastes MG-63. Nos résultats ont démontré que la concentration plasmatique théorique (TPC) des nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA remplit les critères des lignes directrices avec <1% d'hémolyse, 2.9% d'agrégation plaquettaire, et aucun effet sur le système du complément et le temps de coagulation. Les niveaux de production des ROS et de NO ont été comparables à ceux du témoin négatif. La sécrétion des cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 et IL-10) n'a pas été affectée par les nanoparticules à l'exception de l'IL-1 β et l'IL-8. De plus, les nanoparticules ont montré une faible hémagglutination. D'autre part, la viabilité cellulaire a été > 70% pour la TPC dans tous les types cellulaires comparativement aux cellules non traitées. Cependant, le niveau de la LDH a été statistiquement significatif chez les macrophages Raw 264.7 et les PBMC après 24 et 48 h d'exposition. Nous pouvons conclure que les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA remplissent les critères des lignes directrices de l'ISO, de l'ASTM et du NCL, et que leur faible toxicité et leur bonne hémocompatibilité justifient des études plus approfondies pour des applications cliniques potentielles.

Title: Evidence supporting the safety of pegylated diethylaminoethyl-chitosan polymer as a nanovector for gene therapy applications

Authors: Elsa Patricia Rondon ¹; Houda Abir Benabdoun ¹; Francis Vallières ¹; Maicon Segalla Petrônio ²; Marcio José Tiera ²; Mohamed Benderdour ¹; Julio Cesar Fernandes ¹

¹Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

²Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences. Department of Chemistry and Environmental Sciences, UNESP-São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil.

Correspondence should be addressed to Dr. Julio Cesar Fernandes. Phone: (1) 514-338-2222 Ext. 2489. E-mail: julio.c.fernandes@umontreal.ca

This work was done in Montréal (QC, Canada) and Sao Jose do Rio Preto (SP, Brazil).

Abstract

Purpose: Diethylaminoethyl-Chitosan (DEAE-CH) is a derivative with excellent potential as a delivery vector for gene therapy applications. The aim of this study is to evaluate its toxicological profile for potential future clinical applications.

Methods: An endotoxin-free chitosan (CH) modified with DEAE, folic acid (FA) and polyethylene glycol (PEG) was used to complex small interfering RNA (siRNA) and form nanoparticles (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA). Based on the guidelines from the International Organization for Standardization (ISO), the American Society for Testing and Materials (ASTM), and the Nanotechnology Characterization Laboratory (NCL) we evaluated the effects of the interaction between these nanoparticles and blood components. *In vitro* screening assays such as hemolysis, hemagglutination, complement activation, platelet aggregation, coagulation times, cytokine production, and reactive species, such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), were performed on erythrocytes, plasma, platelets, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Raw 264.7 macrophages. Moreover, MTS and LDH assays on Raw 264.7 macrophages, PBMC and MG-63 cells were performed.

Results: Our results show that a targeted theoretical plasma concentration (TPC) of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles falls within the guidelines' thresholds: <1% hemolysis, 2.9% platelet aggregation, no complement activation, and no effect on coagulation times. ROS and NO production levels were comparable to controls. Cytokine secretion (TNF- α , IL-6, IL-4, and IL-10) was not affected by nanoparticles except for IL-1 β and IL-8. Nanoparticles showed a slight agglutination. Cell viability was >70% for TPC in all cell types, although LDH levels were statistically significant in Raw 264.7 macrophages and PBMC after 24 and 48 h of incubation.

Conclusion: These DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles fulfill the existing ISO, ASTM and NCL guidelines' threshold criteria, and their low toxicity and blood biocompatibility warrant further investigation for potential clinical applications.

Keywords— Chitosan, Nanoparticles, siRNA, Biocompatibility assays, Gene therapy, Toxicity.

Introduction

Biocompatibility studies on nanoformulations for biomedical applications have been a subject of increasing interest in the last decades, as they are being submitted to the Food and Drug Administration (FDA) and marketed. A review of the 51 nanomedicines currently approved by the FDA, and some of the 77 products undergoing clinical trials have been the subject of a previous study.¹ Pursuing the preclinical development of a new formulation depends not only on its efficacy, but also on its safety. Nowadays, regulatory agencies, standards development organizations, and laboratory research teams develop screening methodologies to improve the assessment of the estimated biological response to a specific nanomaterial.

Over the past decade, our laboratory has developed a modified chitosan (CH) with excellent potential for gene therapy applications and evaluated its different therapeutic uses.² CH, a natural polymer composed of glucosamine units, showed good biocompatibility and biodegradability properties.³ Its versatility allows it to be used in several fields, including wastewater treatment, agriculture, textiles, food protection and cosmetics.⁴ It has a tremendous potential for biomedical and pharmaceutical applications as a drug delivery vehicle,⁵ in vaccine systems,⁶ tissue engineering, wound dressing, diagnosis,⁷ and gene therapy,⁸ among others.

In terms of toxicity outcomes, CH and its derivatives, show low blood toxicity, as they generally do not induce significant hemolysis and do not affect the complement activation system.⁹⁻¹¹ However, the data on blood compatibility are contradictory. There were reports that this polymer can induce hemagglutination,⁹ or impact platelet activation and clotting time,¹⁰ depending on its physicochemical characteristics. Cell viability can also be differentially affected, depending on CH modifications and the cell type studied. For example, HUVEC cell line survival increases when incubated with a CH-heparin nanoparticles coating on anodized NiTi (nickel-titanium),¹² while a glycol CH-nanogel induces slight cell toxicity on Raw 264.7 macrophages, 3T3 fibroblasts and HMEC.¹³ Similarly, in L929 cells, viability is not affected by lauroyl sulfated CH microparticles,¹¹ whereas CH/polyglutamic acid hollow spheres affect the viability of HUVEC and HUASMC, in a cell, time, size, and charge-dependent manner.¹⁰

The physicochemical differences in all these nanoformulations explain most of the variability in hemato-compatibility and cytotoxicity responses. Another factor is the heterogeneity in screening protocols, coupled with the general assumption that CH is biocompatible, resulting in a limited number of reports on its hemagglutination and oxidative stress response. Finally, the lack of information on endotoxin contamination in CH formulations makes it difficult to interpret results from cytokine up-regulation, as the presence of endotoxins alone can induce the production of important pro-inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6).¹⁴ These facts underscore the need to follow available guidelines when evaluating the toxicological profile of a newly synthesized nanoparticle.

A good starting point for biocompatibility studies are the guidelines from the International Organization for Standardization (ISO), the American Society for Testing and Materials (ASTM), and the Nanotechnology Characterization Laboratory (NCL), which provide protocols and recommendations to perform preclinical studies on nanoformulations. Reviews of standards, guidelines and agencies are available in several reports.¹⁵⁻¹⁸

Our goal is to design safe and functionalized nanoparticles which release their therapeutic cargo, namely small interfering RNA (siRNA), to target cells with minimal toxicity to tissues. As we aim for a parenteral administration, we decided to use the existing guidelines to achieve validated outcomes before proceeding to a clinical application. The present study systematically evaluates the safety of a pegylated diethylaminoethyl CH (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂), with or without siRNA-SSB complexation. This derivative showed a high *in vitro* transfection efficiency on varied cell lines¹⁹ and its *in vivo* therapeutic efficacy was demonstrated in a murine collagen antibody-induced arthritis model.² Among the assays proposed by ISO 10993-4:2009,²⁰ ISO/TR 16197,¹⁷ ASTM F1903,²¹ ASTM E56.03 committee,²² and NCL protocols,²³ the following were chosen: endotoxin contamination, physicochemical characterization, cytotoxicity assay, hemotoxicity (hemolysis, hemagglutination, complement activation, platelet aggregation and coagulation tests), inflammatory response (cytokines) and oxidative stress response (reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO)).

Materials and Methods

Materials. Medical grade deacetylated CH (ChitoClear[®], 43010, 270 kDa) was obtained from Primex ehf (Siglufjordur, Iceland). RPMI 1640 medium, EMEM medium, fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA solution, penicillin-streptomycin (P/S) and lymphocyte separation medium (LSM) were purchased from WISENT Bioproduct Inc (Montréal, Qc, Canada). siRNA-SSB (GenBank accession number NM_009278) with the oligonucleotide sequence: antisense 5'-uuacauaaagucuguuguTT-3'; and sense 5'-acaacagacuuuaauguaaTT-3' (as mentioned by Abrams et al²⁴ and Seitzer et al²⁵) with a 2'-O-Me-rA (rC, rG, rU) modification, was purchased from Alpha DNA S.E.N.C. (Montréal, Qc, Canada). Pyrogen-free consumables (Biosphere[®] plus certified) were purchased from Sarstedt (Montréal, Qc, Canada). Other chemicals or solutions, if not otherwise stated, were purchased from Sigma Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Raw 264.7 macrophage and MG-63 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Ethics Committee. Experiments with human blood were approved by the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal (now Centre Intégré Universitaire de Santé et de Services Sociaux du Nord de l'île de Montréal (CIUSSS NIM) Research Ethics Committee (Protocol # 2017-1462). Informed consent was obtained from healthy donor volunteers who were not ill nor under medication at the time of blood sample collection. PBMC were collected from healthy volunteers who provided blood samples. The CIUSSS NIM Research Ethics Committee approved the use of these cells and the corresponding experimental procedures (Protocol # 2017-1462).

Synthesis of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. Groups of diethylaminoethyl (DEAE), polyethylene glycol (PEG - 3 kDa spacer) and folic acid (FA) were grafted to the CH structure. DEAE₁₂-CH conjugation was prepared as described by Oliveira et al.²⁶ Final conjugation of DEAE₁₂-CH and PEG-FA was performed as reported by Cho et al,²⁷ with slight modifications, described in our previous study.²⁸

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay. All the materials used for this test were purchased pyrogen-free. One sample from each stage of synthesis, prepared at 1 mg/mL, was analyzed for the presence of endotoxins by LAL assay (88282, Thermo Fisher, Saint-Laurent, Qc, Canada),

according to NCL method STE-1.1²⁹ and the manufacturer's instructions. The kit's detection levels were in the 0.1 EU/mL to 1 EU/mL range.

Characterization of modified CH. Polymer characterization was performed as described in our previous studies.^{26,28} Nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) was used to assess the degree of CH deacetylation (DDA) and the DEAE percentage incorporated into the polymer structure. The percentage of PEG-FA incorporated was calculated by measuring FA absorbance (λ 363nm) in a nanophotometer, using CH-DEAE as a blank. An extinction coefficient of 6165 M⁻¹ cm⁻¹ (FA)²⁸ was used for calculations. The molecular weight (MW) of the CH polymer was evaluated by gel permeation chromatography (GPC). Additional Information about DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ characterization is described in our previous study.¹⁹

Nanoparticle preparation in DPBS pH 7.2. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ was dissolved overnight in a 0.1 M HCL solution, then heated at 50°C for 30 min, adjusted with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) to the desired final concentration, and finally filtered with a 0.45 μ m polyether sulfone membrane filter. To prepare DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles, siRNA-SSB and modified CH stock solutions were added to DPBS and vortexed immediately at moderate speed for 1 min. Nanoparticles were always freshly prepared prior to each experiment.

Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles in DPBS pH 7.2. The size and charge (zeta potential) were evaluated with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), using a 1 mL nanoparticle solution containing 0.02 mM of siRNA. Size versus (vs) time studies were performed to analyze the particle's stability for 24 h. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles at amino groups/phosphate groups (N/P) ratios of 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1 and 40:1 were prepared as indicated above. The DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle formation was evaluated by 2% agarose gel electrophoresis, by loading 10 μ L of nanoparticle solution with 0.5 μ g of siRNA.

Nanoparticle concentrations selection for *in vitro* assays and controls. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle concentrations were chosen according to a theoretical therapeutic dose for their future use *in vivo*. Thus, a theoretical plasma concentration (TPC) for *in vitro* assays was calculated, based on NCL recommendations³⁰ and FDA directives.³¹ Our previous work showed

the efficiency of a 50 µg siRNA-TNF α /intraperitoneal injection/mouse in a mouse model of arthritis.² These results and those in the literature gave us a framework to determine the dose that we could test *in vivo* for a future intravenous administration in a mouse model. Thereby, the dose of 30 µg siRNA-SSB/intravenous injection/mouse (1.5 mg/kg, for a 20 g mouse) was chosen as the target dose to be complexed with DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. Based on NCL guidelines,³⁰ an equivalent human dose (0.1219 mg/kg) was calculated and the corresponding TPC (1.52 µg/mL siRNA-SSB). Table 1 summarizes the concentrations used for *in vitro* assays.

This study evaluates the safety of our pegylated diethylaminoethyl CH (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂) with or without siRNA-SSB complexation. Positive and negative controls were used in each assay to confirm the cells' ability to respond to a given substance. Cell-free particle controls were conducted to verify nanoparticle interference with the assay.

Table 1. Nanoparticle concentrations *in vitro*

	20x	10x	5x	TPC	1/5x	1/25x
<i>siRNA-SSB</i> (µg/mL)	30.4	15.2	7.60	1.52	0.30	0.06
DEAE ₁₂ -CH-PEG-FA ₂ (µg/mL)	324.2	162.1	81.0	16.2	3.24	0.64

Note: The higher concentrations represent 20, 10 and 5-fold the TPC. The lower concentrations are two serial 1:5 dilutions of TPC. 20x concentration was only used in the complement activation test.

Abbreviations: TPC, Theoretical Plasma Concentration.

Cell Cytotoxicity. This assay is based on slightly modified ASTM E2526-08 (2013)³² and NCL GTA-2 (2015)³³ guidelines. Cell viability, in response to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles, was measured by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, G5421, Promega, Madison, WI, USA) and lactate dehydrogenase release (LDH, 11644793001, Roche, Laval, QC, Canada) assays on human MG-63 cells, murine Raw 264.7 macrophages and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Briefly, MG-63 and Raw

264.7 cells were plated in a 96-well plate at a confluence of 1.5×10^4 cells/well (EMEM medium) and 3.5×10^4 cells/well (RPMI medium), respectively. Cells were incubated in 10% FBS phenol red-free medium for 24 h at 37°C. Then, medium was replaced with fresh medium (1% FBS) containing samples and incubated for 4, 24, and 48 h at 37°C. PBMC were isolated based on NCL method ITA-10, using LSM.³⁴ PBMC were collected, washed, resuspended in 1% FBS RPMI 1640 medium, and incubated with samples at 2×10^5 cells/well in a 96-well plate. After the exposure period, MTS and LDH assays were performed according to the manufacturer's instructions, with absorbance readings at 490 nm in a microplate reader (EL800, Bio-Tek instruments). DPBS was used as the negative control. Hydrogen peroxide (500 μ M H₂O₂) and triton X-100 (1% v/v) were used as positive controls for the MTS and LDH assays, respectively. Cell-free particle interference controls were treated in the same experimental conditions. Cell viability and cytotoxicity were calculated with the following equations:

$$\% \text{ cell viability} = \left(\frac{\text{sample}}{\text{cell control}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ total LDH leakage} = \left(\frac{\text{sample} - \text{cell control}}{\text{triton control} - \text{cell control}} \right) \times 100$$

As the guidelines did not mention an acceptable threshold for the MTS assay, ISO 10993-5 criteria were used, where a viability < 70% is considered toxic.³⁵

Hemolysis assay. This assay is based on ASTM E2524-08 (2013)³⁶ with some modifications. In summary, human blood was collected in Na-heparin tubes. Plasma-free hemoglobin (PFH) and total blood hemoglobin (TBH) were determined and treated according to the procedure described in the guideline. Then, 20 μ L of diluted whole blood, 20 μ L of samples and 140 μ L of DPBS were incubated in microcentrifuge tubes for 3 h at 37°C. A minus blood interference control was also prepared. Then, tubes were centrifuged for 8 min at 2000xg. The quantitative hemolysis determination was carried out by mixing 100 μ L of the sample's supernatant with 100 μ L of cyanmethemoglobin reagent (hemoglobin reagent, Pointe Scientific, Canton, MI, USA). The absorbance was read at 490 nm and a standard curve (0.025 to 0.8 mg/mL) prepared with human

hemoglobin was used for calculations. Triton X-100 (10%) and DPBS served as positive and negative controls, respectively. Percentage hemolysis was calculated with the following equation:

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{\text{Hemoglobin in sample}}{\text{TBHd}} \times 100$$

Hemolysis >5% indicates a positive hemolytic response according to ASTM guidelines.³⁶

Hemagglutination test. The chosen method is the one reported by Banerjee et al,³⁷ Lima et al,³⁸ and Stavitsky et al,³⁹ with minor modifications. Briefly, human blood collected in Na-heparin tubes was centrifuged at 1500 RPM for 12 min to isolate erythrocytes. Plasma was discarded and red blood cells were washed 3 times with a 0.9% NaCl solution. Finally, a 2% cell suspension in NaCl was prepared and incubated with nanoparticles in a 96-well U-bottom plate for 1 h at 37°C. DPBS and lectin from *Phaseolus vulgaris* were used as negative and positive controls, respectively. Wells were photographed and scored according to the scale proposed by Stavitsky et al.³⁹

- "+ + + compact granular agglutinate;
- + + + Smooth mat on bottom of tube with folded edges;
- + + Smooth mat on bottom of tube, edges somewhat ragged;
- + Narrow ring of red around the edge of smooth mat;
- ± Smaller area of tube covered than +, and heavier ring around the edge;
- discrete red button in center at the bottom of the tube."

Complement activation assay. This test was performed according to NCL method ITA-5.1 (2015)⁴⁰ with some modifications. Briefly, whole human blood was drawn in tubes containing sodium citrate. Plasma was collected after blood centrifugation at 2500xg for 10 min. Then, equivalent volumes of plasma and samples were mixed and incubated for 30 min at 37°C. 8.1 Units of cobra

venom factor (CVF) and DPBS were used as positive and negative controls, respectively. Next, Laemmli buffer was added and tubes were heated at 95°C for 5 min. Samples were finally loaded at 10 µg/well in an 8% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane for protein immunodetection. The primary antibodies deployed were the anti-C3/C3b antibody (1:500, ab11871, Abcam, Toronto, ON, Canada), and the serum loading control anti-transferrin antibody (1:1000, ab109503, Abcam, Toronto, ON, Canada). After serial washes, the primary antibodies were revealed by the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies. According to NCL guidelines,⁴⁰ a sample with ≥ 2 folds the density of DPBS, for the C3c fragment, was considered positive.

Platelet aggregation test. This test was performed according to NCL method ITA-2.2 (2015)⁴¹ with some modifications. Briefly, whole human blood was collected in sodium citrate tubes. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet poor plasma (PPP) were obtained by blood centrifugation at 200xg for 8 min and 2500xg for 10 min, respectively. Then, 6 min runs were performed at 37°C in a platelet aggregation profiler (PAP-8E, Bio/Data Corporation) using 225 µL of PRP and 25 µL of samples. A baseline correction was performed using PPP and samples for possible particle interference. Collagen (100 µg/mL) and DPBS were the positive and negative controls, respectively. Non-treated PRP runs at the beginning and the end of the assay were used as internal test controls. The percentage of aggregation was calculated with the following equation, where AUC represents the area under the curve:

$$\% \text{ Aggregation} = \frac{AUC \text{ sample}}{AUC \text{ collagen}} \times 100$$

A platelet aggregation >20% was considered a positive response according to NCL Method ITA-2.1 (2015).⁴²

Plasma coagulation test. This assay was carried out according to NCL method ITA-12 (2015).⁴³ Briefly, whole human blood was collected in sodium citrate tubes. Plasma was collected after blood centrifugation at 2500xg for 10 min. Then, samples were incubated with plasma in a microcentrifuge tube for 30 min at 37°C, and finally centrifuged at 17000xg for 5 min. After exposure, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin

time (TT) were measured using the STA-R Evolution coagulometer (Diagnostica Stago). Non-treated plasma and DPBS were used as internal and negative controls, respectively. Normal limits for plasma clotting time, established by the certified clinical laboratory at Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, were: APTT $28 \leq 40$ s, PT $11 \leq 15$ s, and TT $14 \leq 21$ s.

Cytokine assay. This assay was performed based on NCL method ITA-10 (2015).³⁴ Briefly, human PBMC were re-suspended in a 10% FBS RPMI 1640 medium. Cells (1×10^6 /well) were incubated with samples for 24 h at 37°C. Lipopolysaccharides (LPS, tlr1-peklps, 20 ng/mL, Invivogen, San Diego, CA, USA) and DPBS were the positive and negative controls, respectively. Following exposure, supernatants were collected and centrifuged at 12000 RPM for 15 min. Cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-4 and IL-10) were measured with Elisa kits (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA).

Nitric oxide (NO) determination. This assay determines NO production based on NCL method ITA-7 (2015).⁴⁴ Briefly, murine Raw 264.7 cells were plated at a confluence of 1×10^5 cells/well in 10% FBS RPMI medium (phenol red free) and incubated for 24 h at 37°C. Then, medium was replaced with fresh medium containing samples and incubated for 48 h at 37°C. After the exposure period, supernatants were collected and centrifuged at 12000 RPM for 10 min. Nitrite (NO²⁻) quantitative determination was carried out with the Greiss reagent as indicated in the protocol. The absorbance was measured at 562 nm and a standard curve (0.12 μ M to 250 μ M) prepared with sodium nitrite in complete medium was used for calculations. LPS (100 ng/mL) and DPBS were used as the positive and negative controls, respectively. A cell-free interference control was prepared and taken through all the experimental steps.

Reactive oxygen species (ROS) assay. This test measures ROS production based on NCL method GTA-7 (2010),⁴⁵ with some modifications. Briefly, murine Raw 264.7 cells were plated in a black 96-well plate at a confluence of 8.5×10^4 cells/well in 10% FBS RPMI medium (phenol red free) and incubated for 24 h at 37°C. Then, the plate was incubated with a 20 μ M DCFH-DA probe solution for 30 min. Cells were further incubated with Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) containing the samples for 6 h at 37°C. The first reading was performed at t=0 before adding the samples, and subsequently at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h after exposure time. A microplate reader with Fluorescence Polarization (Polar Star Optima, BMG Labtech) set up at ex. 485 nm and em.

530 nm was used. H₂O₂ (500 μM) and diethyl maleate (DEM, 5 mM) served as positive controls and DPBS as the negative control. A cell-free interference control was prepared and taken through all the experimental steps, except for probe pre-incubation. The ROS percentage was calculated with:

$$\% \text{ Fluorescence} = \frac{\text{sample fluorescence}}{\text{control fluorescence}} \times 100$$

Statistical analysis. Data was analyzed with GraphPad Prism software version 6. Figures show the standard error of the mean ± SEM. Statistical significance (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) was assessed by One-way Anova or Two-way Anova with adjusted correction for multiple comparisons using Dunnett's test (not matching or pairing). All results are from at least three independent experiments unless stated otherwise in the figure legend. For experiments with human blood, each independent experiment was from a distinct healthy blood donor. When the guidelines did not provide an acceptable threshold for the test, the negative control was used as a baseline to determine a statistically significant difference with the tested samples, as recommended by ASTM F1903.²¹

Results

Characterization of modified CH (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂). To evaluate the effect of DEAE and PEG-FA insertion on the CH structure, we calculated the percentage of each chemical group attached on the polymer chain, and estimated the MW of the new synthesized derivative. A diagram representing the synthesis procedure is available in supplementary figure S1. The DDA of the original non-modified CH was determined by ¹H-NMR at 97.4%, with a MW of 270 kDa, as measured with GPC. The degree of substitution (DS) of the DEAE groups inserted in the CH was 12%. The percentage of PEG-FA in the CH structure was 2.02%, as measured with a nanophotometer at λ 363 nm. The theoretical value of the average molar mass (MM) per DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ residue was determined by ¹H-NMR and calculated as 243.7 g/mol, using the DDA, degree of acetylation (DA), and DS values. Final MW of this derivative, according to GPC, was 259 kDa. Figure S2 shows GPC traces for the original and modified CH. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ polymer is partly soluble in water after long stirring periods. Once HCl is added to water in equimolar amounts to those of the amino groups, other solutions like DPBS pH 7.2 can be added to reach the desired final concentration, and the polymer remains soluble at neutral pH. The final pH will be the one used in the solution to reach the concentration to be tested, in our case pH 7.2. LAL assay, carried out on different samples of the synthesis process, revealed that our DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ was free of endotoxin contamination (endotoxin levels were not detectable or inferior to 0.1 EU/mL). A representation of the DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ chemical structure, its ¹H-NMR spectrum and general properties are shown in Figure 1.

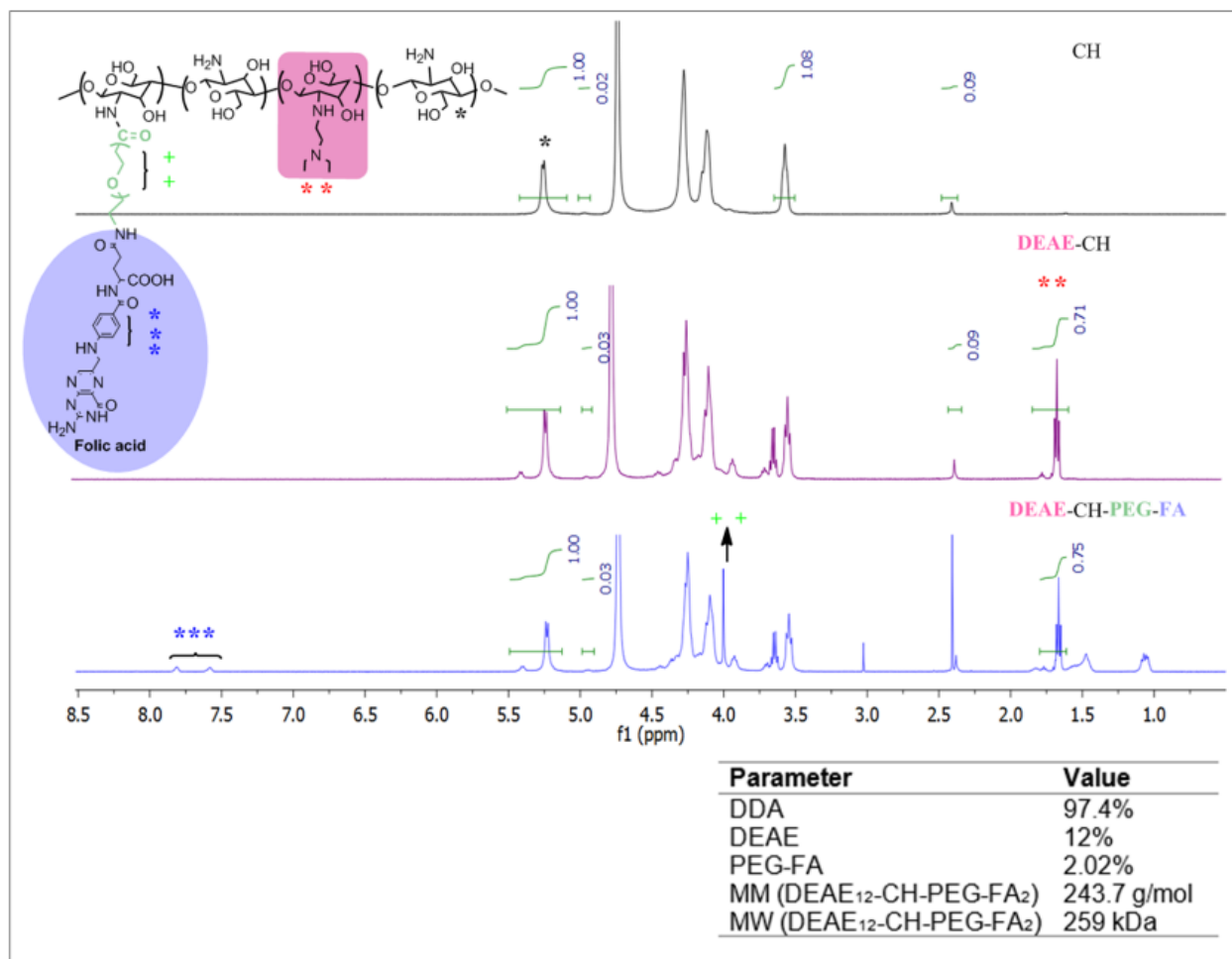


Figure 1. Chemical structure and characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ modified CH. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ chemical structure (left-top). ¹H-NMR spectrum of deacetylated CH (right-top panel, DDA 97.4%), DEAE₁₂-CH (middle panel) and DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ (right-bottom panel). DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ properties (right-bottom).

Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles in DPBS pH 7.2. The electrophoresis assays were carried out to determine the ideal N/P ratio between DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and siRNA to form nanoparticles and complex the payload. Therefore, we chose a N/P ratio of 15:1, as there was no siRNA release during the agarose gel migration, which reflects good complexation (Figure 2A). Size and zeta potential assays (Figures 2B and C) for a N/P ratio of 15:1 showed nanoparticles of 208 ± 33 nm, with a polydispersity index (PDI) of 0.15 ± 0.04, and a charge of +8.9 ± 0.7 mV. Size vs time studies (Figures 2D and E) showed stable nanoparticles for a N/P ratio of 15:1, ranging from 194 ± 10 nm (PDI 0.15 ± 0.0) at t=0 to 224 ± 6 nm (PDI 0.18 ± 0.02) at 24 h. Overall, this 24 h kinetic experiment showed good particle homogeneity from N/P ratios of 15:1 to 40:1 for all time points, with sizes <235 nm and PDI <0.2.

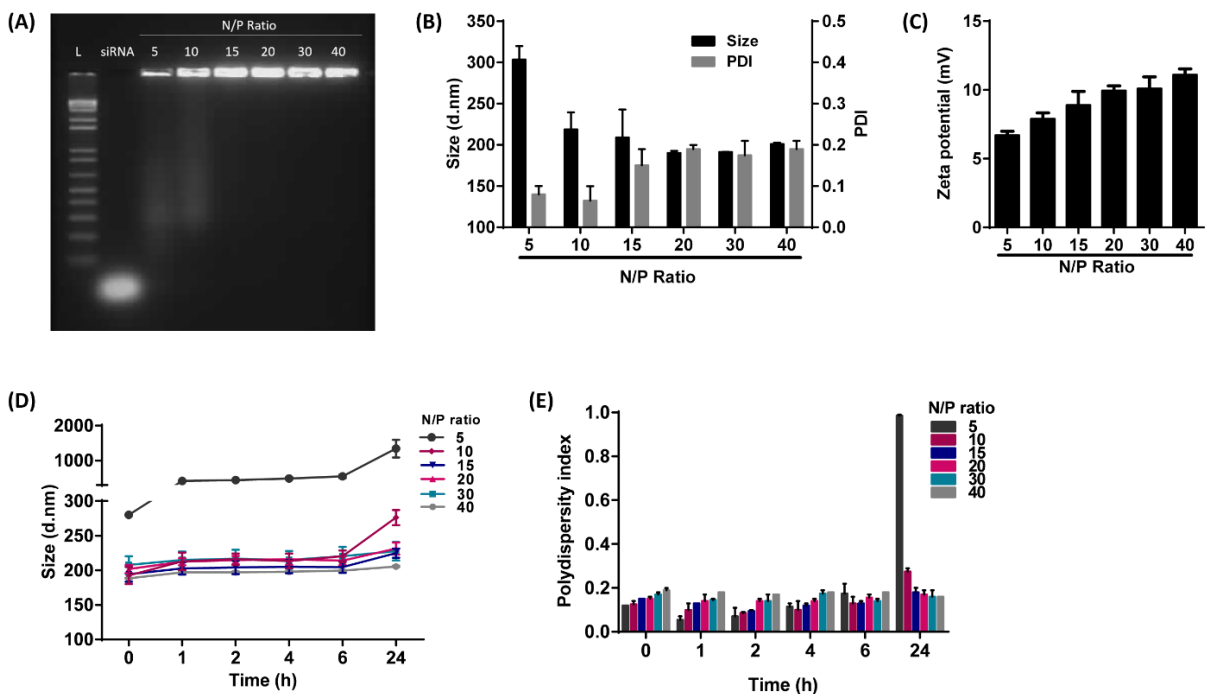


Figure 2. Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles in DPBS pH 7.2. Nanoparticles had DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA N/P ratios of 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1 and 40:1. (A) Nanoparticles agarose electrophoresis using 0.5 µg of siRNA/well. Lane 1: ladder (1kb pairs); lane 2 free siRNA; lane 3-8: DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles at the indicated N/P ratios.

(B) Nanoparticle size and PDI with 0.02 mM of siRNA/optical-cell. (C) Zeta potential of nanoparticles at the indicated N/P ratios. (D) Nanoparticle size vs time and (E) their corresponding PDI. All values are expressed as the mean \pm SEM of two independent experiments.

Cell viability and toxicity. The effect of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles or free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ on cell viability was tested using three types of cells and two assay methods. MTS determines cell viability and LDH release indicates a loss in membrane integrity, which is associated with cell death.³² Compared to Raw 264.7 cells and PBMC, MG-63 cells had the best viability and the lowest LDH release. For TPC, MG-63 cell viability was evaluated at $93.3 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$) after 24 h of incubation and decreased to $76.0 \pm 5.1\%$ ($p < 0.01$) after 48 h (Figure 3A). The LDH level varied from $1.8 \pm 0.5\%$ to $5.4 \pm 1.7\%$ ($p < 0.01$) for the same time periods (Figure 3B). Although, cell viability of Raw 264.7 macrophages was more affected at 10x and 5x concentrations (Figure 3C), cell viability at TPC was still $78.3 \pm 4.7\%$ ($p < 0.05$) and $71.8 \pm 3.0\%$ ($p < 0.0001$) after 24 and 48 h of incubation, respectively. A dose-dependent response associated with time points was observed. LDH release was estimated at $45.9 \pm 5.8\%$ ($p < 0.0001$) and $88.0 \pm 7.3\%$ ($p < 0.0001$), following treatment for 24 and 48 h (Figure 3D). For its part, PBMC cell viability at TPC remained at $81.0 \pm 2.9\%$ and $107.5 \pm 19.5\%$ after 24 and 48 h of incubation, respectively (Figure 3E). LDH release reached $12.3 \pm 1.4\%$ ($p < 0.01$) and $8.8 \pm 3.5\%$ after 24 and 48 h post-exposure (Figure 3F). The viability threshold for this test is $>70\%$ according to ISO 10993-5,³⁵ meaning that our nanoparticles still meet the criteria for MG-63 cells and PBMC. Even though the viability of Raw 264.7 macrophage cells was $>70\%$ when evaluated by MTS assay, LDH release results showed a much higher mortality rate which does not reflect MTS data.

Free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ showed similar cell viability for all cell types, at different incubation times and particle concentrations, as measured by the MTS assay and LDH release (Figures S3A-F).

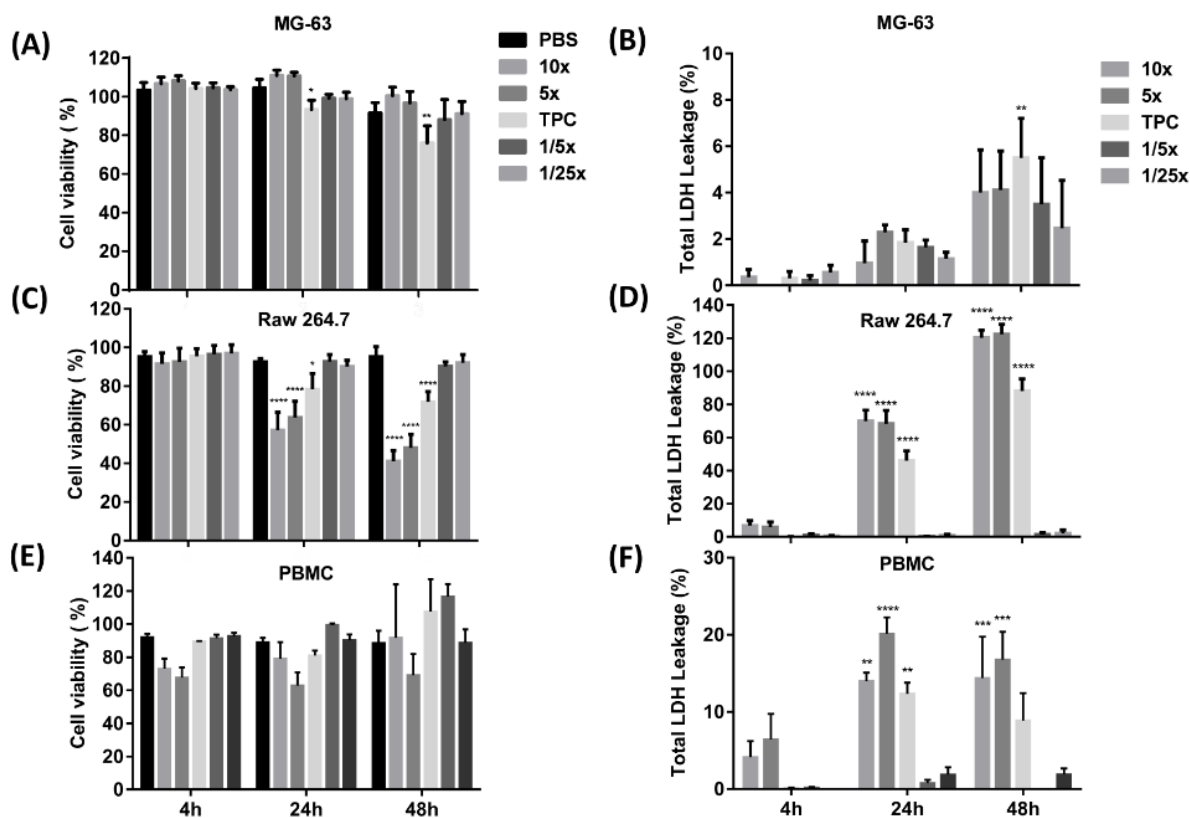


Figure 3. Cell viability and toxicity of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles. The cytotoxic effect of nanoparticles was evaluated using the MTS (A, C, E) and LDH assays (B, D, F) in MG-63 cells, Raw 264.7 macrophage cells and PBMC. Cells were incubated with samples for 4, 24 and 48 h at 37°C. After the exposure time, MTS and LDH tests were performed. DPBS was used as the negative control. 500 μ M H₂O₂ and 1% v/v triton X-100 were used as positive controls for MTS and LDH assays, respectively. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 are significantly different from the negative control. Data are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments and were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). Blood samples for PBMC were collected from three different healthy human donors. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and siRNA concentrations.

Hemocompatibility of nanoparticles. In order to define the hemotoxicity profile of our DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles and free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂, a set of experiments were performed to evaluate the effect of their interaction with human blood components, namely cells, proteins and mediators. All tested nanoparticle and free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations with hemolysis assay (Figures 4A and S4A) were under the ASTM threshold of 5%.³⁶ A platelet aggregation test (Figure 4B) has shown that all concentrations (except for 10x) meet the guideline threshold of <20% for platelet clotting. TPC and 5x induced platelet clotting at $2.9 \pm 1.1\%$ and $15.6 \pm 8.6\%$, respectively, with no statistically significant difference compared to DPBS. For free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ (Figure S4B) aggregation was inferior to 20% for all concentrations, with a clot formation of $5.3 \pm 1.4\%$ for TPC. The hemagglutination assay showed a weak agglutination with the formation of a smooth mat of red blood cells on the well bottom (Figure 4C) for all concentrations, except for 10x which showed a mild aggregation. Free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ had similar outcomes as well (Figure S4C).

Plasma clotting times, measured with the APTT, PT and TT assays, showed that all DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle concentrations were within the normal clinical limits established for the test (Figure 4D). For TPC, the clotting times were as follows: $13.1 \pm 0.2s$ for PT, $33.1 \pm 1.3s$ for APTT and $15.6 \pm 0.4s$ for TT; while for DPBS they were: $12.6 \pm 0.2s$ for PT, $32.7 \pm 1.3s$ for APTT and $15.8 \pm 0.4s$ for TT, with no statistically significant difference. Free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ showed similar responses (Figure S4D).

A western blot analysis of the native C3 α chain cleavage (~ 115 kDa) to split product C3c (~ 43 kDa), evaluated the activation of any of the three major pathways of the complement system (classical, alternative and lectin). Figure 4E shows that all nanocomplexes meet the guideline criteria, as none of the DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle concentrations led to complement system activation, as indicated by the absence of C3c cleaved products, contrary to the positive control (CVF). Free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ showed the same effect as nanocomplexes (Figure S4E). Transferrin (~ 77 kDa) was used as a serum loading control, showing equal protein content between samples.

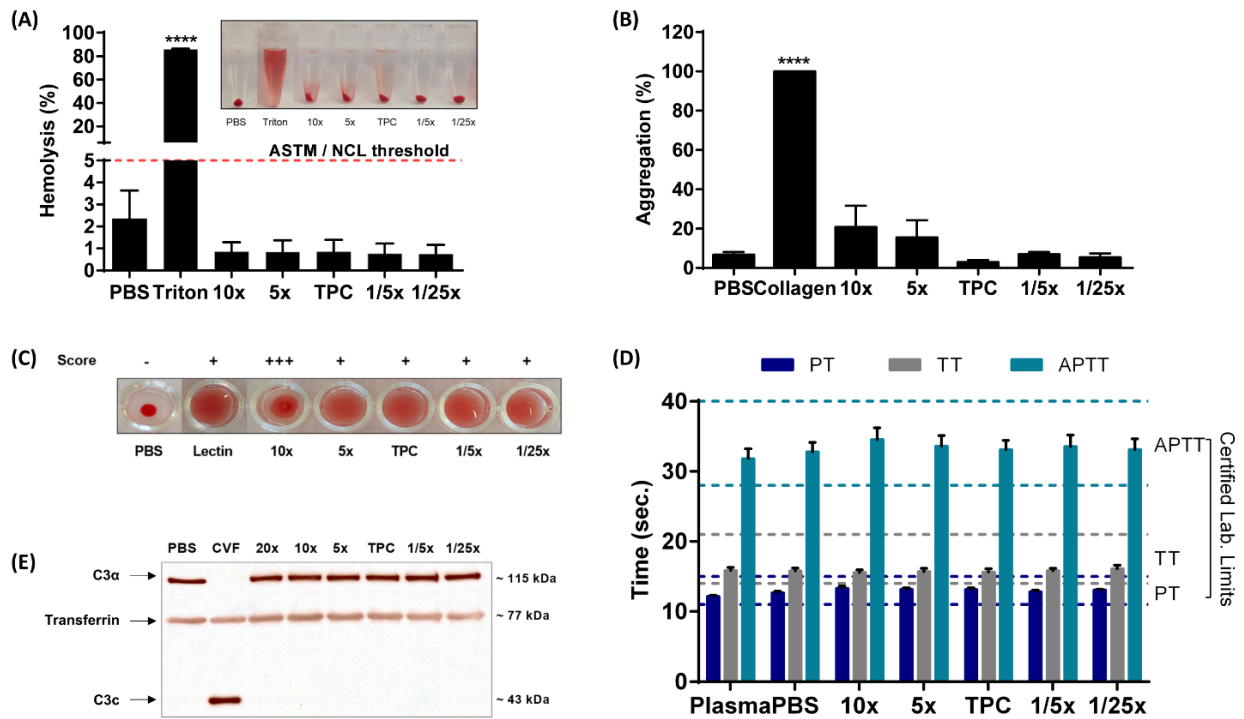


Figure 4. Hemocompatibility of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles. (A) Hemolysis percentage induced by nanoparticles and visual inspection of tubes after the centrifugation step (inset). Human blood was incubated with samples for 3 h at 37°C. DPBS and triton represent the negative and positive controls, respectively. Pink dash line shows the 5% threshold of ASTM from which a sample is considered to have hemolytic properties. Data are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments and were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (B) Nanoparticle platelet aggregation profiles after platelet-rich plasma was incubated with samples for a 6 min run at 37°C. PBS and collagen represent the negative and positive controls, respectively. Data are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments and were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (C) Hemagglutination activity produced by nanoparticles in an erythrocyte suspension after 1 h of incubation at 37°C. DPBS and lectin represent the negative and positive controls, respectively. Pictures represent one of three independent experiments with similar results. The agglutination analysis was performed as described in the methods. (D) Effect of particles on plasma coagulation times: prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and activated partial thromboplastin time

(APTT). Measures were taken after a 30 min incubation of human plasma with samples at 37°C. The normal coagulation time limits are indicated with a colored dash line (PT $11 \leq 15$ s (dark blue), TT $14 \leq 21$ s (gray) and APTT $28 \leq 40$ s (light green)). Non-treated plasma and DPBS were used as internal controls for the test. Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments and were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (E) Complement activation assay showing the expression levels of a native C3 α chain (~ 115 kDa) and its cleavage product C3c (~ 43 kDa), after human plasma exposure to nanoparticles for 30 min at 37°C. DPBS and CVF represent the negative and positive controls, respectively. Transferrin (~ 77 kDa) was used as a serum loading control. Blots represent one of three independent experiments with similar results. For all experiments, blood samples were collected from at least three healthy human donors. **** $p < 0.0001$ are significantly different from the negative control. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and siRNA concentrations.

Nanoparticle potential to induce cytokines. A key test to estimate one of the possible immune responses to cell-particle interactions is to quantify the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. In PBMC, no statistically significant differences in TNF- α (Figure 5A) and IL-6 (Figure 5B) secretion were observed, in any of the DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles or free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations tested when compared to DPBS. TNF- α expression levels at TPC were 287.8 ± 67.0 pg/mL vs 84.5 ± 44.5 pg/mL for DPBS, while for LPS they were 1117 ± 185.2 pg/mL. IL-6 levels reached 150.2 ± 44.1 pg/mL for TPC vs 55 ± 49.2 pg/mL for DPBS, and 927.8 ± 117.1 pg/mL for LPS. On the other hand, IL-8 and IL-1 β (Figures 5C and D) were both secreted in response to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles. The former reached 4082 ± 1313 pg/mL at TPC vs 418.3 ± 200.0 pg/mL for DPBS and 7539 ± 2079 pg/mL for LPS, while the latter reached 629.8 ± 111.0 pg/mL for TPC vs 100.6 ± 45.6 pg/mL for DPBS ($p < 0.01$) and 502.8 ± 148.3 pg/mL for LPS. Finally, IL-10 (Figure 5E) and IL-4 (Figure 5F) expression levels were not statistically significant compared to DPBS. Similar secretion profiles were observed when cells were incubated with free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ (Figures S5A-F).

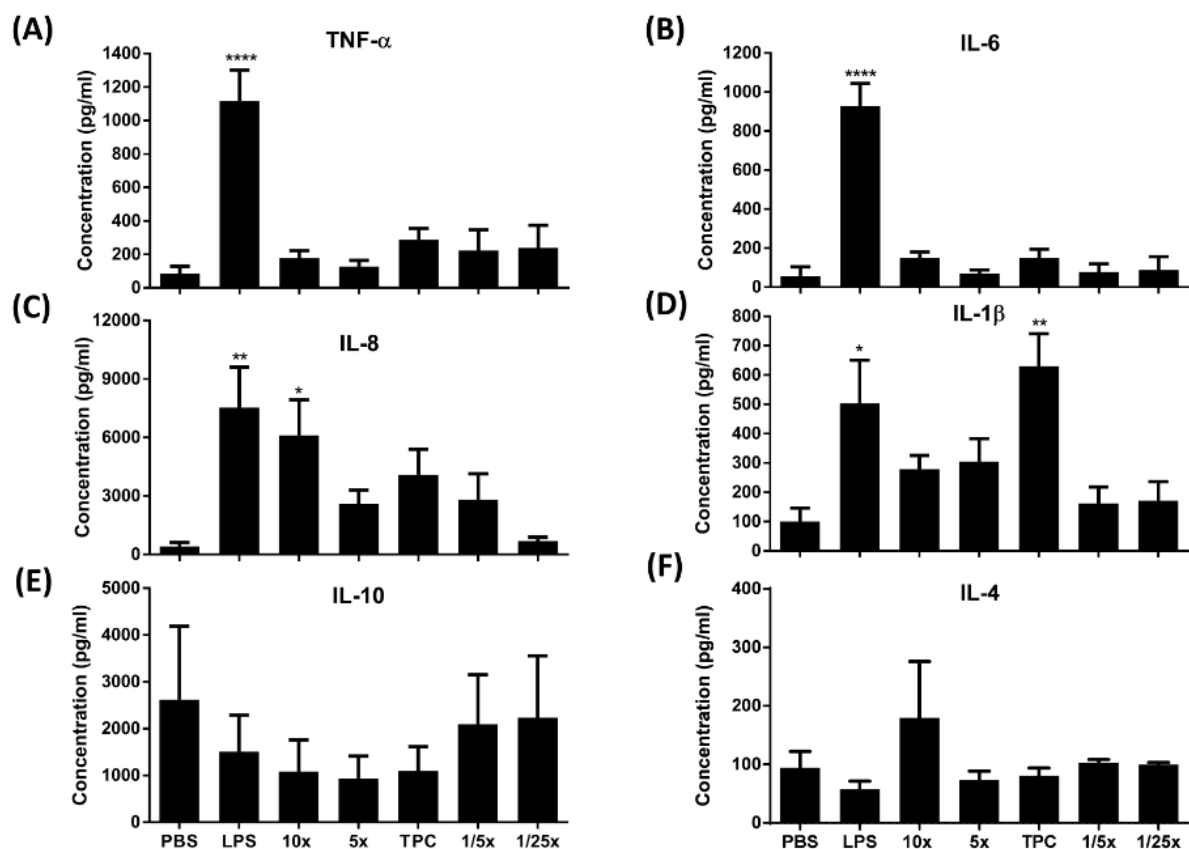


Figure 5. Nanoparticle potential to induce cytokines. (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IL-1 β , (E) IL-10, and (F) IL-4 cytokines were detected by ELISA, after PBMC incubation with nanoparticles for 24 h at 37°C. DPBS and LPS (20 ng/mL) were used as negative and positive controls, respectively. Data are expressed as the mean \pm SEM of five independent experiments, each one from a different healthy human donor, except for IL-4 where N=4. * p <0.05, ** p <0.01, **** p <0.0001 are significantly different from the negative control. Data were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and siRNA concentrations.

NO and ROS production. Nanoparticles have the capacity to produce ROS and impair the normal intracellular redox homeostasis, overriding the antioxidant capacity of cells.¹⁷ NO and ROS are effector molecules released by activated macrophages to defend the cell from pathogens.

Therefore, the detection of ROS and NO can help estimate the effect of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles or free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ on cell responses.

Our results on NO production showed no statistically significant difference for any of the tested particle concentrations, when compared to the negative control DPBS (Figure 6A). Similar results were found with free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ (Figure S6A).

As for ROS, Figure 6B shows no statistically significant difference between samples and the negative control DPBS. Conversely, there was an increase in ROS production for the H₂O₂ and DEM positive controls, from the start of exposure for the former, and 2 h after incubation for the latter. Free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ had a similar response for all tested concentrations (Figure S6B).

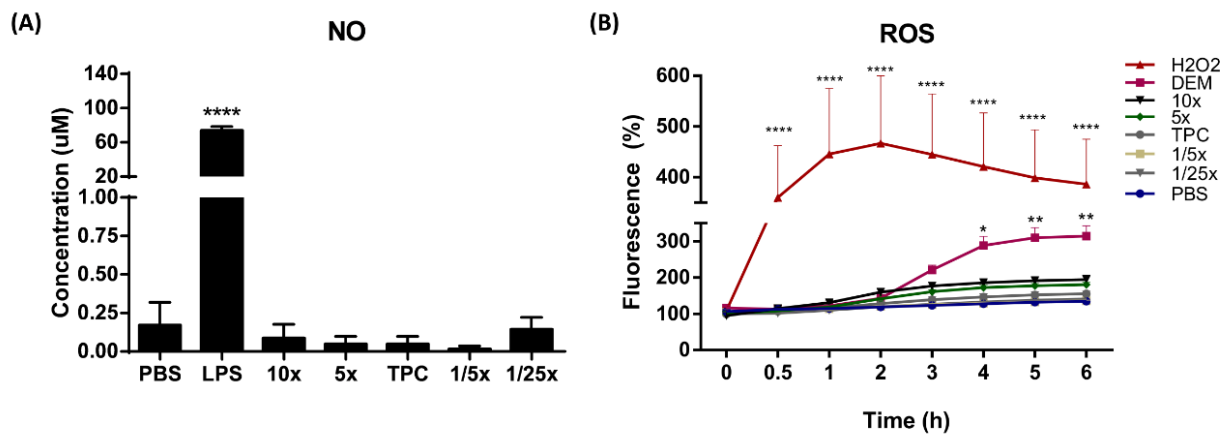


Figure 6. Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production in response to nanoparticles. (A) NO concentration produced by Raw 264.7 macrophage cells in response to nanoparticles. Cells were incubated with samples for 48 h at 37°C. NO²⁻ concentration was measured in cell supernatants using the Greiss reagent. DPBS and LPS (100 ng/mL) were used as negative and positive controls, respectively. Data were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (B) ROS induction by nanoparticles in Raw 264.7 cells. Cells were exposed to samples for 6 h, after pre-incubation with 20 µM of DCFH-DA probe. Fluorescence readings (ex. 485 nm and em. 530 nm) were performed at the indicated time points. 500 µM H₂O₂ and 5 mM

DEM were used as positive controls. DPBS in blue represents the negative control. Data were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). Data from NO and ROS are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ are significantly different from the negative control. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and siRNA concentrations.

Discussion

In the last decades, CH has garnered significant interest because of its many applications in several biomedical fields, as well as for its physicochemical properties and biocompatibility. On the nanoscale, the therapeutic potential of this polysaccharide as a drug delivery system and as a vector of genetic payloads, among others, has been acknowledged.³ We have previously reported that adding DEAE to the main CH chain modifies its pKa characteristics, improving the buffering capacity of nanoparticles, as well as their endosomal escape and the release of cargo in the cytoplasm, which enhances their transfection efficiency.^{19,26} As previously shown, adding FA to our nanovector also improves the capacity to target cells expressing the folate receptor (FR).²⁸ Herein, we synthesized stable DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles at physiological pH (7.2), as demonstrated by the uniformity in size and PDI measurements over 24 h at a N/P ratio of 15:1. This characteristic improves their potential for therapeutic applications as it makes their use in biological conditions possible. CH interacts electrostatically with genetic materials to form nanoparticles without the need for organic solvents, thanks to its positively charged surface. Therefore, a simple nanoparticle preparation in a DPBS solution (pH 7.2) was favored, according to ASTM and NCL recommendations, as it prevents additives/surfactants toxicity.^{46,47}

In our study, we followed the guidelines from ISO,⁴⁸ ASTM,⁴⁹ and NCL,²³ which were adapted to our intended route of exposure, potential cellular targets and equipment/reagent availability. This allowed us to estimate the biological response to CH in two ways: complexed with siRNA and in free form. The protocols chosen evaluated the interaction between nanocomplexes and blood components, as our nanoparticles are intended to pass through the bloodstream before reaching their target. All the *in vitro* studies were performed with TPC as the principal concentration, derived from a potential therapeutic dose in an *in vivo* study. Moreover, we achieved a modified CH polymer synthesis with undetectable levels of endotoxin contamination (<0.1 EU/mL), to avoid interference with the *in vitro* outcomes.

In the present study, PBMC were studied for their potential cell-particle interactions in the bloodstream. PBMC (only monocytes) and Raw 264.7 cells express FR over their surface,^{50,51} which may be recognized by the folate ligand grafted to the CH structure. For their part, MG-63

cells were of interest as they do not express FR,^{28,52} making it possible to correlate the effect of folate targeting to the overall cell viability results. Cytotoxicity studies revealed that cell viability and LDH release were dose, time and cell-type dependent. As expected, both MG-63 and PBMC cell viability were not significantly affected at the three lowest concentration levels (TPC, 1/5x and 1/25x) and for all incubation times (4, 24 and 48 h). This suggests a low toxicity profile for our nanoparticles, which could be explained by the limited presence of FR on their surface. On the other hand, cell viability of Raw 264.7 macrophages decreased significantly in a dose and time-dependent manner. We hypothesize that the phagocytic role of these cells increases through the interaction between FR on the cell's surface and folic ligands conjugated to the CH structure, which may explain their reduced viability. This hypothesis is supported by Yang et al⁵¹ who report that folic acid on CH nanoparticles enhanced specific internalization and gene silencing in activated Raw 264.7 macrophages. Finally, the increasing level of LDH release from Raw 264.7 cells incubated with both DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles and free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ could be the result of a cell death process or a change in cell surface permeability.⁵³ The discrepancy between MTS and LDH results in these cells could be explained by the transient formation of nanoscale holes on the cellular membrane during particle internalization,^{54,55} leading to LDH release⁵⁶ in the culture medium. This could occur without it being correlated to cell death activation. Therefore, cell mitochondria could still process the MTS substrate and give acceptable viability results, as those obtained for Raw 264.7 cells, despite the high levels of LDH release observed. Different CH based nanoparticles have been tested in Raw 264.7 macrophages and PBMC. Overall, cell viability is frequently above 70% when evaluated by MTS assay or its derivatives (MTT, XTT, etc.).⁵⁷⁻⁶¹ For instance, Raw 264.7 cells treated with a mannosylated CH-graft-polyethylenimine copolymer showed ~95% viability after a 24 h exposure at concentrations around our TPC.⁵⁷ In PBMC, CH gold nanoparticles showed low cytotoxicity for concentrations up to 75 μ M.⁶⁰ However, most of the studies do not evaluate LDH release, making toxicity comparisons difficult, since the methodology used to evaluate cytotoxicity differs between research groups. Finally, it is clear that the CH nanoformulation, its physicochemical characteristics, tested concentrations, and percentage of cellular uptake, all contribute to the variations in cell viability results.

In the next step, hemocompatibility screening gave promising results for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles when it came to blood-contact purposes. The interaction between erythrocyte and DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles or free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ meet the ASTM threshold of <5% for hemolytic properties. This weak hemolytic response can be attributed, in part, to the attachment of PEG molecules to the CH structure, which enhanced their hemocompatible properties.⁶² Thereafter, we assessed plasma coagulation times and platelet aggregation properties, as data from the literature indicates that nanoparticles may trigger platelet adhesion or deplete coagulation factors, leading to thrombogenicity and bleeding.^{30,63} Our results showed that DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles and free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ meet the established clinical limits for the test, as they did not influence any of the main coagulation pathways (intrinsic (APTT), extrinsic (PT) and common (TT)). Moreover, platelet aggregation satisfied the <20% aggregation threshold for the four lowest nanocomplex concentrations (5x, TPC, 1/5x and 1/25x), establishing their low platelet clotting properties. Finally, the results from the complement activation test also fulfill the guideline requirements as nanoparticles were unable to cleave the C3 α chain molecule. This is an important characteristic to avoid allergic and anaphylactic reactions⁶³ when aiming for systemic administration.

However, the hemagglutination assay showed a slight aggregation of red blood cells at all concentrations of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles or free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. This weak cell adhesion occurred without loss of membrane integrity, as the low hemoglobin release in the hemolysis test showed. Lima et al³⁸ found that the contact between CH nanoparticles and erythrocytes creates a net that could trigger hemagglutination. The polymer's positive charge could explain this, as it may allow an electrostatic interaction with the negative surface of red blood cells, and activate the agglutination process.³⁸ This hypothesis is supported by the findings of Fan et al,⁶⁴ who confirmed that CH nanoparticles can easily attach to erythrocyte membranes. Our nanoparticles showed a zeta potential of $+8.9 \pm 0.7$ mV (N/P ratio of 15:1), which is considered a neutral surface charge according to NCL Method PCC-2.⁶⁵ However, it should be noted that the erythrocytes were resuspended in a NaCl solution (pH 5.5), as recommended in the hemagglutination protocol. Thus, we assume that a decrease in pH may have protonated the CH amine groups and raised the density of the positive charge, increasing its interaction with red

blood cells. Hence, the characterization of nanocomplexes with the same medium used for *in vitro* assays is appropriate. Unfortunately, it was not possible to exactly reproduce the testing conditions for a DLS measure, as interference made it impossible to detect an acceptable reading. Interestingly, current hemagglutination assays still lack a validated quantitative and predictive technique. However, the search for alternative methods is beyond the framework of this study.

We also analyzed the ability of nanoparticles to modulate cytokine expression, namely TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-4 and IL-10, as they play a key role in the inflammatory regulation processes.⁶⁶ Overall, most of the cytokine expression levels were not affected by our nanoparticles, although IL-8 and IL-1 β were induced at some concentrations. Cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, have a significant function in the acute inflammatory process, causing swelling and redness.⁶⁷ This response is increased when neutrophils are enrolled and activated, led by IL-8 chemokine.⁶⁷ It is interesting to see that only the IL-1 β and IL-8 levels were significantly released in our study, whereas TNF- α and IL-6 remained unaltered. It is also important to note that IL-8 induction was only statistically significant for the highest concentration tested, which was intended to achieve some toxicological response. TNF- α and IL-1 β are the primary cytokines that trigger and maintain inflammatory responses.⁶⁸ The fact that IL-1 β was induced but TNF- α was not seems to reflect an incomplete activation of the inflammatory pathway by DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles. This hypothesis is supported by the normal levels of IL-10 induced by our nanocomplexes, as this cytokine is substantially secreted during an inflammatory response to counterbalance the effects of pro-inflammatory mediators.⁶⁹ Similarly to IL-10, IL-4 secretion was comparable to baseline. As IL-4 is a mediator involved in IgE induction⁶⁸ throughout an allergic reaction, its normal levels let us surmise that our CH is safe (as a derivative of shrimps' exoskeleton) from a hypersensitivity response.

IL-1 β and IL-6 are known to cause fever and are therefore useful as pyrogenic markers when testing pharmaceutical preparations.³⁰ The fact that the LAL assay had a negative outcome, and IL-6 expression levels were low, allowed us to confirm that our CH nanoformulation is free of endotoxin contamination. High expression levels of IL-1 β have been associated to CH's capacity to activate the NLRP3 inflammasome pathway in human PBMC, mouse peritoneal macrophages and mouse bone marrow-derived macrophages (BMM Φ).⁷⁰ BMM Φ cells released a significant

level of IL-1 β in response to CH without secretion of other pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6, supporting our results.⁷⁰ Similarly, Feng et al⁷¹ have reported an IL-1 β production by Raw 264.7 macrophage cells, after stimulation with oligochitosans, which may be related to the recognition of this molecule by mannose receptors on the cell's surface. There are three main theories regarding the activation of the inflammasome pathway: the production of ROS, the destabilization of lysosomes during particle escapement, and the K⁺efflux.⁷⁰ According to our results, neither DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles nor free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ produced ROS, which suggests that inflammasome activation is not caused by ROS in this study. With regard to the lysosome translocation theory, we speculate that during nanoparticle escape from these organelles the inflammasome system could be activated, which may explain the production of IL-1 β . In turn, IL-1 β , as a mediator of the acute response, may have an effect on immune cells to produce IL-8. CH has been recognized as an immunostimulatory agent,⁷² as an adjuvant in vaccines,⁷³ and as a polymer with anti-inflammatory properties.⁷⁴ This last characteristic could set it apart from other polymers with a history of more consistent inflammatory reactions, such as PEI,⁶⁷ where intracellular stress and apoptotic cell death processes are involved.⁷⁵ In any case, deeper mechanistic studies about the inflammasome pathways and other CH signaling pathways are needed, to improve our understanding of the processes involved in the cellular response to CH.

Finally, oxidative stress studies showed that neither DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles nor free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ induced ROS or NO production by Raw 264.7 macrophage cells. These outcomes are interesting as nanoparticle-induced oxidative stress is involved in inflammatory response, cytotoxicity and genotoxicity.⁷⁶ CH has been associated with antioxidant activity thanks to its ROS scavenging ability.⁷⁷ For instance, CH has shown anti-oxidative properties in a LPS-injected mouse model via the restoration of glutathione levels and catalase activity.⁷⁸ Other CH modifications, such as gallic acid grafted onto O-carboxymethyl CH (GA-g-CMCS), showed a protective action against hydrogen peroxide treated cells, reducing ROS production and restoring superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activity.⁷⁹ Also noteworthy is the literature data showing the capacity of CH to produce ROS and consequently oxidative stress. Jesus et al⁸⁰ found that ROS production in Raw 264.7 macrophage cells was associated with the

%DDA of their CH polymer. Thus an 80% DDA in CH nanoparticles and polymer were able to induce ROS in a concentration-dependent manner, while a 93% DDA did not. Moreover, Sarangapani et al⁸¹ found that with a particular size of positively charged CH nanoparticles, the oxidative stress mechanism can be triggered through ROS generation and the depletion of glutathione, becoming selectively cytotoxic for leukemia cells. Similarly, Martinez et al⁶⁰ proposed CH gold nanoparticles (CH-AuNPs) to induce ROS production as a possible treatment for cancer cells. Reactive nitrogen species (RNS) production by phagocytes, especially NO, are key molecules to measure nanoparticle-induced injury,⁷⁶ and results reported in the literature are contradictory as for ROS. Thus, some CH formulations have the ability to induce NO production as part of the oxidative stress response,⁵⁹ while others have no effect.⁸⁰ It was also reported that CH possesses the ability to reduce the LPS-induced NO levels by Raw 264.7 macrophages.^{80,82} This conflicting data can be explained by the preparation procedures of the CH samples and their physicochemical characteristics, such as composition, size, charge and surface reactivity.⁷⁶

Taking into consideration the general results from all assays, and the fact that DPBS outcomes are comparable to those of non-treated cells, we concluded that this particle suspension medium did not influence the data. Therefore, as DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles and free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ had similar biological responses, we deduced that CH is the component with the strongest effect in the nanoformulation. This study allowed us to evaluate *in vitro*, the potential biological response to an *in vivo* dose of 30 µg siRNA-SSB/mouse (1.5 mg/kg), complexed with 320 µg of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/dose. As *in vitro* assays may predict the toxicity of *in vivo* studies,³⁰ a dose ranging between TPC and 1/5x concentration will be considered for the animal model.

This basic toxicological screening provides a strong starting point to evaluate the safety profile of nanomaterials (see Table 2). New complementary standard guidelines addressing nanotoxicology are available in several FDA^{83,84} and ISO⁸⁵ reports. Guideline implementation makes it possible to compare outcomes from different studies across laboratories, as the experimental conditions are already established by the different organizations. Finally, relevant aspects, such as endotoxin contamination and nanoparticle characterization, have to be addressed early on, at the preclinical development stage, to avoid inconsistencies with *in vitro* results, to improve our interpretation and to correlate biological responses.

Table 2. Toxicological screening guidelines

Test	Protocol	Reference
Endotoxin contamination	LAL assay	NCL method STE-1.1 ²⁹
Cytotoxicity	MTS	ASTM E2526-08 ³² and NCL GTA-2 ³³
	LDH	
Hemotoxicity	Hemolysis	ASTM E2524-08 ³⁶
	Hemagglutination	Banerjee et al, ³⁷ Lima et al, ³⁸ and Stavitsky et al ³⁹
	Complement activation	NCL method ITA-5.1 ⁴⁰
	Platelet aggregation	NCL method ITA-2.2 ⁴¹
	Coagulation times	NCL method ITA-12 ⁴³
Inflammatory response	Cytokines	NCL method ITA-10 ³⁴
Oxidative Stress	Nitric oxide production	NCL method ITA-7 ⁴⁴
	ROS production	NCL method GTA-7 ⁴⁵

Abbreviations: LAL, Limulus Amebocyte Lysate; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; LDH, Lactate Dehydrogenase; ROS, Reactive Oxygen Species; NCL, Nanotechnology Characterization Laboratory; ASTM, American Society for Testing and Materials.

Conclusion

This study supports the application of endotoxin-free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles for potential blood-contact purposes, thanks to their low hemotoxicity. This is illustrated by their weak hemolytic and platelet aggregation properties, and the absence of effect on complement system and coagulation times. Their size, siRNA complexation and stability over time are suitable for various applications. We observed that cytotoxicity is related to dose, cell type and exposure times. Moreover, their low oxidative stress response and cytokine production make them a promising candidate for gene therapy applications, especially in inflammatory conditions, warranting further investigation. Complementary studies will be carried out to clarify the mechanisms involved in LDH release and the IL-1 β levels observed in our study. Based on its toxicological profile reported herein, we conclude that this DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA platform is safe for potential biomedical applications administered intravenously, orally or topically. Future trials of our nanoparticles will address the biodistribution and toxicity of particles in a mouse model, using an in vivo imaging system as well as monitoring of the biomarkers for organ function.

Abbreviations

APTT: activated partial thromboplastin time; ASTM: American Society for Testing and Materials; AUC: area under the curve; BMM Φ : mouse bone marrow–derived macrophages; CH: chitosan; CVF: cobra venom factor; DA: degree of acetylation; DDA: degree of deacetylation; DEAE: diethylaminoethyl; DEM: diethyl maleate; DPBS: dulbecco's phosphate-buffered saline; DS: degree of substitution; FA: folic acid; FDA: Food and Drug Administration; FR: folate receptors; GPC: permeation chromatography; H₂O₂: hydrogen peroxide; HBSS: Hanks' balanced salt solution; H-NMR: nuclear magnetic resonance; IL: interleukin; ISO: International Organization for Standardization; LAL: limulus amebocyte lysate; LDH: lactate dehydrogenase; LPS: lipopolysaccharides; MM: molar mass; MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MW: molecular weight; N/P: amino groups/phosphate groups; NCL: Nanotechnology Characterization Laboratory; NiTi: nickel-titanium; NO: nitric oxide; OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PEG: polyethylene glycol; PEI: polyethylenimine; PFH: plasma-free hemoglobin; PPP: platelet poor plasma; PRP: platelet-rich plasma; PT: prothrombin time; ROS: reactive oxygen species; SEM: standard error of the mean; siRNA: small interfering RNA; TBH: total blood hemoglobin; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; TPC: theoretical plasma concentration; TT: thrombin time.

Ethics Approval and Informed Consent

Experiments with human blood were approved by the Research Ethics Committee from Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal (Protocol # 2017-1462). Informed consent was obtained from healthy donor volunteers who were not ill nor under medication at the time of blood sample collection.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of Data and Materials

Supporting data are available from authors.

Funding

This work was supported by grants from the « Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec, PSR-SIIRI-960 » and the « Chaire de Recherche en Orthopédie de l'Université de Montréal à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal » (J Fernandes and M Benderdour). Marcio Tiera was supported from FAPESP (Brazil) grants 2017/1033/-5 and 2017/04392-1. Elsa Patricia Rondon, Houda Benabdoun and Francis Vallières held scholarships from the « Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) », and Maicon Petronio had a scholarship from FAPESP (Brazil) 2015/05148-1.

Competing interests

Authors report no conflicts of interest in this work.

Authors' contributions

All authors made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; gave final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work.

Reference List

1. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 2016;33(10):2373-2387.
2. Shi Q, Rondon-Cavano E-P, Dalla Picola IP, et al. In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:387-402.
3. Shi Q, Tiera MJ, Zhang X, Dai K, Benderdour M, Fernandes JC. Chitosan-DNA/siRNA nanoparticles for gene therapy. In: Yuan X, editor. *Non-Viral Gene Therapy.* 2011;19:455-480.
4. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, De La Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol.* 2017;105:1358-1368.
5. Abdelhamid HN, El-Bery HM, Metwally AA, Elshazly M, Hathout RM. Synthesis of CdS-modified chitosan quantum dots for the drug delivery of Sesamol. *Carbohydr Polym.* 2019;214:90-99.
6. Zhao D, Yu S, Sun B, Gao S, Guo S, Zhao K. Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. *Polymers.* 2018;10(4):462.
7. Mohebbi S, Nezhad MN, Zarrintaj P, et al. Chitosan in biomedical engineering: a critical review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(2):93-116.
8. Dowaidar M, Nasser Abdelhamid H, Hällbrink M, Langel Ü, Zou X. Chitosan enhances gene delivery of oligonucleotide complexes with magnetic nanoparticles–cell-penetrating peptide. *J Biomater Appl.* 2018;33(3):392-401.
9. Guo X, Sun T, Zhong R, et al. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Front Pharmacol.* 2018;9:1412.
10. Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials.* 2010;31(32):8188-8197.

11. Shelma R, Sharma CP. Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;84(2):561-570.
12. Mohammadi F, Golafshan N, Kharaziha M, Ashrafi A. Chitosan-heparin nanoparticle coating on anodized NiTi for improvement of blood compatibility and biocompatibility. *Int J Biol Macromol*. 2019;127:159-168.
13. Pereira P, Pedrosa SS, Correia A, et al. Biocompatibility of a self-assembled glycol chitosan nanogel. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(3):638-646.
14. Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna T, Pessoa Jr A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(3):388-404.
15. Halamoda-Kenzaoui B, Holzwarth U, Roebben G, Bogni A, Bremer-Hoffmann S. Mapping of the available standards against the regulatory needs for nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2019;11(1):e1531.
16. Urbán P, Liptrott NJ, Bremer S. Overview of the blood compatibility of nanomedicines: A trend analysis of in vitro and in vivo studies. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2019;11(3):e1546.
17. ISO/TR 16197:2014(E), Nanotechnologies - Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials. www.iso.org.
18. Locascio L, Reipa V, Zook J, Pleus R. Nanomaterial toxicity: emerging standards and efforts to support standards development. In: Murashov V, Howard J, editors. *Nanotechnology standards*. Springer Science & Business Media; 2011: 179-208.
19. de Souza RHFV, Dalla Picola IP, Shi Q, et al. Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. *Int J Biol Macromol*. 2018;119:186-197.
20. EN ISO 10993-4:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 4: selection of tests for interactions with blood. www.iso.org.

21. ASTM F1903-10, Standard Practice for Testing For Biological Responses to Particles In Vitro, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010, DOI: 10.1520/F1903-10, www.astm.org.
22. American Society for Testing and Materials [homepage on the Internet]. E56.03 Environment, Health, and Safety. Available from: <https://www.astm.org/COMMIT/SUBCOMMIT/E5603.htm>. Accessed January 20, 2018.
23. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Assay Cascade Protocols. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
24. Abrams MT, Koser ML, Seitzer J, et al. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment. *Mol Ther*. 2010;18(1):171-180.
25. Seitzer J, Zhang H, Koser M, Pei Y, Abrams M. Effect of biological matrix and sample preparation on qPCR quantitation of siRNA drugs in animal tissues. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011;63(2):168-173.
26. Oliveira FdPP, Dalla Picola IP, Shi Q, et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine–chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. *Nanotechnology*. 2013;24(5):055101.
27. Cho KC, Jeong JH, Chung HJ, Joe CO, Kim SW, Park TG. Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis. *J Control Release*. 2005;108(1):121-131.
28. Fernandes JC, Qiu X, Winnik FM, et al. Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5833-5845.
29. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method STE-1.1 Detection and Quantification of Gram Negative Bacterial Endotoxin Contamination in Nanoparticle Formulations by End Point

Chromogenic LAL Assay. Version 1.3. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.

30. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *J Control Release*. 2013;172(2):456-466.

31. Food and Drug Administration [homepage on the Internet]. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers; 2005. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>. Accessed January 20, 2019.

32. ASTM E2526-08(2013), Standard Test Method for Evaluation of Cytotoxicity of Nanoparticulate Materials in Porcine Kidney Cells and Human Hepatocarcinoma Cells, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, DOI: 10.1520/E2526-08R13, www.astm.org.

33. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Stern ST, Adisheshaiah PP, Potter TM. NCL Method GTA-2 Hep G2 Hepatocarcinoma Cytotoxicity Assay. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.

34. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Potter TM, Neun BW, Rodriguez J, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-10 Preparation of Human Whole Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures to Analyze Nanoparticle Potential to Induce Inflammatory Cytokines, Chemokines and Interferons In Vitro. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.

35. EN ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. www.iso.org.

36. ASTM E2524-08(2013), Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, DOI: 10.1520/E2524-08R13, www.astm.org.

37. Banerjee N, Sengupta S, Roy A, Ghosh P, Das K, Das S. Functional alteration of a dimeric insecticidal lectin to a monomeric antifungal protein correlated to its oligomeric status. *PLoS One*. 2011;6(4):e18593.
38. Lima JMd, Sarmiento RR, Souza JRd, et al. Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
39. Stavitsky AB, Jarchow C. Micromethods for the study of proteins and antibodies: I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J Immunol*. 1954;72(5):360-367.
40. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-5.1 Qualitative Analysis of Total Complement Activation by Western Blot. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
41. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Rodriguez J, Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-2.2 Analysis of Platelet Aggregation by Light Transmission Aggregometry. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
42. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Rodriguez J, Neun BW, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-2.1 Analysis of Platelet Aggregation By Cell Counting. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
43. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Neun BW, Rodriguez J, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-12 Analysis of Nanoparticle Effects on Plasma Coagulation Times in Vitro. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
44. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Neun BW, Potter TM, Rodriguez J, Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. NCL Method ITA-7 Detection of Nitric

Oxide Production by the Macrophage Cell Line RAW264.7. Version 1.2. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.

45. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Stern ST, Zolnik BS. NCL Method GTA-7 Hepatocyte Primary ROS Assay. Version 1.1. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.

46. Ginzburg AL, Truong L, Tanguay RL, Hutchison JE. Synergistic toxicity produced by mixtures of biocompatible gold nanoparticles and widely used surfactants. *ACS Nano*. 2018;12(6):5312-5322.

47. Nadesh R ND, P R S, Vadakumpully S, Mony U, Koyakkutty M, Nair SV, Menon D. Hematotoxicological analysis of surface-modified and -unmodified chitosan nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(10):2957-66.

48. International Organization for Standardization [homepage on the Internet]. ISO/TC 229 Nanotechnologies. Available from: <https://www.iso.org/committee/381983/x/catalogue/>. Accessed January 20, 2018.

49. American Society for Testing and Materials [homepage on the Internet]. Nanotechnology Standards. Available from: <https://www.astm.org/Standards/nanotechnology-standards.html>. Accessed January 20, 2018.

50. Shen J, Hilgenbrink AR, Xia W, et al. Folate receptor- β constitutes a marker for human proinflammatory monocytes. *J Leukoc Biol*. 2014;96(4):563-570.

51. Yang C, Gao S, Kijms J. Folic acid conjugated chitosan for targeted delivery of siRNA to activated macrophages in vitro and in vivo. *J Mater Chem B*. 2014;2(48):8608-8615.

52. Wang X, Yao S, Ahn H-Y, et al. Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging. *Biomed Opt Express*. 2010;1(2):453-462.

53. Contini C, Schneemilch M, Gaisford S, Quirke N. Nanoparticle–membrane interactions. *J Exp Nanosci*. 2018;13(1):62-81.

54. Lin J, Alexander-Katz A. Cell membranes open “doors” for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. *ACS Nano*. 2013;7(12):10799-10808.
55. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett*. 2008;8(2):420-424.
56. Hong S, Leroueil PR, Janus EK, et al. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem*. 2006;17(3):728-734.
57. Jiang H-L, Kim Y-K, Arote R, et al. Mannosylated chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier for Raw 264.7 cell targeting. *Int J Pharm*. 2009;375(1-2):133-139.
58. Xiao B, Ma P, Ma L, et al. Effects of tripolyphosphate on cellular uptake and RNA interference efficiency of chitosan-based nanoparticles in Raw 264.7 macrophages. *J Colloid Interface Sci*. 2017;490:520-528.
59. Yang Y, Xing R, Liu S, et al. Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3 K/Akt signaling pathway. *Int J Biol Macromol*. 2018;108:1310-1321.
60. Martínez-Torres AC, Zarate-Triviño DG, Lorenzo-Anota HY, Ávila-Ávila A, Rodríguez-Abrego C, Rodríguez-Padilla C. Chitosan gold nanoparticles induce cell death in HeLa and MCF-7 cells through reactive oxygen species production. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3235-3250.
61. Alinejad V, Somi MH, Baradaran B, et al. Co-delivery of IL17RB siRNA and doxorubicin by chitosan-based nanoparticles for enhanced anticancer efficacy in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:229-240.
62. Balan V, Verestiuc L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review. *Eur Polym J*. 2014;53:171-188.
63. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*. 2008;5(4):487-495.

64. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;95:258-265.
65. Nanotechnology Characterization Laboratory [homepage on the Internet]. Clogston JD. NCL Method PCC-2 Measuring Zeta Potential of Nanoparticles. Version 1.1. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed January 20, 2018.
66. Shankar E, Ramasubramanian A. Hemocompatibility of Nanoparticles. In: Sitharaman B, editor. *Nanobiomaterials handbook*. CRC Press; 2016:31-1.
67. Elsabahy M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem Soc Rev*. 2013;42(12):5552-5576.
68. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997;2(1):d12-d26.
69. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(4):477-487.
70. Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, Levitz SM. Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *J Immunol*. 2014;192(12):5943-5951.
71. Feng J, Zhao L, Yu Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(2):414-420.
72. Fong D, Hoemann CD. Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage. *Future Sci OA*; 2017; 4(1):FSO225.
73. Carroll EC, Jin L, Mori A, et al. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*. 2016;44(3):597-608.
74. Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J Funct Biomater*. 2015;6(1):33-49.

75. Beyerle A, Irmeler M, Beckers J, Kissel T, Stoeger T. Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications. *Mol Pharm.* 2010;7(3):727-737.
76. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 942916.
77. Ngo D-H, Vo T-S, Ngo D-N, et al. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocoll.* 2015;51:200-216.
78. Qiao Y, Bai X-F, Du Y-G. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(1):121-127.
79. Bai R, Yong H, Zhang X, Liu J, Liu J. Structural characterization and protective effect of gallic acid grafted O-carboxymethyl chitosan against hydrogen peroxide-induced oxidative damage. *Int J Biol Macromol.* 2020;143:49-59.
80. Jesus S, Marques AP, Duarte A, et al. Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:100.
81. Sarangapani S, Patil A, Ngeow YK, Elsa Mohan R, Asundi A, Lang MJ. Chitosan nanoparticles' functionality as redox active drugs through cytotoxicity, radical scavenging and cellular behaviour. *Integr Biol.* 2018;10(5):313-324.
82. Xu Q, Liu M, Liu Q, Wang W, Du Y, Yin H. The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264. 7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly N-acetylated chitooligosaccharide. *Carbohydr Polym.* 2017;174:1138-1143.
83. Food and Drug Administration [homepage on the Internet]. Nanotechnology/Nanotoxicology; 2019. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/cdrh-research-programs/nanotechnologynanotoxicology>. Accessed October 10, 2019.
84. Food and Drug Administration [homepage on the Internet]. Nanotechnology Task Force Report; 2007. Available from: <https://www.fda.gov/science-research/nanotechnology-programs-fda/nanotechnology-task-force-report-2007#definitions>. Accessed January 20, 2019.

85. ISO/TR 10993-22:2017. Biological evaluation of medical devices — Part 22: Guidance on nanomaterials. www.iso.org.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Evidence supporting the safety of pegylated diethylaminoethyl-chitosan polymer as a vector in gene therapy applications

Elsa Patricia Rondon ¹; Houda Abir Benabdoun ¹; Francis Vallières ¹; Maicon Segalla Petrônio ²;
Marcio José Tiera ²; Mohamed Benderdour ¹; Julio Cesar Fernandes ¹

¹Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

²Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences. Department of Chemistry and Environmental Sciences, UNESP-São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil.

Correspondence should be addressed to Dr. Julio Cesar Fernandes. Phone: (1) 514-338-2222 Ext. 2489. E-mail: julio.c.fernandes@umontreal.ca

This work was done in Montréal (QC, Canada) and Sao Jose do Rio Preto (SP, Brazil).

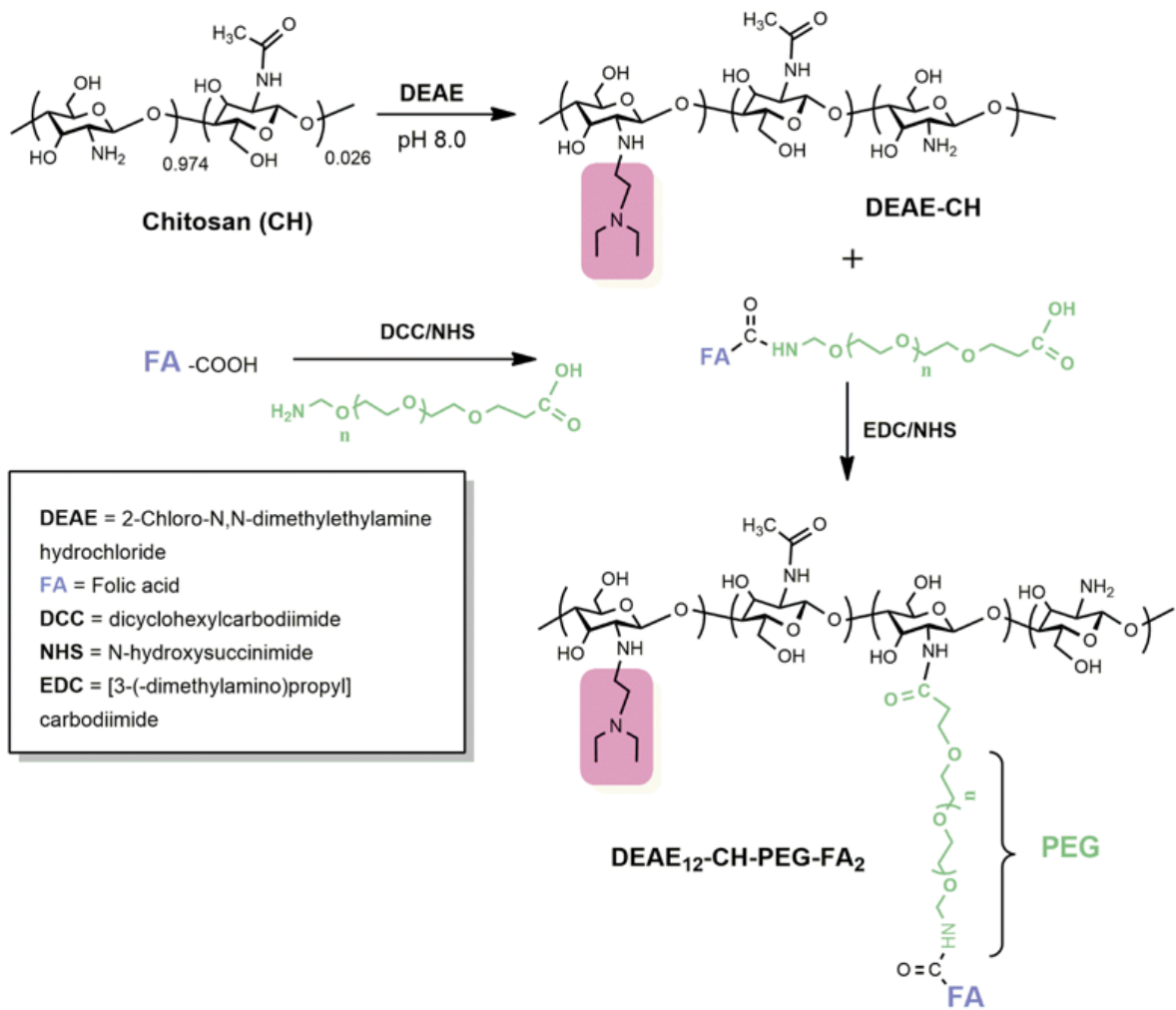
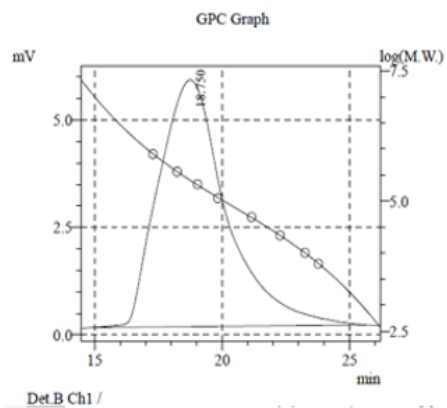


Figure S1. Diagram representing the synthesis procedure of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂.

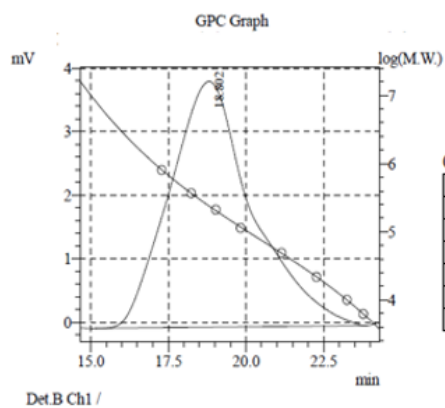


CH DDA 97.4%

Chromatogram Det.B Ch1

#	Title	Mn	Mw	Mz	Mw/Mn
1	CH DDA	91327	270048	460946	2.95693
	Average	91327	270048	460946	2.95693
	%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
	Maximum	91327	270048	460946	2.95693
	Minimum	91327	270048	460946	2.95693
	SD	0	0	0	0.00000

GPC Summary



DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂

Chromatogram Det.B Ch1

#	Title	Mn	Mw	Mz	Mw/Mn
1	DEAE-CH-PEG-FA lcd	124288	259410	452577	2.08717
	Average	124288	259410	452577	2.08717
	%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
	Maximum	124288	259410	452577	2.08717
	Minimum	124288	259410	452577	2.08717
	SD	0	0	0	0.00000

GPC Summary

Figure S2. GPC traces for the original CH and DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂.

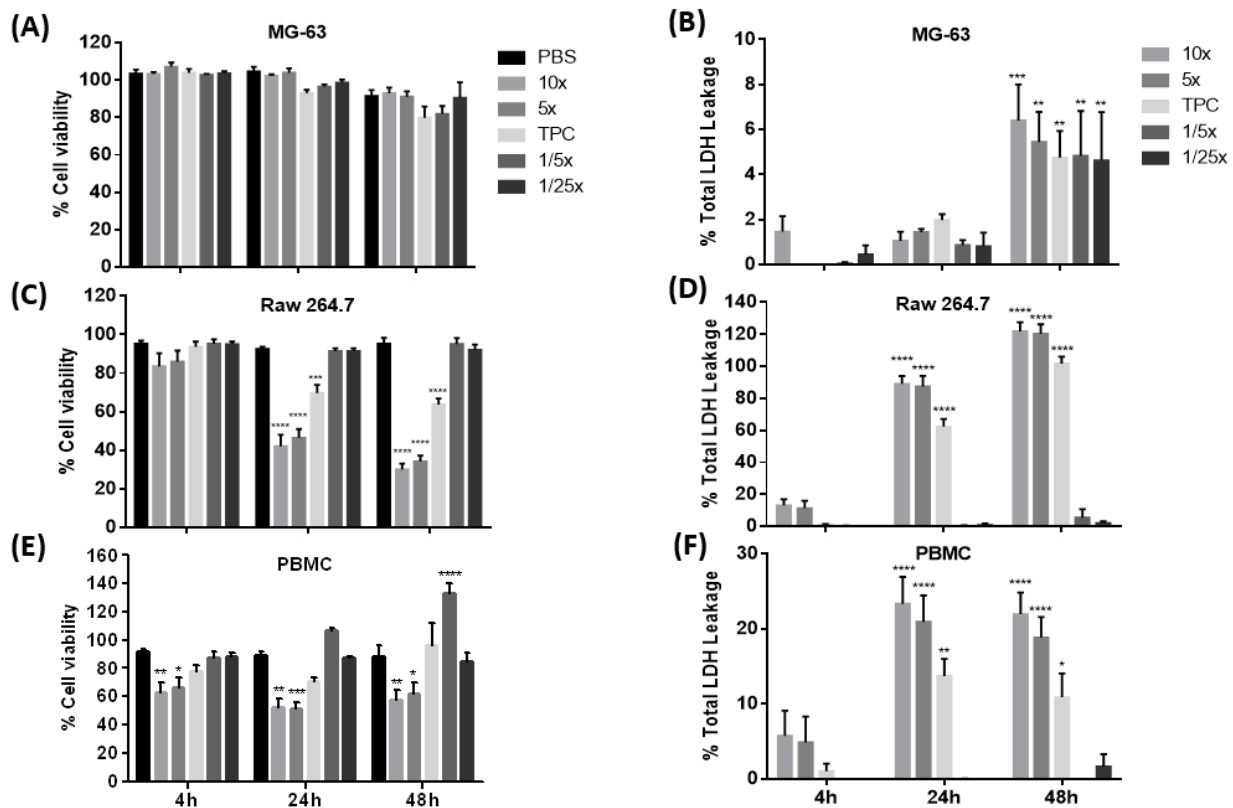


Figure S3. Cell viability and toxicity of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. The cytotoxic effect of free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ was evaluated using the MTS (A, C, E) and LDH assays (B, D, F) in MG-63 cells, Raw 264.7 macrophage cells and PBMC. Cells were incubated with samples for 4, 24 and 48 h at 37°C. DPBS was used as a negative control. 500 μM H₂O₂ and 1% v/v triton X-100 were used as positive controls for MTS and LDH assays, respectively. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 are significantly different from the negative control. Data are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments and were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). Blood samples to obtain PBMC were collected from three different healthy human donors. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations.

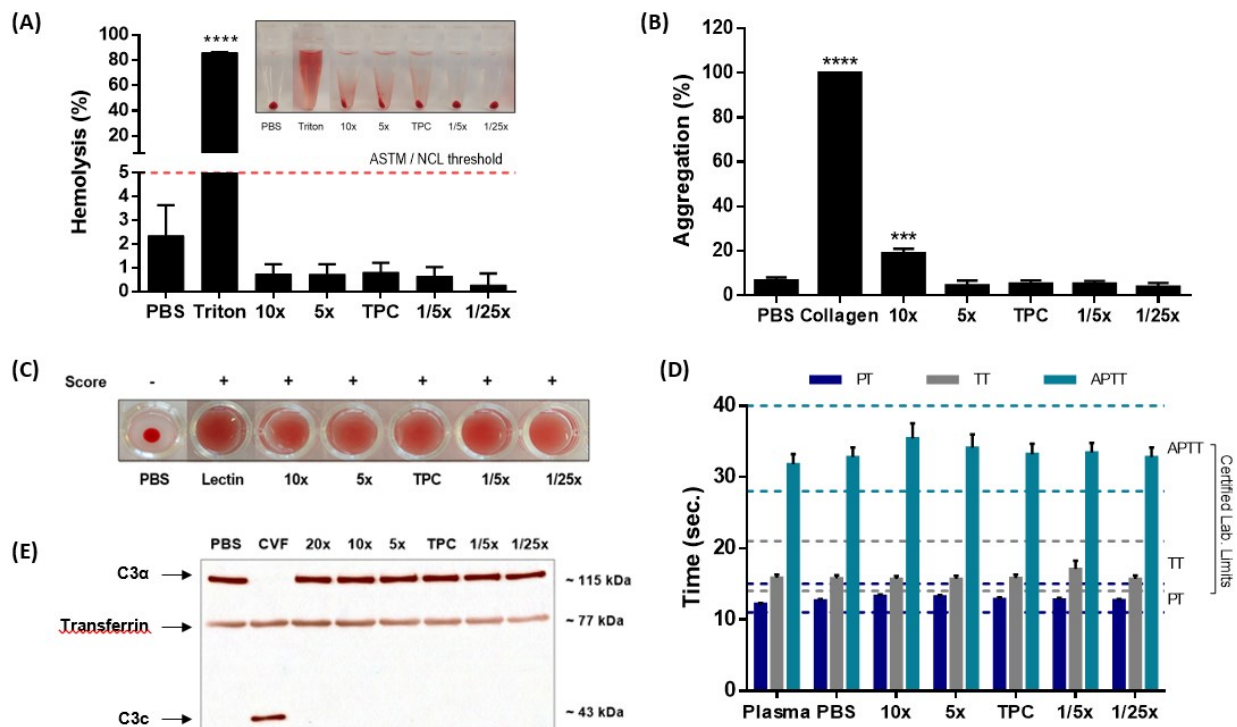


Figure S4. Hemocompatibility of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. (A) Hemolysis percentage induced by free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ and visual inspection of tubes after the centrifugation step (inset). Human blood was incubated with samples for 3 h at 37°C. DPBS and triton represent the negative and positive controls, respectively. Pink dash line shows the 5% threshold of ASTM from which a sample is considered to have hemolytic properties. Data are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments and were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (B) The platelet aggregation profile of free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂, after platelet-rich plasma was incubated with samples for a 6 min run at 37°C. PBS and collagen represent the negative and positive controls, respectively. Data are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments and were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (C) Hemagglutination activity produced by DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ in an erythrocyte suspension after 1

h incubation at 37°C. DPBS and lectin represent the negative and positive controls, respectively. Pictures represent one of three independent experiments with similar results. The agglutination analysis was performed as described in the methods. (D) Effect of free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ on plasma coagulation times: prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and activated partial thromboplastin time (APTT). Measures were taken after 30 min incubation of human plasma with samples at 37°C. The normal coagulation time limits are indicated with a colored dash line (PT 11 ≤ 15s (dark blue), TT 14 ≤ 21s (gray) and APTT 28 ≤ 40s (light green)). Non-treated plasma and DPBS were used as internal controls for the test. Data are expressed as the mean ± SEM of four independent experiments and were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (E) Complement activation assay showing the expression levels of a native C3α chain (~115 kDa) and its cleavage product C3c (~43 kDa), after human plasma exposure to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ for 30 min at 37°C. DPBS and CVF represent the negative and positive controls, respectively. Transferrin (~77 kDa) was used as a serum loading control. Blots represent one of three independent experiments with similar results. For all experiments, blood samples were collected from at least three healthy human donors. ***p<0.001, ****p<0.0001 are significantly different from the negative control. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations.

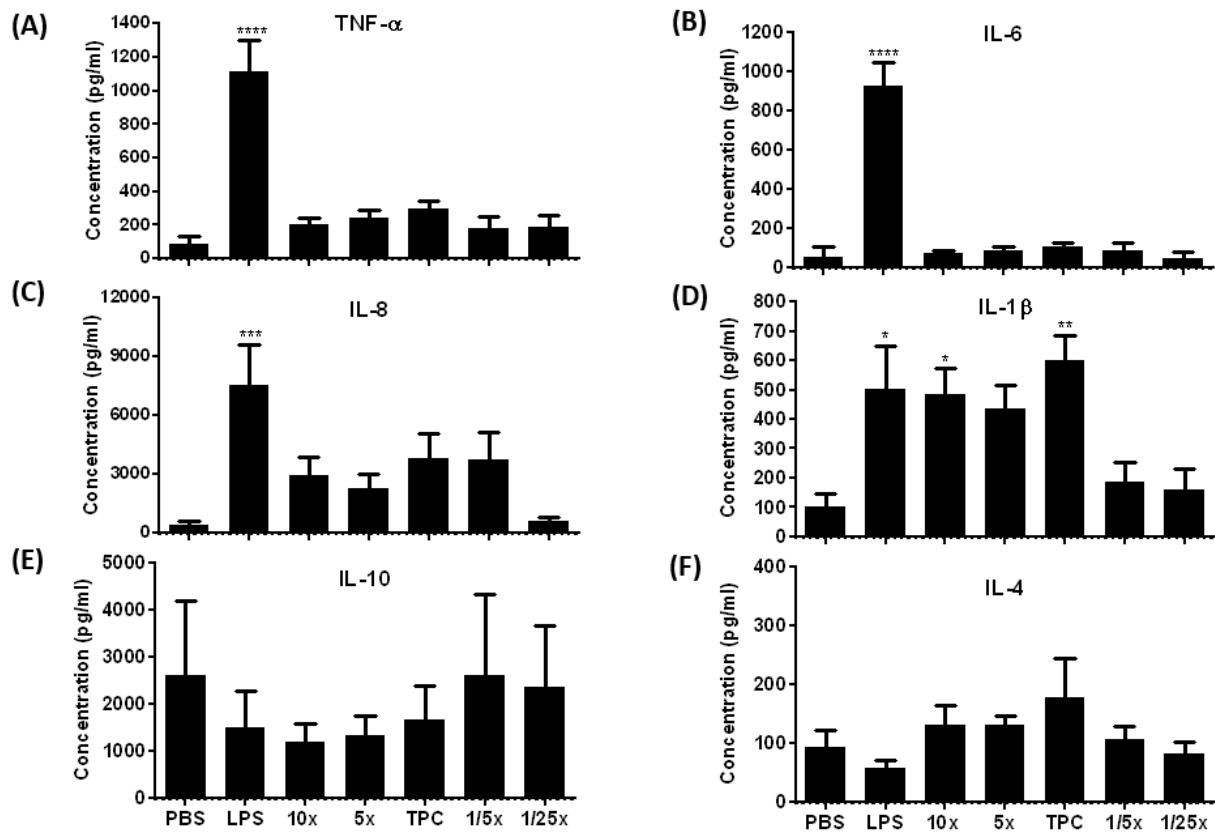


Figure S5. DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ potential to induce cytokines. (A) TNF-α, (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IL-1β, (E) IL-10, and (F) IL-4 cytokines were detected by ELISA, after PBMC incubation with free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ for 24 h at 37°C. DPBS and LPS (20 ng/mL) were used as negative and positive controls, respectively. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 are significantly different from the negative control. Data are expressed as the mean ± SEM of five independent experiments, each one from a different healthy human donor, except for IL-4 where N=4. Data were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations.

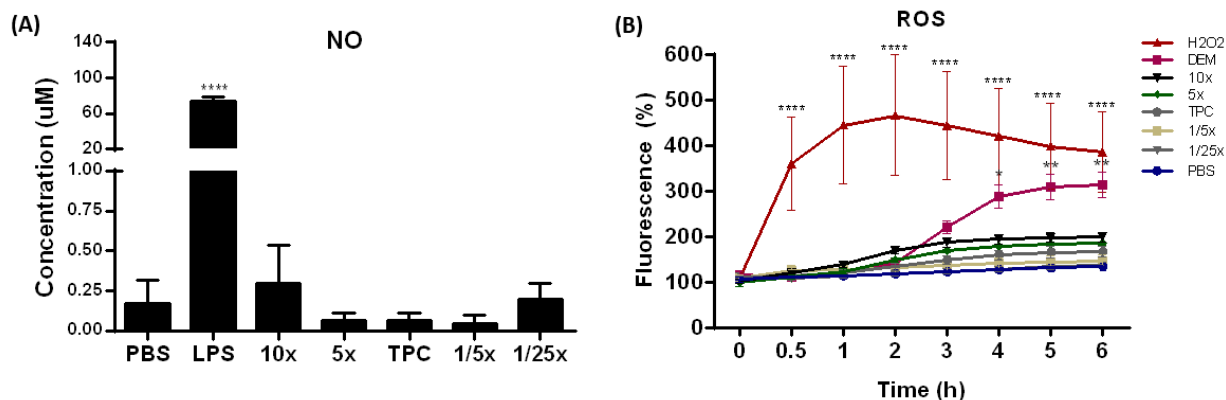


Figure S6. Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production in response to free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. (A) NO concentration produced by Raw 264.7 macrophage cells in response to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂. Cells were incubated with samples for 48 h at 37°C. NO₂⁻ concentration was measured in cell supernatants using the Greiss reagent. DPBS and LPS (100 ng/mL) were used as negative and positive controls, respectively. Data were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (B) ROS induction by DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ in Raw 264.7 cells. Cells were exposed to samples for 6 h, after pre-incubation with 20 μM of DCFH-DA probe. Fluorescence readings (ex. 485 nm and em. 530 nm) were performed at the indicated time points. 500 μM H₂O₂ and 5 mM DEM were used as positive controls. DPBS in blue represents the negative control. Data were analyzed by Two-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). Data from NO and ROS are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 are significantly different from the negative control. See Table 1 for DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ concentrations.

Article 2: Titre: Investigation of signaling pathways-induced by pegylated diethylaminoethyl-chitosan nanoparticles: are TLR-4 and C-type lectin receptors involved?

Ordre des auteurs : Elsa Patricia Rondon, Francis Vallières, Houda Abir Benabdoun, Marcio José Tiera, Mohamed Benderdour et Julio Cesar Fernandes.

Cet article a été soumis le 12 août 2021 à la revue : International Journal of Biological Macromolecules. La preuve de soumission se trouve dans l'annexe 1 de la thèse.

Contribution du premier auteur : recherche de littérature, émission des hypothèses, conception des expériences, mise au point des conditions pour l'exécution des essais, réalisation des expériences, obtention des données, analyses de résultats, rédaction et correction de l'article. Contribution : 80%.

Description de la contribution des différents coauteurs :

Francis Vallières: émission des hypothèses, conception des expériences, réalisation des expériences, analyses de résultats et révision de l'article. Contribution : 10%

Houda Abir Benabdoun : contribution à la conception et réalisation des expériences préliminaires, analyses de résultats et révision de l'article.

Marcio José Tiera, Mohamed Benderdour et Julio Cesar Fernandes: Contribution à l'émission des hypothèses, conception des expériences, analyses de résultats et révision de l'article. Acquisition des fonds de recherche et/ou responsables de l'intégrité du travail.

La contribution des coauteurs dont le pourcentage n'est pas spécifié est de 10%.

Résumé

Le chitosane est un polysaccharide naturel qui fait l'objet d'une grande attention pour ses applications en thérapie génique. Le mécanisme moléculaire et la réponse immunitaire aux nanoparticules de chitosane sont des caractéristiques essentielles de leur biocompatibilité. Nous avons étudié la capacité des nanoparticules de diéthylaminoéthyl-chitosane-polyéthylène glycol-acide folique (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂)/petits ARN interférents (siRNA)-SSB sans endotoxines à activer les voies de signalisation du récepteur toll-like 4 (TLR-4) et les récepteurs de lectine de type C (CLR). Des analyses par la méthode de buvardage de Western ont démontré que les nanoparticules n'activent pas les voies de signalisation du complexe « IκB kinase » (IKK) / facteur nucléaire kappa B (NF-κB), la famille de « mitogen activated protein kinases » (MAPKs), la « protein kinase B » (AKT) et le « spleen tyrosine kinase » (SYK). L'absence d'activation a été observée malgré le contact entre les nanoparticules et les cellules démontré par la microscopie à épifluorescence et des essais de transfection *in vitro* chez les macrophages Raw 264.7. De plus, des études d'ELISA et de buvardage de Western n'ont pas montré la modulation de médiateurs pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), l'interleukine-1β (IL-1β), l'interleukine-6 (IL-6), la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) après 24 h de traitement. Nous pouvons conclure que dans les conditions expérimentales utilisées, les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB n'activent pas les voies de signalisation associées aux récepteurs TLR-4 et les récepteurs CLR dépendants de SYK, lors de leur processus de reconnaissance et d'internalisation chez les macrophages Raw 264.7. D'autres récepteurs susceptibles d'être impliqués dans la reconnaissance de nos nanoparticules seront étudiés dans nos futures études.

Investigation of signaling pathways-induced by pegylated diethylaminoethyl-chitosan nanoparticles: are TLR-4 and C-type lectin receptors involved?

Elsa Patricia Rondon ¹; Francis Vallières ¹; Houda Abir Benabdoun ¹; Marcio José Tiera ²; Mohamed Benderdour ¹; Julio Cesar Fernandes ¹

¹Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

²Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences. Department of Chemistry and Environmental Sciences, UNESP-São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil.

Correspondence should be addressed to Dr. Julio Cesar Fernandes. Orthopedics Research Laboratory, Research Center, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Université de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec H4J 1C5, Canada, local K-3045. Phone: (1) 514-338-2222 Ext. 2489. E-mail: julio.c.fernandes@umontreal.ca.

This work was done in Montréal (QC, Canada) and Sao Jose do Rio Preto (SP, Brazil).

Keywords— chitosan, nanoparticles, receptors.

Abstract

Chitosan is a natural polysaccharide receiving a great deal of attention in gene therapy applications. The molecular mechanisms and cell immune response to chitosan nanoparticles are an essential aspect of their biocompatibility. Herein, we studied the capacity of an endotoxin-free diethylaminoethyl-chitosan-polyethylene glycol-folic acid (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂) / small interfering RNA (siRNA)-SSB nanoparticle to activate toll-like receptor 4 (TLR-4) and C-type lectin receptors (CLRs) -associated signaling pathways. Kinetic studies and immunoblot analyses showed that nanoparticles did not activate the I κ B kinase (IKK) / nuclear factor kappa B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (AKT), or the spleen tyrosine kinase (SYK) signaling pathways. The absence of activation was observed despite the nanoparticle-cell surface contact showed by epifluorescence microscopy and *in vitro* transfection studies in Raw 264.7 macrophages. Furthermore, ELISA and Western blot studies did not show modulation of pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) after 24 hours of treatment. In conclusion, we found that in our experimental conditions, DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles do not activate signaling pathways associated to TLR-4 and SYK-dependent CLRs, during their recognition and internalization in Raw 264.7 macrophage cells. This may mean different receptors are involved.

1. Introduction

The biocompatibility of nanoparticles is essential to their use in the gene therapy framework. Their cytotoxicity and hemocompatibility properties are critical points in the go/no-go decision for their biomedical development. The molecular mechanisms and cell immune response to nanoparticles are a fundamental part of toxicological screening. The recognition of particles by cell surface receptors and the activation of signaling pathways, along with the release of pro-inflammatory mediators, are used to assess the toxicity of nanoformulations.

Chitosan (CH), a natural polysaccharide made of glucosamine units, has been the subject of numerous studies for its biocompatible potential. At the mechanistic level, data from the literature indicates that CH can be recognized by toll-like receptor 4 (TLR-4) [1-4], mannose receptor (MR) [5-7], and complement receptor 3 (CR3) [8, 9]. Dectin-1 [10], MR [11] and toll-like receptor 2 (TLR-2) have also been associated to chitin sensing and immunological responses [12]. Moreover, several studies have shown the capacity of CH derivatives to interfere with lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammatory responses [3, 13-18], suggesting a TLR-4 binding competition [3, 15, 16]. Nevertheless, few studies report the level of endotoxin contamination present in the CH-based nanoformulations, making the interpretation of results difficult, as endotoxin themselves activate the TLR-4 signaling pathways.

In terms of CH signaling, the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) pathway has been activated by β -chitosan sulfates (β -SCS) [19], chitooligosaccharides (COS) [20], and carboxymethylated chitosan (CMCS) [21]. Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) / extracellular signal-regulated kinases (ERK), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and Janus kinase (JAK) / signal transducer and activator of transcription (STAT) phosphorylation have been induced by CMCS [21], COS [20], and by hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HACC) [22], respectively. Finally, nuclear factor kappa B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1) pathways have been stimulated by low molecular weight chitosans (LMWCs) [23]. In Raw 264.7 macrophage cells, the activation of these signaling pathways by CH triggers the modulation of gene expression, leading to the production of pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis

factor-alpha (TNF- α), nitric oxide (NO) [4], interleukin-6 (IL-6) [22], interleukin-1 β (IL-1 β), prostaglandin E₂ (PGE₂) [19] and cyclooxygenase-2 (COX-2) [20, 23].

Main protein signaling pathways such as I κ B kinase (IKK) complex / NF- κ B and MAPKs are common components for TLR-4 and some C-type lectin receptors (CLRs). For the latter, spleen tyrosine kinase (SYK) plays a key role in the intracellular signal transduction of the CLR receptors Dectin-1, Dectin-2, Mincle [24, 25] and MR [26]. To our knowledge, there is no report in the literature concerning the capacity of CH derivatives to activate SYK. Nevertheless, CH and/or chitin has been associated to Dectin-1 [12] and MR [5-7, 27]. To date, the MR signaling pathway and the proteins involved are still unidentified [26]. Therefore, reports presenting MR as a potential receptor for CH rely on competition [6] or MR-blocking [5] studies. The former showed the decrease of CH derivative internalization in the presence of recognized MR ligands, while the latter presented a reduction in CH-induced TNF- α production in the presence of MR antibodies.

Given that proof of a direct binding between CH and any cell surface receptor is still lacking and reports rely on indirect evidence, we investigated the effects of an endotoxin free CH formulation on main signaling pathways. Our laboratory has synthesized a diethylaminoethyl-chitosan-polyethylene glycol-folic acid (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂) polymer, which fulfills the existing biological guideline criteria [28] with *in vitro* transfection efficiency [29] and *in vivo* therapeutic efficacy [30]. Herein, we studied whether TLR-4 and SYK-dependent CLRs receptor-associated signaling pathways are activated by DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/small interfering RNA (siRNA) - Sjögren syndrome antigen B (SSB) nanoparticles, in Raw 264.7 macrophage cells. The fact that our nanoformulation has no detectable levels of endotoxins will facilitate the interpretation of results and provide more evidence about the hypothetical interaction between CH and TLR-4, the receptor most often associated to this polysaccharide.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Endotoxin free deacetylated CH (ChitoClear[®], 43010, 270 kDa) was obtained from Primex ehf (Siglufjordur, Iceland). DMEM medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S) were purchased from WISENT Bioproduct Inc (Montréal, Qc, Canada). siRNA-SSB (GenBank accession number NM_009278) and siRNA-SSB-FITC with the oligonucleotide sequences: antisense 5'-uuacauaaagucuguuguTT-3'; and sense 5'-acaacagacuuuauguaaTT-3' (as mentioned by Abrams et al. [31] and Seitzer et al. [32]) with a 2'-O-Me-rA (rC, rG, rU) modification, were purchased from Alpha DNA S.E.N.C. (Montreal, Qc, Canada). Pyrogen-free consumables (Biosphere[®] plus certified) were purchased from Sarstedt (Montreal, Qc, Canada). Antibodies: p-IKK α /IKK β (2078), IKK α (2682), IKK β (2370), p-NF-kB p65 (3033), NF-kB p65 (8242), p-SAPK/JNK (9251), SAPK/JNK (9252), p-p38 (4511), p38 (8690), p-p44/42 MAPK (ERK ½) (4370), p44/42 MAPK (ERK ½) (4696), p-AKT (4060), AKT (9272), p-IRF-3 (79945), IRF-3 (4302), SYK (13198), SOCS3 (52113) and COX-2 (12282) were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Anti-TLR4 (sc-293072) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Anti-iNOS (MAB9502) was purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-p-SYK (MA5-14918), anti-GAPDH (MA5-15738), Silencer[™] Select GAPDH Positive Control siRNA (4390850), Silencer[™] Select Negative Control No. 1 siRNA (4390844), Alexa Fluor[™] Plus 647 Phalloidin (A30107), ProLong[™] Glass Antifade Mountant (P36981) containing (Hoechst 33342), and ELISA kits for TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). JetPrime[®] transfection reagent (114-07) was purchased from Polyplus-transfection SA (New York, NY, USA). Beta-glucan peptide (BGP) (tlrl-bgp) and LPS (tlrl-pekllps) were purchased from Invivogen (San Diego, CA, USA).

Other chemicals or solutions, if not otherwise stated, were purchased from Sigma Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Raw 264.7 macrophages and HeLa cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

2.2 Synthesis of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ polymer

The synthesis and characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ polymer was reported in our previous work [28]. The lyophilized product was divided and stored into separate sealed tubes at room temperature. This preparation tested negative for endotoxin contamination with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay [28].

2.3 Nanoparticle preparation

DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ polymer was dissolved with a 0.1M HCl solution overnight. Then, it was heated at 50°C for 30 min, resuspended with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) to the working concentration and passed through a 0.45 µm filter. To prepare the nanoparticles, siRNA-SSB, siRNA-SSB-FITC or siRNA-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were suspended in DPBS before adding the modified-chitosan DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ solution. The mix was vortexed 1 min at medium speed. In the present study, the main tested concentration is a theoretical plasma concentration (TPC) calculated in our previous work [28]. See Table 1 for nanoparticle concentrations.

2.4 Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles

Nanoparticle size and zeta potential, at amino groups/phosphate groups (N/P) ratio of 15:1, were measured by dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), using 1 mL of nanoparticles containing 6.8 µg (0.02 mM) of siRNA. The DLS was setup at 37°C, with an equilibration time of 120 s and automatic readings (3 measurements). For electrophoresis studies, 10 µL of nanoparticles with 0.5 µg siRNA (SSB, SSB-FITC or GAPDH) were loaded in a 4% agarose gel and migration was performed at 100 v for 45 min.

2.5 Cell culture

Murine Raw 264.7 macrophage and HeLa cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 1% P/S and 10% heat inactivated FBS, inside a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ and used until passage 16.

2.6 Transfection in vitro

Raw 264.7 macrophage or HeLa cells were seeded in a 24-well plate (DMEM 10% FBS) at 1.5×10^5 cells/well or 7×10^4 cells/well, respectively, for 24 h at 37°C. The next day, medium was replaced by 425 μL /well of DMEM (without P/S and FBS) and 50 μL /well of samples (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-GAPDH (at TPC and 5x), DPBS or free siRNA). Four hours later, 25 μL /well of FBS was added to reach 5% v/v and the incubation was continued for an additional 44 h. siRNA-scramble was used as the negative control. The transfection positive control JetPrime reagent was complexed with siRNA-GAPDH or scramble (50nM siRNA/well), according to the manufacturer's instructions.

2.7 Epifluorescence imaging of labeled nanoparticles

Raw 264.7 macrophages were plated in 8-well chamber slides at 5×10^4 cells/well for 24 h at 37°C. The next day, cells were transfected with labeled nanoparticles (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB-FITC) at TPC for 4, 24 and 48 h. Then, they were washed 3 times with DPBS to remove free nanoparticles and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at 37°C. After several washes with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), cells were permeabilized with 0.1% triton X-100 for 15 min at room temperature (RT), and actin was stained with phalloidin Alexa Fluor™ 647 dye (0.5 units for 30 min). After another series of washes, the antifade solution was added and nuclei were counterstained with Hoechst. Slides were dried at RT for 24 h. Finally, cells were analyzed to determine nanoparticle internalization under an epifluorescence microscope (Zeiss AxioImager M2), using the following parameters: FITC ex 490 em 525 nm (nanoparticles), Hoechst ex 360 em 460 nm (nuclei), AF647 ex 650 em 668 nm (actin) with a total magnification of 630x.

2.8 Effect of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles on signaling pathways.

Raw 264.7 macrophage cells were plated in a 24-well plate at 4×10^5 cells/well (DMEM 10% FBS) for 24 h at 37°C. Then, medium was replaced with 450 μL of fresh medium (without FBS) containing 50 μL of samples (at TPC), and cells were treated for increasing incubation times (5 to 240 min) or during 30 min for experiments with nanoparticles at TPC, 5x and 10x. DPBS was the

negative control. Treatments with LPS (1 µg/mL for 30 min) and BGP (100 µg/mL for 5 min) were used as the positive controls for activation of TLR-4 and Dectin-1, respectively.

In another set of experiments, Raw 264.7 macrophages were plated at 3×10^5 cells/well for 24 h at 37°C. The next day, cells were treated with nanoparticles (at TPC) resuspended in complete medium for 24 h. After exposure, supernatants were collected, centrifuged at 400 x g at 4°C for 10 min and stored at -20°C. Cells were washed with DPBS and lysed for western blot procedure.

2.9 Western blot analysis

After different treatments, cells were lysed with 300 µL/well of laemmli buffer and heated at 95°C for 5 min. Samples (25 µL/well) were processed onto 7.5 or 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) or 5% skim milk for 1 h at RT, washed several times with TBST 1x (0.15% Tween 20), and finally incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1:1000) diluted in TBST containing 5% BSA or 5% skim milk, according to the manufacturer's instructions. After serial washes, membranes were incubated with the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at RT and the immunoreactive bands were visualized using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) on HyBlot CL films (Harvard Apparatus Canada, Saint-Laurent, QC, Canada).

2.10 Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines

Supernatants from 24 h treatments were analyzed by ELISA for detection of Murine TNF-α, IL-1β, IL-6 and interleukin-10 (IL-10), according to the manufacturer's instructions.

2.11 Statistical analysis

Representative blots or images of three independent experiments are shown. Data was analyzed with GraphPad Prism software version 6 and is expressed as mean ± standard error (SEM). Statistical significance (***) $p < 0.001$ was determined by One-way Anova using Dunnett's test for paired data.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles

Gel electrophoresis showed the complexation of siRNA-SSB, siRNA-SSB-FITC or siRNA-GAPDH by the modified-chitosan DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ at N/P ratio of 15:1, as confirmed by the absence of siRNA release during gel migration (Fig. 1A). This confirms our previous results where N/P ratio 15:1 was chosen to form the nanoparticles [28]. For their part, DLS measurements showed nanoparticles with sizes of 323 ± 0.6 nm for SSB, 306 ± 1.7 nm for SSB-FITC and 259 ± 8.7 nm for GAPDH, with a polydispersity index (PDI) of 0.23 ± 0.00 , 0.25 ± 0.01 and 0.22 ± 0.00 , respectively (Fig. 1B). Particle charge, measured by zeta potential, was $+5.3 \pm 0.2$ mV, $+6.1 \pm 0.5$ mV and $+6.4 \pm 0.3$ mV, respectively (Fig. 1C).

In our previous work, we synthesized endotoxin-free DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles as demonstrated by the LAL assay [28]. Herein, we studied whether these nanoparticles activate the TLR-4-related signaling pathways. As TLR-4 is the receptor of the powerful contaminant LPS, the absence of endotoxin contamination in our formulation was imperative to avoid misleading results leading to erroneous conclusions.

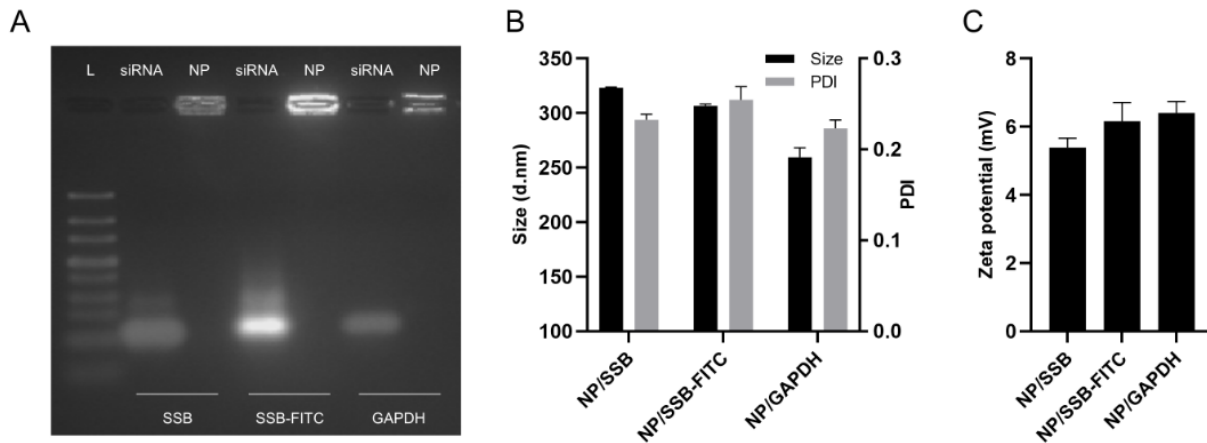


Figure 1. Characterization of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticles at 37°C. (A) Electrophoresis of free siRNA or nanoparticles at N/P ratio of 15:1, using 0.5 µg siRNA/well. Lane 1: ladder; lane 2, 4 and 6 free siRNA-SSB, siRNA-SSB-FITC or siRNA-GAPDH, respectively; lane: 3, 5 and 7 DEAE₁₂-

CH-PEG-FA₂ complexing siRNA-SSB, siRNA-SSB-FITC or siRNA-GAPDH, respectively. (B) Size and (C) zeta potential of nanoparticles at N/P of 15:1, using 6.8 µg siRNA/optical cell. Representative gels and results from three independent experiments are shown.

3.2 DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA nanoparticle internalization in Raw 264.7 macrophage and HeLa cells

Raw 264.7 macrophage cells were chosen as the biological model, as they express TLR-4 [4, 33], dectin-1 [34, 35] and MR [6, 36] as part of their pattern recognition receptors (PRRs) [25], and are widely used for CH signaling pathway studies [19, 20, 22, 23]. HeLa cell line was employed as a reference to compare the transfection efficiency of our nanoparticles in these cells and Raw 264.7 macrophages, as HeLa has been routinely used for this purpose in our previous works [29].

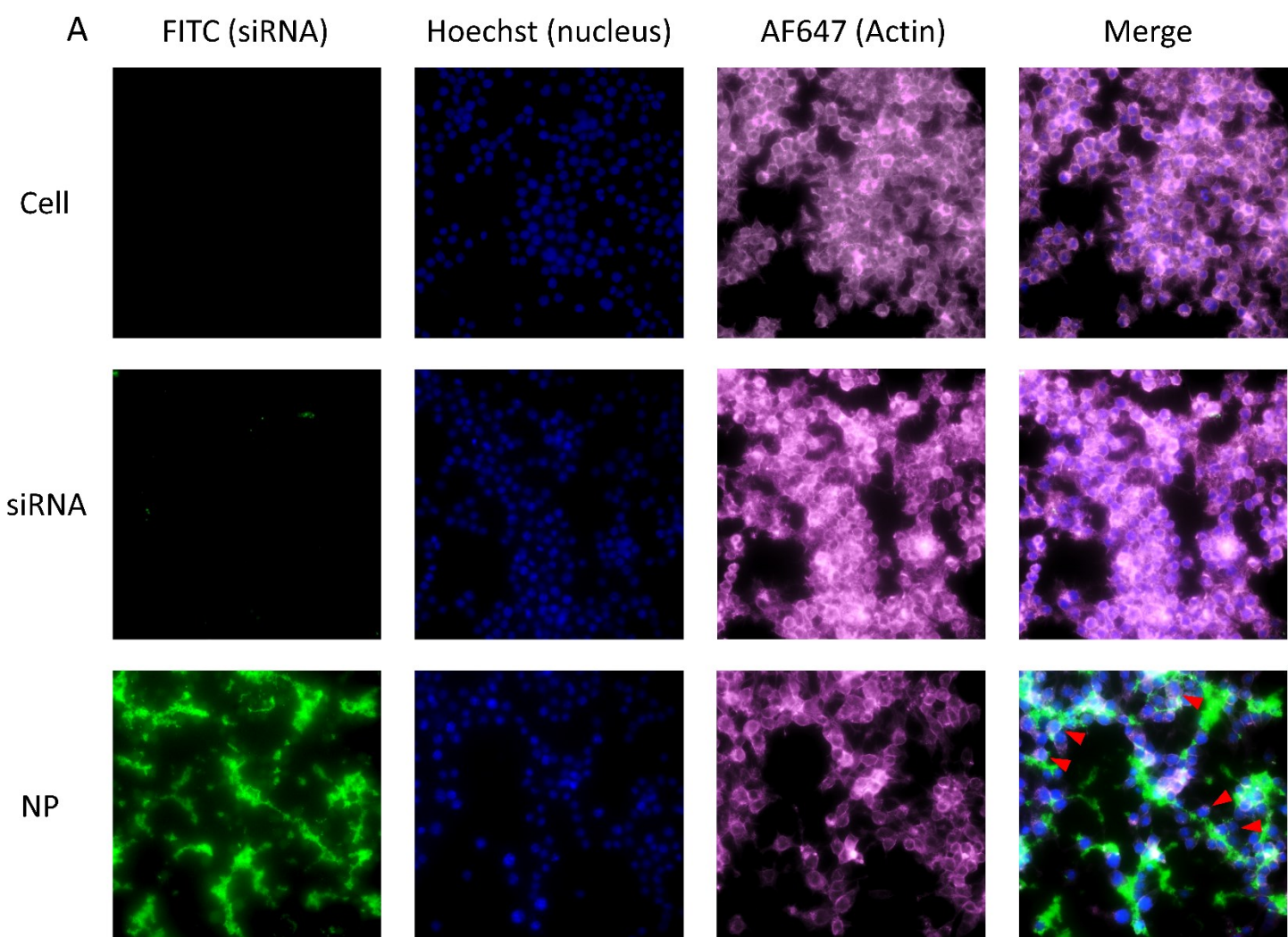
Our earlier study has shown the *in vitro* safety of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles for a theoretical plasma concentration (TPC) [28]. The latter is described in Table 1. Here, we studied the molecular mechanism of action of nanoparticles and their biologically induced effects at the aforementioned concentration. To start, the localization of these nanoparticles in Raw 264.7 macrophage cells was analyzed by epifluorescence microscopy. Fig. 2A and B show that DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles labeled with FITC (at TPC) are located around the cell surface, while free siRNA doesn't show any fluorescence. In Fig. 2B bright green particles representing nanoparticles outside the cells and light green particles which seem to be internalized nanoparticles can be observed. The pale color of FITC labeled nanoparticles and their position compared to the nucleus and actin illustrate their cellular uptake at 4, 24 and 48 h for TPC. The DEAE substitution in the CH chain added tertiary amine groups, which are partially protonated at physiological conditions [37]. This modification allowed us to synthesize nanoparticles at pH ~7.4, with positive zeta potentials. Therefore, electrostatic interactions between the nanoparticles and the negatively charged cell membranes could promote their internalization. This hypothesis is supported by Yang et al [38], who found different chitosan-modified PLGA nanoparticle uptake levels depending on medium pH and therefore, variable nanoparticle zeta potentials.

To further confirm the internalization of our nanoparticles, Raw 264.7 macrophage and HeLa cells were transfected with DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-GAPDH for a period of 48 h. Western blot analysis showed the silencing of the housekeeping gene GAPDH, represented by the reduction in band intensity compared to siRNA-scramble, for a concentration of 5x (Fig. 3A and B). Densitometric analysis represented by arbitrary densitometric units (ADU) was 0.85 ADU and 1.13 ADU for nanoparticles/GAPDH and nanoparticles/scramble, respectively, compared to 1.25 ADU for DPBS in Raw 264.7 cells. For HeLa, it was 0.72 ADU and 1.11 ADU for nanoparticles/GAPDH and nanoparticles/scramble, respectively, versus 1.19 ADU for DPBS. These results confirm the internalization and transfection efficiency of our particles. Unfortunately, at TPC it was not possible to confirm GAPDH gene silencing with this technique (data not shown). Nevertheless, microscopic images display individual nanoparticles inside the cells at TPC, as discussed previously. (Fig. 2B). Moreover, preliminary transfection studies using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed a reduction of SSB mRNA expression levels at TPC and at lower nanoparticle concentrations (data not shown). For the next experiments, Raw 264.7 macrophages were chosen, as these cells are the commonly used biological model for CH signaling pathways.

Table 1 Nanoparticle Concentrations

Concentrations	10x	5x	TPC
siRNA-SSB or siRNA-GAPDH (µg/mL)	15.2	7.60	1.52
Modified Chitosan (µg/mL)	162.1	81.0	16.2

TPC: theoretical plasma concentration.



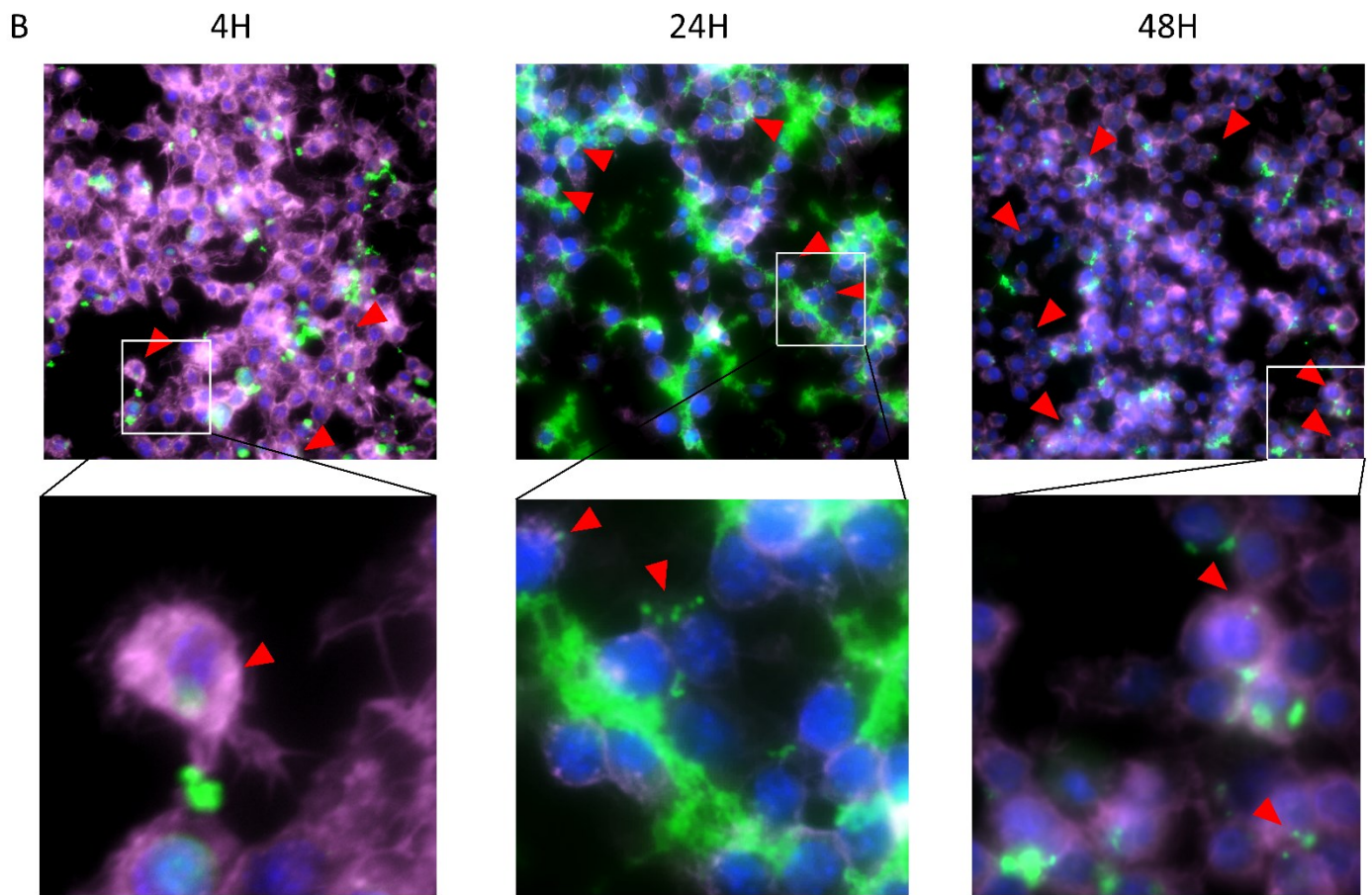


Figure 2. Epifluorescence microscopy. (A) Microscopic images from cells treated 24 h with labeled DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB-FITC nanoparticles at TPC. Green: labeled-FITC nanoparticles; bleu: nuclei staining with Hoechst; purple: AF647 stained actin. Orange arrows show the internalized nanoparticles. (B) Merged images from 4, 24 and 48 h treatment. The enlarged images illustrate internalized nanoparticles at each time. A total 630x magnification was used. Images represent one of three independent experiments with similar results.

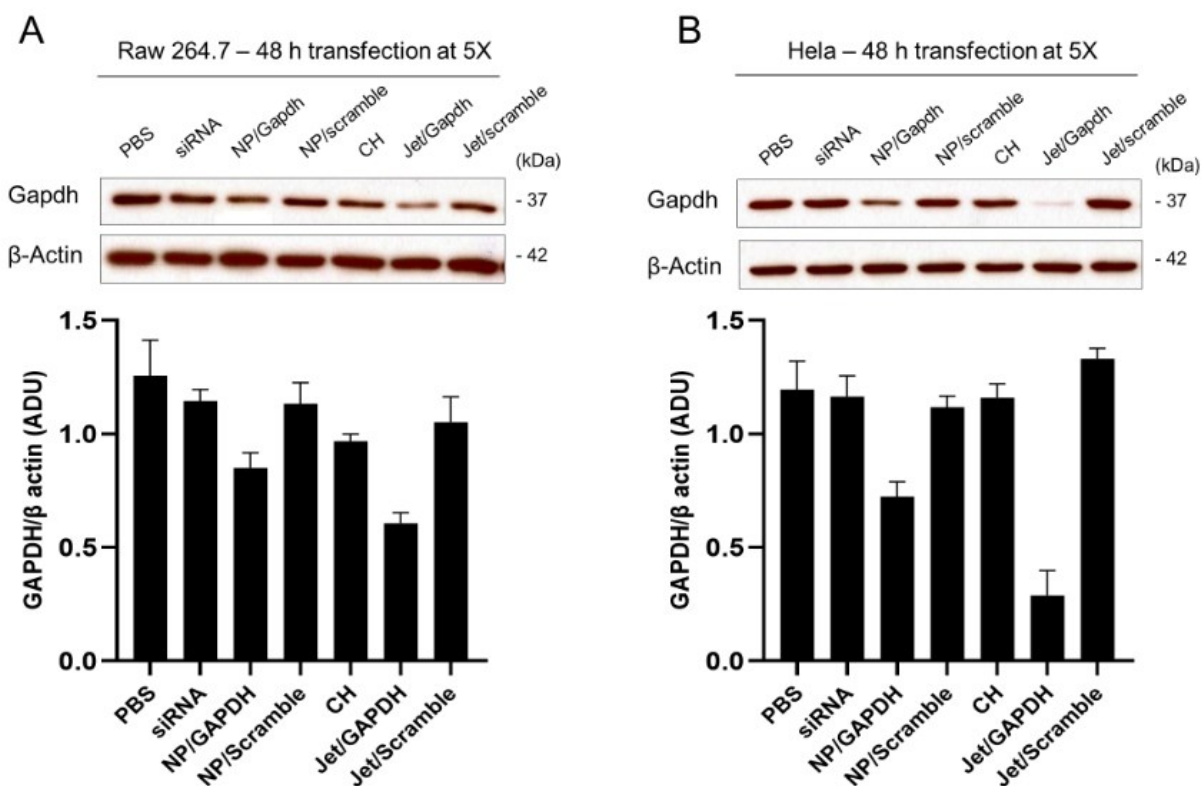


Figure 3. *In vitro* transfection on Raw 264.7 macrophage and HeLa cells. (A) and (B) represent immunoblot analysis of protein extracts from Raw 264.7 and HeLa cells, respectively, transfected with DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-GAPDH nanoparticles at 5x for 48 h. Bottom images represent densitometric measurements of band intensity. siRNA-scramble and JetPrime/GAPDH are the negative and positive controls. Data are normalized by β -actin signal. ADU: arbitrary densitometric units. Blots represent one of three independent experiments with similar results.

3.3 Time-dependent effects of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles on signaling pathways associated with TLR-4

Kinetic studies on Raw 264.7 macrophage cells were performed with samples at TPC. Cells were incubated for 5 to 240 min and 24 h in the presence of DPBS, LPS, or nanoparticles. Fig. 4A shows that nanoparticles did not activate IKK α /IKK β or the transcription factor p65/NF- κ B, which are key components of the IKK/NF- κ B pathway associated with TLR-4. Similarly, neither the MAPKs c-Jun

N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK (p38), nor extracellular signal-regulated kinases (ERK) were phosphorylated, compared to the negative control DPBS (Fig. 4B). Finally, protein kinase B (AKT) was not activated by nanoparticles (Fig. 4C).

Our findings go against those reported in the literature, which show that low molecular weight chitosans (LMWCs) [23], chitooligosaccharides (COS) [20], β -chitosan sulfates (β -SCS) [19] and/or hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HACC) [22] activate the IKK/NF- κ B, MAPK and/or AKT pathways in the same cell line. Each of these modified-CH tested negative or low (less than 0.5 EU/mL) to endotoxin contamination, hence discarding an LPS-induced response. Although, the timeframe was similar to our experimental assays, the use of free modified-CH derivatives versus nanoparticles was an important difference. This may be part of the explanation for the differences observed in signaling activation, as free polymers and nanoparticles are not governed by the same physicochemical properties. Studies have suggested that the physicochemical properties of polymers, such as degree of deacetylation (DDA) and molecular weight (MW), may influence their interactions with cells [39] and surface receptors [16], respectively. In the case of nanoparticles, not only MW [40, 41] and DDA [42], but also size and charge [43, 44] have been shown to influence nanoparticle uptake and transfection. Therefore, if we compare common properties, such as DDA and MW, of these free CH derivatives versus our uncomplexed modified-CH, it is possible to conclude that DDA is not a determining factor in these different activation profiles, as these derivatives had DDA values (86%) similar to ours (97%). On the contrary, MW could play a decisive role in signaling activation, as these CH derivatives had a low MW (LMWCs (3000 Da) [23], COS (1874 Da) [20], β -SCS (5030 Da) [19] and HACC (5003 Da) [22]) compared to our high MW CH (259 kDa). This hypothesis is supported by findings reported by Wu et al [45] who compared the immunostimulant activity of two low molecular weight chitosans (LMWCs) with 3 kDa and 50 kDa. They found that even though both derivatives produced immune responses, the 3 kDa showed better immunoreactivity compared to the 50 kDa, based on the production of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-6 and NO. In a subsequent study, the same 3 kDa and 50 kDa derivatives followed a similar trend, with the 3 kDa showing a significant difference in the nuclear translocation of p65 and higher expression levels of IKK β , C-Jun and C-Fos compared to 50 kDa [23]. In a different study, high MW CH showed

inhibitory effects on LPS-induced responses in macrophages compared to low MW CH which enhanced the production of pro-inflammatory mediators [16]. As previously described, MW influences the level of immune response and may play a role in signaling activation profiles, explaining the differences seen between free CH derivatives and our nanoparticles.

Finally, the moderately high concentrations tested for these preparations (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LMWCs [23]; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for COS [20] and β -SCS [19]; and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for HACC [22]) compared to our 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂ (equivalent concentration of modified-CH at TPC) may also explain the discrepancy in results. This hypothesis is supported by Wu et al [45] who showed that not only MW but also polymer concentration affects the levels of the pro-inflammatory mediator induction.

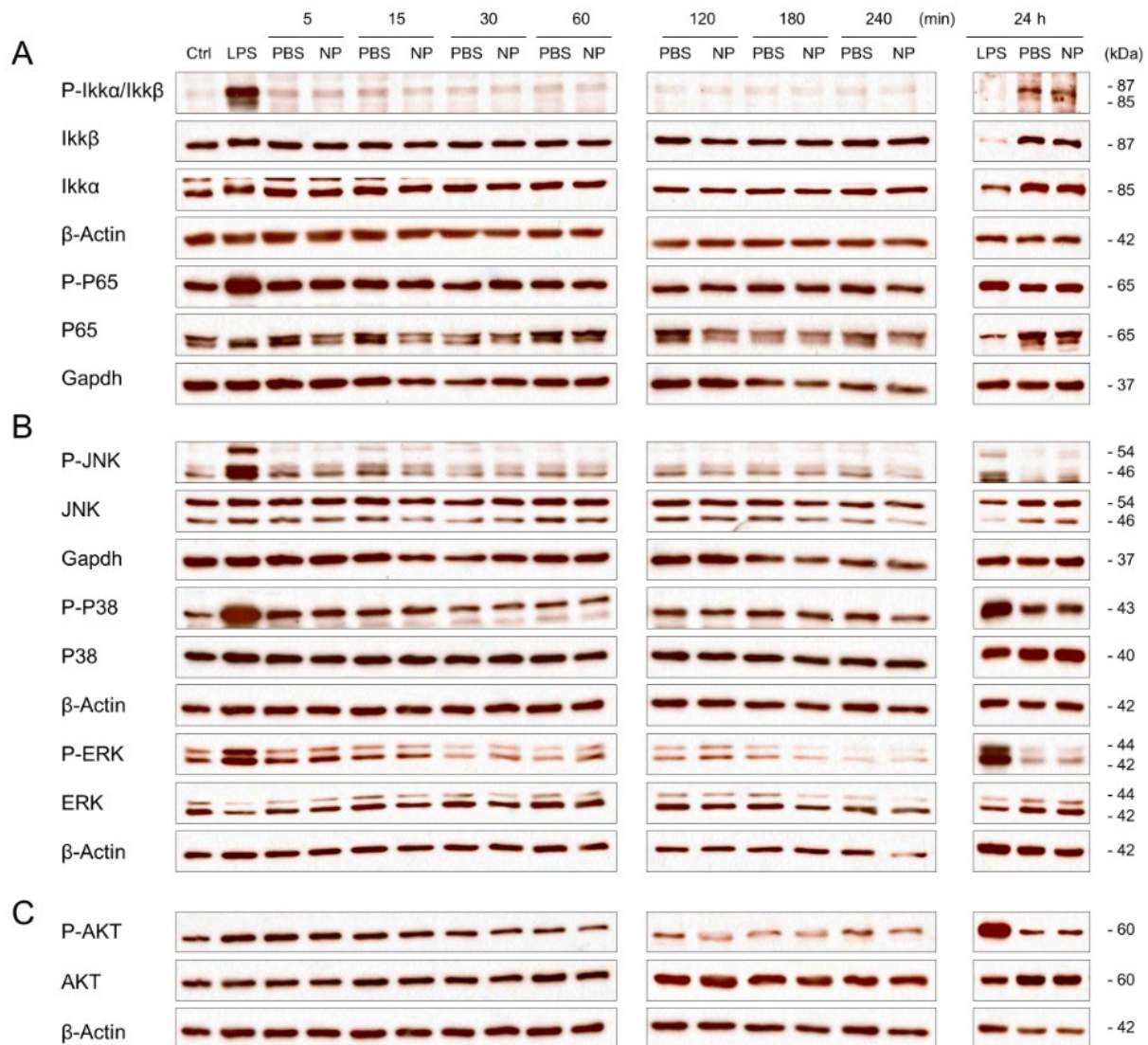


Figure 4. Effects of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles on TLR-4 associated signaling pathways. Raw 264.7 macrophage cells were incubated with samples at TPC for the indicated time. Then, the phosphorylated and non-phosphorylated proteins of (A) IKK/NF-κB, (B) MAPKs and (C) AKT signaling pathways associated to TLR-4 were detected by Western blotting. DPBS and LPS (1 μg/mL for 30 min) represent the negative and positive controls, respectively. Blots represent one of three independent experiments with similar results.

3.4 Dose-dependent effects of nanoparticles on IKK/NF- κ B, MAPK and AKT pathways

To assess whether TPC was not sufficient to activate the different signaling pathways, Raw 264.7 were treated for 30 min with 5x and 10x nanoparticle concentrations, equivalent to 81.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 162.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂, respectively. These concentrations are in the same range as those found in the literature (40-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [19, 20, 22, 23]. As verified by the immunoblot technique, none of the IKK/NF- κ B (Fig. 5A), MAPKs (Fig. 5B) and AKT (Fig. 5C) signaling pathways were activated by the DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles.

The incubation time was chosen based on data in the literature, indicating that from 30 min and over CH derivatives activate IKKs, MAPKs and/or AKT signaling pathways [20, 22]. Moreover, preliminary results showed that LPS (positive control) had higher protein activation at this period (data not shown). Our results show that the increased concentrations did not have any effect on pathway activation. This leads us to suggest that either a longer time-course is necessary to verify signaling pathway activation, or that MW may have a decisive effect in pathway activation. Although, the first hypothesis is plausible, evidence already supports the latter. As mentioned above, CH immunostimulatory responses are not only concentration [23, 45] but also MW [16, 23, 45] dependent.

Finally, as IKK/NF- κ B, MAPKs and AKT pathways are associated to TLR-4 signaling, among other receptors, the expression of TLR-4 was verified after incubation of Raw 264.7 cells with samples for 24 h. Fig. 5D shows that there was no difference in TLR-4 expression compared to DPBS. These results are in agreement with the absence of activation of the TLR-4 associated pathways. On the other hand, among the abovementioned CH derivatives that activated signaling pathways, only β -SCS [19] and LMWCs [23] were linked to TLR-4, as the potential recognition receptor. While there was no evidence for LMWCs [23], the expression of TLR-4 in β -SCS-treated cells increased in a dose-dependent manner [19]. Other studies suggesting TLR-4 as a CH receptor can be divided in two categories. The first reports several methods to study this association, such as dendritic cells derived from TLR-4 deficient mice [1], silencing of TLR-4 expression [2], and blocking of TLR-4 with antibodies [4] or pharmacological inhibitors (TAK-242) [3]. The second reports the capacity of CH derivatives to reduce LPS-induced inflammatory effects in Raw 264.7 macrophages based

on a receptor interference theory [15, 16]. However, a more in-depth analysis shows that even though the publications from the first group used standard techniques to validate receptor-ligand associations, none reported a direct interaction between CH and TLR-4. Moreover, the level of endotoxin contamination in CH preparations was omitted, leaving an important gap in data interpretation, as endotoxins can activate TLR-4 signaling. Regarding the second category, a CH neutralization effect could explain the inhibitory capacity observed, as it has already been suggested that CH and LPS can form a stable complex with decreased inflammatory response compared to free LPS [46, 47]. The reduced toxicity was associated with the interaction between CH and LPS charge and structure that could influence the LPS binding capacity to TLR-4 [46]. In conclusion, even though the interaction between CH and TLR-4 has yet to be proven, TLR-4 remains the more cited receptor for CH and further research is necessary to better understand CH mechanisms of action.

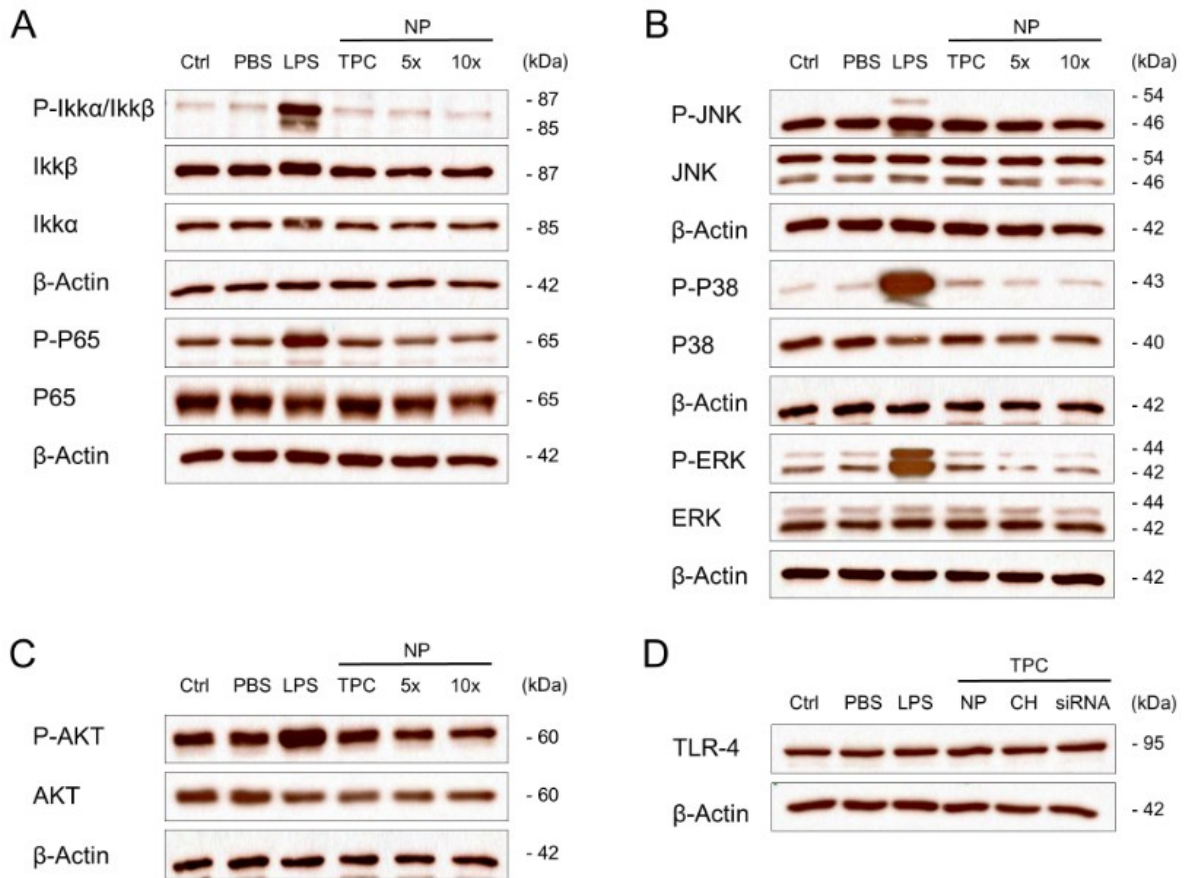


Figure 5. Dose-dependent effects of nanoparticles on TLR-4 signaling pathways. Effects of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticle treatment on Raw 264.7 macrophages at TPC, 5x and 10x were evaluated by Western blotting. Activation of (A) IKK/NF-κB, (B) MAPKs and (C) AKT signaling pathways was analyzed after 30 min exposition. DPBS and LPS (1 μg/mL) represent the negative and positive controls, respectively. (D) TLR-4 protein expression analyzed after 24 h of treatment. Blots represent one of three independent experiments with similar results.

3.5 Determination of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticle effect on signaling pathways-related to Dectin-1 and MR

SYK is a key component in the intracellular signal transduction of some CLRs such as Dectin-1, Dectin-2, Mincle [24, 25] and MR [26]. Given that CH and/or chitin have been linked to Dectin-1

and MR, we investigated the capacity of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles to activate SYK. Fig. 6A shows that our nanoparticles did not activate SYK at any time point (0.5 to 30 min). This allows us to exclude SYK-dependent receptors, such as Dectin-1 and MR, as potential receptors involved in our nanoparticle recognition by Raw 264.7 cells. Considering the negative results for IKK/NF- κ B and MAPK pathways, the non-phosphorylation of SYK was expected, as these main pathways are part of its downstream signaling. Regarding MR, to this day, its downstream signaling pathways are still not clearly defined. Nevertheless, SYK has been reported to be phosphorylated upon MR activation and microscopic observations showed their co-localization [26]. In view of this, we speculate that the role of MR in our particle's recognition is unlikely.

To further clarify the potential effects of DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles on Raw 264.7 macrophage cells, toll-like receptor 3 (TLR-3), an endosomal receptor for double-stranded RNA (dsRNA) was also studied through the TLR-3/ Interferon regulatory factor 3 (IRF-3) pathway. Fig. 6B and C show that IRF-3 was not activated at any time point or at any siRNA tested-concentration (1.52 to 15.2 μ g/mL of equivalent siRNA-SSB complexed by DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂). We suppose that TLR-3 did not recognize the siRNA-SSB complexed by CH, probably due to the protective effect of CH and because of the 2'-O methylation on the SSB sequence which is meant to avoid immune recognition by this receptor [48].

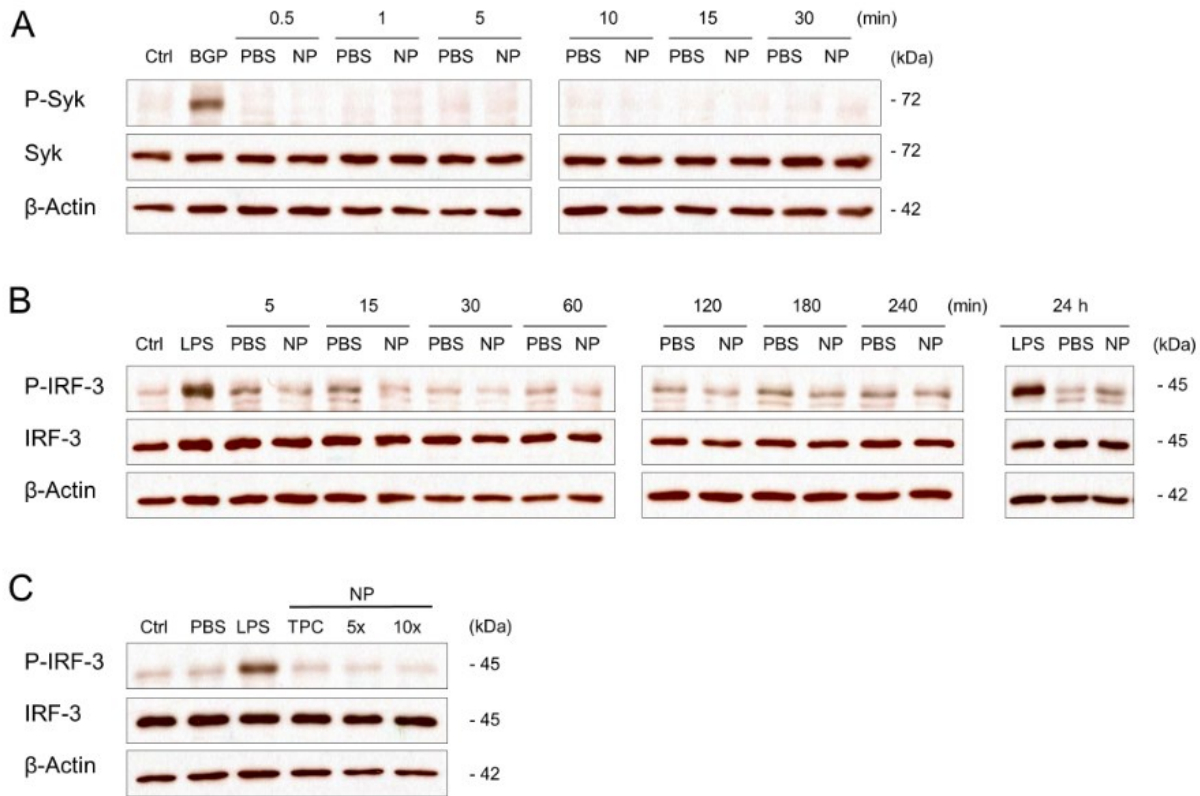


Figure 6. Effects of nanoparticles on SYK-dependent CLRs and TLR-3 signaling. Raw 264.7 cells were treated with samples at the indicated concentration and time points. Then, the total, phosphorylated and non-phosphorylated levels of (A) SYK, (B) and (C) IRF-3 proteins were detected on cell extracts by Western blotting. DPBS represents the negative control. BGP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 5 min) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min) represent the positive controls. Blots represent one of three independent experiments with similar results.

3.6 Immune response of Raw 264.7 macrophages to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles.

To further examine the effects of nanoparticles on signaling pathways, pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS were analyzed by ELISA or Western blotting, after 24 h of treatment. As illustrated in Fig. 7, our nanoparticles have no statistically significant impact on the production of TNF- α (Fig. 7A), IL-1 β , IL-6 (Fig. 7B), COX-2 and iNOS (Fig. 7C), as

opposed to LPS. These results confirm the absence of IKK/NF- κ B, MAPKs and AKT signaling pathway activation observed in Fig. 4 and 5, as the activation of these pathways is directly associated with the production of these pro-inflammatory mediators.

TNF- α and IL-6 secretion results are in agreement with our previous work on peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) assays [28]. In the same way, iNOS results correlate with the nitric oxide (NO) release measurements, and no significant difference was detected between samples and DPBS within the same cell line [28]. Conversely, at TPC, IL-1 β production in PBMC was significantly different from DPBS (** $p < 0.01$) [28], as opposed to the outcomes with Raw 264.7 macrophages where it was not detected. This suggests that the biological response is cell type-dependent.

Unsurprisingly, our TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS outcomes do not agree with the results from the IKK/NF- κ B, MAPK and/or AKT pathways activated by LMWCs [23], COS [20], β -SCS [19] and HACC [22]. All of these CH derivatives stimulated the production or expression of some of these mediators in a concentration or time-dependent manner.

Finally, to verify if the secretion of pro-inflammatory mediators was offset by IL-10 and SOCS3, the production or activation of these regulators of inflammatory responses were analyzed. Fig. 7D and E show that there was no significant difference in the secretion or expression of these inhibitory molecules compared to DPBS. Altogether, these outcomes make it possible to suggest that Raw 264.7 macrophages did not present an immunostimulatory response after contact with DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles at TPC after 24 h of treatment.

Other potential CH and chitin receptors have been documented in the literature. For instance, TLR-2 [11, 49], CD-14 [8, 50], CR-3 [8] and Galectin-3 [51] expressed in macrophages. Natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) expressed in natural killer cells (NK) and T cells [51]. Fibrinogen C domain containing 1 (FIBCD1) [52] and regenerating islet-derived protein 3 gamma (RegIII γ) on intestinal epithelial cells [51]. As well as, $\alpha_v\beta_3$ integrins on Caco-2 [53] and cancer cells [54]. The fact that CH comprises a wide variety of derivatives with distinct physicochemical properties may play a role in its recognition by different kinds of receptors. Further research is necessary to

determine the mechanism of action of CH and its biologically-associated response. Fig. 8 presents a summary of the studied signaling pathways and the resulting data.

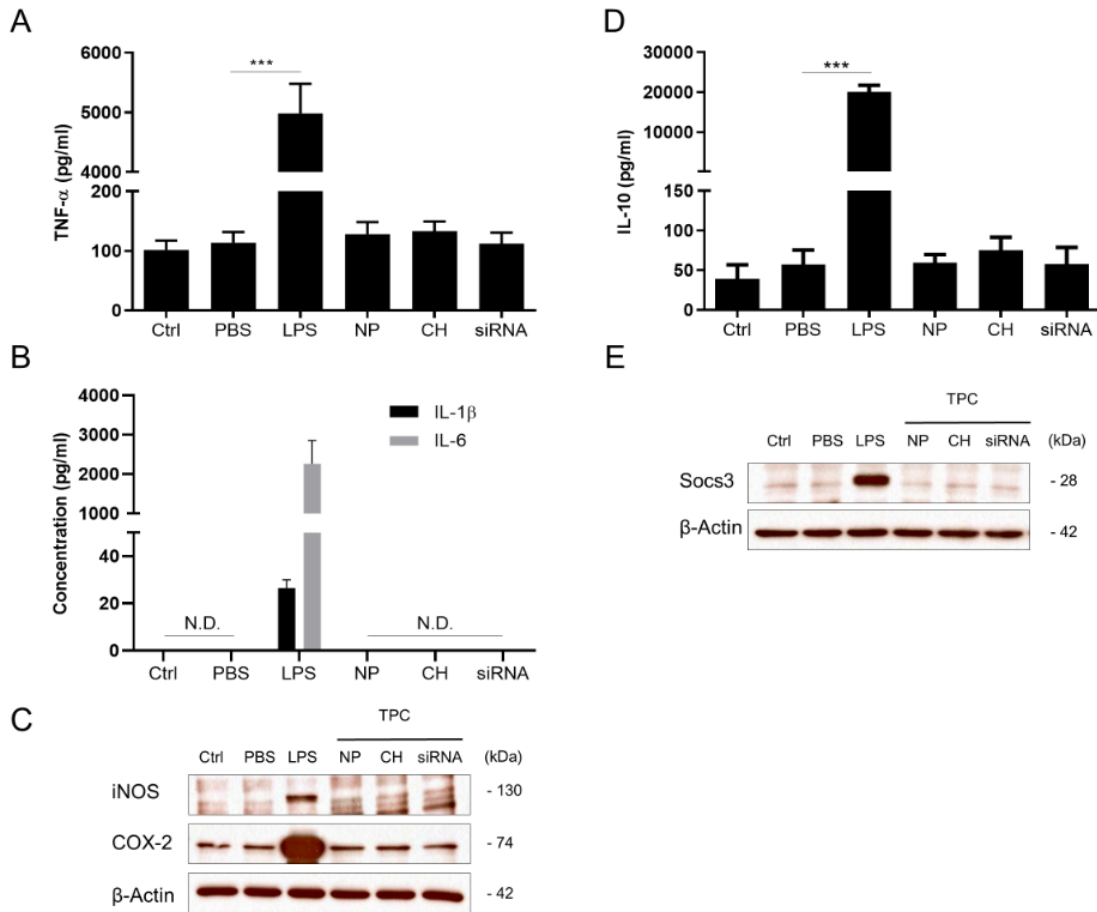


Figure 7. Inflammatory and inhibitory mediator production by Raw 264.7 macrophage cells in response to DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles. (A) TNF- α , (B) IL-1 β and IL-6 secretion were detected in the culture supernatant by ELISA, after 24 h of treatment. LPS (1 μ g/mL) and DPBS were used as the positive and negative controls, respectively. *** $p < 0.001$ is significantly different from DPBS. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments and were analyzed by One-way ANOVA (post hoc Dunnett's test). (C) iNOS and COX-2 protein expression evaluated by Western blotting. (D) IL-10 secretion detected by Elisa and (E) SOCS3 protein expression analyzed by Western blotting after 24 h of treatment. Blots are representative of three independent experiments.

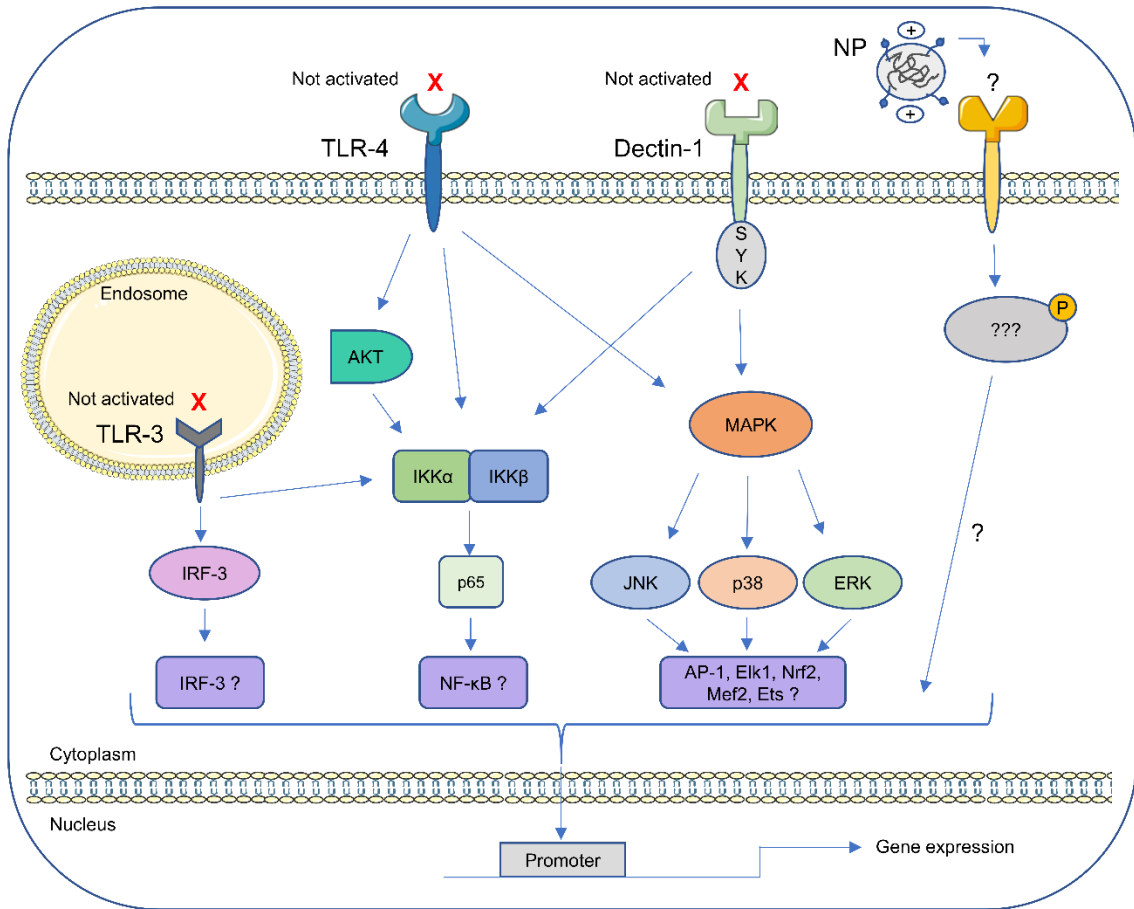


Figure 8. Diagram representing the negative results from Raw 264.7 cells stimulated with DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles.

4. Conclusion

This mechanistic study established that in our experimental conditions, DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA-SSB nanoparticles do not activate the IKK/NF- κ B, MAPKs, AKT and SYK signaling pathways, associated to TLR-4 and some CLRs receptors, in Raw 264.7 macrophage cells. Furthermore, these nanoparticles did not induce the release or expression of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS in this cell line. These findings suggest a very low level of pro-inflammatory response induced by our nanoparticles and suggest that other receptors are involved in CH recognition and uptake, encouraging further research in the molecular mechanisms of these nanovectors, especially the discovery of CH directly binding to cell surface receptors.

Author statement

Elsa Patricia Rondon: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis and Writing - Original Draft. Francis Vallières: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis and Writing - Review & Editing. Houda Abir Benabdoun: Methodology, Formal analysis and Writing - Review & Editing. Marcio José Tiera, Mohamed Benderdour and Julio Cesar Fernandes: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - Review & Editing, Project administration and Funding acquisition.

Funding

This work was supported by « Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec [grant number PSR-SIIRI-960] » and the « Chaire de Recherche en Orthopédie de l'Université de Montréal à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal ». Elsa Patricia Rondon, Houda Benabdoun and Francis Vallières held scholarships from the « Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS) ».

Conflict of interest

Authors report no conflicts of interest with this work.

Reference List

- [1] Villiers C, Chevallet M, Diemer H, Couderc R, Freitas H, Van Dorsselaer A, et al. From secretome analysis to immunology chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(6):1252-64.
- [2] Dang Y, Li S, Wang W, Wang S, Zou M, Guo Y, et al. The effects of chitosan oligosaccharide on the activation of murine spleen CD11c⁺ dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Carbohydr. Polym*. 2011;83(3):1075-81.
- [3] Shi L, Fang B, Yong Y, Li X, Gong D, Li J, et al. Chitosan oligosaccharide-mediated attenuation of LPS-induced inflammation in IPEC-J2 cells is related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Carbohydr. Polym*. 2019;219:269-79.
- [4] Zhang P, Liu W, Peng Y, Han B, Yang Y. Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):254-61.
- [5] Han Y, Zhao L, Yu Z, Feng J, Yu Q. Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(10):1533-42.
- [6] Feng J, Zhao L, Yu Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(2):414-20.
- [7] Mori T, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *J. Vet. Med. Sci*. 2005;67(1):51-6.
- [8] Wu GJ, Tsai GJ. Chitooligosaccharides in combination with interferon- γ increase nitric oxide production via nuclear factor- κ B activation in murine RAW264. 7 macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(2):250-8.
- [9] Wei X, Wang Y, Xiao J, Xia W. Separation of chitooligosaccharides and the potent effects on gene expression of cell surface receptor CR3. *Int J Biol Macromol*. 2009;45(4):432-6.

- [10] Dong B, Li D, Li R, Chen SC-A, Liu W, Liu W, et al. A chitin-like component on sclerotic cells of *Fonsecaea pedrosoi* inhibits Dectin-1-mediated murine Th17 development by masking β -glucans. *PLoS One*. 2014;9(12):e114113.
- [11] Shibata Y, Metzger WJ, Myrvik QN. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J Immunol*. 1997;159(5):2462-7.
- [12] Bueter CL, Specht CA, Levitz SM. Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog*. 2013;9(1):e1003080.
- [13] Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, Kim YH. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):954-9.
- [14] Ma P, Liu H-T, Wei P, Xu Q-S, Bai X-F, Du Y-G, et al. Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways. *Carbohydr. Polym*. 2011;84(4):1391-8.
- [15] Qiao Y, Ruan Y, Xiong C, Xu Q, Wei P, Ma P, et al. Chitosan oligosaccharides suppressant LPS binding to TLR4/MD-2 receptor complex. *Carbohydr. Polym*. 2010;82(2):405-11.
- [16] Chang S-H, Lin Y-Y, Wu G-J, Huang C-H, Tsai GJ. Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model. *Int J Biol Macromol*. 2019;131:167-75.
- [17] Tu J, Xu Y, Xu J, Ling Y, Cai Y. Chitosan nanoparticles reduce LPS-induced inflammatory reaction via inhibition of NF- κ B pathway in Caco-2 cells. *Int J Biol Macromol*. 2016.
- [18] Xu Q, Liu M, Liu Q, Wang W, Du Y, Yin H. The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly N-acetylated chitooligosaccharide. *Carbohydr. Polym*. 2017;174:1138-43.

- [19] Yang Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, et al. Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3 K/Akt signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018;108:1310-21.
- [20] Yang Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, et al. Immunostimulatory effects of Chitooligosaccharides on RAW 264.7 mouse macrophages via regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Mar Drugs.* 2019;17(1):36.
- [21] He B, Liu S-Q, Chen Q, Li H-H, Ding W-J, Deng M. Carboxymethylated chitosan stimulates proliferation of Schwann cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2011;667(1-3):195-201.
- [22] Yang Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, et al. Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan activates RAW 264.7 macrophages through the MAPK and JAK-STAT signaling pathways. *Carbohydr. Polym.* 2019;205:401-9.
- [23] Zheng B, Wen Z-S, Huang Y-J, Xia M-S, Xiang X-W, Qu Y-L. Molecular weight-dependent immunostimulative activity of low molecular weight chitosan via regulating NF- κ B and AP-1 signaling pathways in RAW264. 7 macrophages. *Mar Drugs.* 2016;14(9):169.
- [24] Hadebe S, Brombacher F, Brown GD. C-type lectin receptors in asthma. *Front Immunol.* 2018;9:733.
- [25] Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):465-79.
- [26] Rajaram MV, Arnett E, Azad AK, Guirado E, Ni B, Gerberick AD, et al. M. tuberculosis-initiated human mannose receptor signaling regulates macrophage recognition and vesicle trafficking by FcR γ -Chain, Grb2, and SHP-1. *Cell Rep.* 2017;21(1):126-40.
- [27] Farhadhosseiniabadi B, Zarebkohan A, Eftekhary M, Heiat M, Moghaddam MM, Gholipourmalekabadi M. Crosstalk between chitosan and cell signaling pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(14):2697-718.

- [28] Rondon EP, Benabdoun HA, Vallières F, Petrônio MS, Tiera MJ, Benderdour M, et al. Evidence Supporting the Safety of Pegylated Diethylaminoethyl-Chitosan Polymer as a Nanovector for Gene Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6183.
- [29] de Souza RHFV, Dalla Picola IP, Shi Q, Petrônio MS, Benderdour M, Fernandes JC, et al. Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. *Int J Biol Macromol*. 2018;119:186-97.
- [30] Shi Q, Rondon-Cavanzo E-P, Dalla Picola IP, Tiera MJ, Zhang X, Dai K, et al. In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:387.
- [31] Abrams MT, Koser ML, Seitzer J, Williams SC, DiPietro MA, Wang W, et al. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment. *Mol Ther*. 2010;18(1):171-80.
- [32] Seitzer J, Zhang H, Koser M, Pei Y, Abrams M. Effect of biological matrix and sample preparation on qPCR quantitation of siRNA drugs in animal tissues. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011;63(2):168-73.
- [33] Fang W, Bi D, Zheng R, Cai N, Xu H, Zhou R, et al. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264. 7 macrophages. *Sci Rep*. 2017;7(1):1663.
- [34] Esteban A, Popp MW, Vyas VK, Strijbis K, Ploegh HL, Fink GR. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(34):14270-5.
- [35] Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 2005;1(4):e42.
- [36] Jeong HS, Sook Na K, Hwang H, Oh PS, Hyun Kim D, Tae Lim S, et al. Effect of space length of mannose ligand on uptake of mannosylated liposome in RAW 264.7 cells: In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(12):4545-53.

- [37] Oliveira FdPP, Dalla Picola IP, Shi Q, Barbosa HFG, de Oliveira Tiera VA, Fernandes JC, et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine–chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. *J. Nanotechnol.* 2013;24(5):055101.
- [38] Yang R, Shim W-S, Cui F-D, Cheng G, Han X, Jin Q-R, et al. Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified PLGA nanoparticle and tumor. *Int J Pharm.* 2009;371(1-2):142-7.
- [39] Moran HB, Turley JL, Andersson M, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials.* 2018;184:1-9.
- [40] Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* 2006;27(27):4815-24.
- [41] Huang M, Fong C-W, Khor E, Lim L-Y. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J Control Release.* 2005;106(3):391-406.
- [42] Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials.* 2004;25(22):5293-301.
- [43] Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials.* 2010;31(32):8188-97.
- [44] He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(13):3657-66.
- [45] Wu N, Wen Z-S, Xiang X-W, Huang Y-N, Gao Y, Qu Y-L. Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264. 7 macrophages. *Mar Drugs.* 2015;13(10):6210-25.
- [46] Yermak IM, Davidova VN, Gorbach VI, Luk'yanov PA, Solov'eva TF, Ulmer AJ, et al. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide–chitosan complexes. *Biochimie.* 2006;88(1):23-30.

- [47] Davydova V, Yermak I, Gorbach V, Krasikova I, Solov'eva T. Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex. *Biochemistry c/c of biokhimiia*. 2000;65(9):1082-90.
- [48] Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological and hematological toxicities challenging clinical translation of nucleic acid-based therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(7):1023-48.
- [49] Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J Immunol*. 2009;182(6):3573-82.
- [50] Otterlei M, Vårum KM, Ryan L, Espevik T. Characterization of binding and TNF- α -inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14. *Vaccine*. 1994;12(9):825-32.
- [51] Dong L, Wichers HJ, Govers C. Beneficial health effects of chitin and chitosan, in: *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*. 2019:145-67.
- [52] Schlosser A, Thomsen T, Moeller JB, Nielsen O, Tornøe I, Mollenhauer J, et al. Characterization of FIBCD1 as an acetyl group-binding receptor that binds chitin. *J Immunol*. 2009;183(6):3800-9.
- [53] Hsu L-W, Ho Y-C, Chuang E-Y, Chen C-T, Juang J-H, Su F-Y, et al. Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan-integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials*. 2013;34(3):784-93.
- [54] Kim Y-M, Park S-C, Jang M-K. Targeted gene delivery of polyethyleneimine-grafted chitosan with RGD dendrimer peptide in $\alpha\beta3$ integrin-overexpressing tumor cells. *Carbohydr. Polym*. 2017;174:1059-68.

Chapitre 3 – Discussion

La thérapie génique se développe depuis quelques décennies grâce à son potentiel thérapeutique dans de multiples pathologies, comme le cancer et les maladies héréditaires. La découverte et la conception de la vectorisation avec des plateformes sécuritaires et performantes quant à l'efficacité de transfection et le ciblage, sont devenues d'intérêt pour plusieurs équipes de recherche au niveau mondial. Parmi la gamme de vecteurs non viraux, le chitosane se distingue de plusieurs vecteurs étant donné sa facilité de fabrication, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité. L'application de ce polysaccharide comme système de livraison de gènes attire l'attention par la présence des groupes amines et hydroxyles réactifs sur la chaîne principale. Ceux-ci permettent la modification de la structure chimique du polymère et l'attachement des ligands pour la fonctionnalisation des nanoparticules, ce qui améliore l'innocuité, le taux de transfection et le ciblage des cellules. Cependant, l'hémocompatibilité de ces nanoformulations doit être évaluée pour des applications en contact direct avec le sang et ses composants, afin de garantir la sécurité de son utilisation. Bien qu'il existe de plus en plus de lignes directrices qui encadrent les tests toxicologiques à réaliser sur les nanomatériaux, elles ne sont pas toujours mises en place, et ce manque de standardisation a pour conséquence l'existence d'une panoplie de conditions expérimentales différentes qui dépendent du modèle biologique, des concentrations testées, du type de test et des variables à quantifier, ce qui rend l'interprétation et la comparaison des données ardues.

Face à l'hétérogénéité des méthodes et les données contradictoires et/ou incomplètes sur des études d'hémocompatibilité et de stress oxydatif reliées aux nanoparticules de chitosane, nous avons abordé le sujet dans notre premier article avec l'exécution d'une batterie de tests *in vitro*, basé sur les lignes directrices de l'ISO, l'ASTM et le NCL. Notre objectif principal était d'évaluer la biocompatibilité de nos nanoparticules (DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA) dans un cadre réglementaire, avec l'inclusion de témoins d'interférence et d'informations essentielles comme le niveau de contamination aux endotoxines de notre vecteur. Les résultats de cette publication démontrent l'hémocompatibilité de nos nanoparticules estimée par le faible caractère hémolytique et d'agrégation plaquettaire et l'absence d'effet sur le système du complément et le temps de

coagulation. Ces résultats sont également soutenus par la non-stimulation du stress oxydatif et la faible production de certaines cytokines pro-inflammatoires. Dans le but de compléter le portrait *in vitro* d'innocuité de notre nanoformulation, nos recherches se sont dirigées vers l'évaluation du mécanisme moléculaire de nos nanoparticules. Notre deuxième article montre qu'aucune voie de signalisation reliée au TLR-4 et dectin-1 n'est activée, ce qui est supporté par la non-expression des médiateurs pro-inflammatoires. Ces faits confirment ainsi la sécurité de notre formulation et son potentiel comme système de livraison des gènes thérapeutiques dans le contexte de la thérapie génique.

3.1 L'importance de l'harmonisation

La revue de la littérature met en évidence la diversité des conditions utilisées par les équipes de recherche pour évaluer la toxicité des nanoformulations. Parmi les tests les plus hétérogènes se trouvent l'hémolyse et la cytotoxicité. Ainsi, il est possible d'observer la différence dans les concentrations de dérivés de chitosane utilisées (≤ 0.5 mg/mL [120], 1 mg/mL [121], 2 mg/mL [113]), les temps d'incubation (1h [115, 121], 2 h [113, 122], 3h [120], 4 h [116]), et les échantillons de sang utilisés (sang total humain [120], suspension d'érythrocytes [113, 121, 122], sang de lapin [116], sang murin [115]) pour le test d'hémolyse. Les protocoles de cytotoxicité montrent la même diversité de paramètres en utilisant une variété de lignées cellulaires ou de cellules primaires. Concernant ces essais, il existe une gamme de tests qui mesurent soit la viabilité cellulaire soit l'intégrité membranaire associée à la toxicité (MTT, MTS, LDH et le bleu de trypan, parmi d'autres). Dans ce contexte de conditions expérimentales diverses, une analyse comparative du niveau de toxicité d'une série de nanoformulations n'est pas envisageable, étant donné les conditions variables de départ.

L'absence d'harmonisation est non seulement évidente dans les protocoles expérimentaux, mais aussi dans la batterie de tests utilisés pour l'évaluation toxicologique. Ainsi, pour l'étude d'hémocompatibilité, le test d'activation du complément n'est pas toujours accompli, laissant un vide sur le profil de sécurité des nanoformulations. De surcroît, les seuils normatifs qui délimitent l'innocuité de la toxicité des nanomatériaux sont souvent ignorés et le degré de biocompatibilité des nanoformulations est déterminé selon des paramètres personnalisés. Également, l'utilisation

des témoins d'interférence fait défaut dans la plupart des études. Il est déjà connu que certaines nanoparticules lient sur leur surface les substances ou molécules à quantifier dans les essais, ou ont des propriétés optiques qui interfèrent avec la lecture d'absorbance des spectrophotomètres, ce qui conduit à de faux résultats positifs ou négatifs [55, 139]. La fixation de l'hémoglobine à la surface des nanoparticules est un exemple clair de faux résultat négatif, puisque cela provoque une diminution du niveau détecté de la protéine et donc affecte le pourcentage d'hémolyse calculé [117]. L'inclusion de témoins qui contiennent des nanoparticules, sans l'addition de cellules « cell free controls », dans les mêmes conditions expérimentales, témoignent de l'interférence possible des particules sur les essais [139]. Dans notre premier article nous avons inclus certains témoins d'interférence, par exemple l'utilisation de « cell free controls » dans la majorité des essais, afin de détecter l'interférence des nanoparticules avec les substrats ou les réactifs. Dans le test de cytokines également nous avons incubé les nanoparticules avec le surnageant du LPS (témoin positif), afin d'évaluer si les nanoparticules adsorbaient et donc diminuaient le niveau de cytokines de cet échantillon, nous renseignant ainsi sur de faux résultats négatifs. Finalement, dans le test d'hémolyse, l'observation de la taille et de la couleur des culots de cellules après la centrifugation a permis de vérifier si les nanoparticules adsorbaient l'hémoglobine. De cette manière, ces données supplémentaires ont été utilisées pour détecter de faux résultats positifs ou négatifs en plus de valider les résultats obtenus.

Enfin, un des aspects les plus déterminants dans l'estimation de la biocompatibilité des nanomatériaux est la quantification du niveau de contamination aux endotoxines (LPS), fréquemment omis dans les publications. Les toxines présentes sur les parois des bactéries Gram négatif sont de puissants contaminants qui peuvent se trouver dans les préparations des formulations, altérant ainsi les résultats des essais [139] et induisant des réponses biologiques importantes comme la pyrogénicité [55], l'inflammation et le choc septique [173]. Le test qui est couramment affecté par ce type de contamination est celui qui estime la capacité des nanomatériaux à induire la production de cytokines [173]. La présence de LPS dans la formulation peut activer les voies de signalisation qui conduisent à la production des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 [140], menant à de faux résultats positifs et des

conclusions inexactes. Ces faits font de l'essai de lysat d'amœbocytes de limule (LAL), un test prioritaire, à exécuter avant la batterie de tests toxicologiques *in vitro*.

Notre première publication met en œuvre une grande partie des recommandations des lignes directrices de l'ISO, l'ASTM et le NCL, dans le choix des tests à réaliser, des conditions expérimentales, des témoins d'interférence à mettre en place, des seuils de toxicité à respecter et de l'estimation de la contamination au LPS. Ceci contribue non seulement à l'effort d'harmonisation dirigé par les organismes de normalisation, mais aussi à la compilation des données dans un cadre standardisé. Cette manière de procéder permet d'analyser plus facilement les résultats des études de sécurité précliniques issus d'une variété de nanoformulations, ce qui permettra éventuellement d'alimenter les bases de données existantes dédiées à la nanotoxicologie.

3.2 Les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA sont hémocompatibles

L'administration intraveineuse de nanoformulations peut mettre en œuvre une série d'évènements qui dépendent de l'interaction entre les nanoparticules et les différentes cellules et protéines du système sanguin. Parmi les réponses biologiques déclenchées par cette interaction se trouvent l'adsorption des protéines plasmatiques, l'agglutination d'érythrocytes, l'activation et l'agrégation plaquettaire, et l'activation du système du complément et le système de coagulation, qui peuvent conduire à une variété de pathologies comme l'hémolyse, la thrombose ou des coagulopathies [55]. Le type et le degré de la réponse biologique sont définis par les caractéristiques physicochimiques des particules. Les données de la littérature montrent des résultats contradictoires concernant le degré d'hématotoxicité de dérivés du chitosane. Bien que le polymère soit connu pour sa biocompatibilité, ses dérivés à l'échelle nanométrique exhibent des caractéristiques hémocompatibles variables.

Les paramètres physicochimiques du chitosane en tant que polymère et de ses nanoparticules ont un effet capital dans la biocompatibilité de celui-ci. La revue de la littérature présentée dans l'introduction a permis d'observer que les modifications structurales, le poids moléculaire et le

degré de déacétylation du polymère, ainsi que la taille, la charge et la solution de suspension des nanoparticules, influencent son interaction avec les cellules et la toxicité. De plus, nous avons constaté que la concentration de chitosane utilisée dans les essais joue un rôle déterminant sur la toxicité de celui-ci, aussi bien que le type cellulaire employé. Ces données permettent de conclure que plusieurs propriétés physicochimiques influencent la biocompatibilité des nanoformulations et mettent en évidence l'importance d'estimer le profil toxicologique de chaque dérivé de chitosane.

Notre premier article démontre que les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA sont hémocompatibles et répondent aux critères normatifs existants des directives ASTM et NCL. Cette affirmation est basée sur la faible activité hémolytique (<5%), le bas niveau d'agrégation plaquettaire (<20%) et l'absence d'effet sur le temps de coagulation du plasma et le système du complément de notre nanoformulation. L'attachement des groupes DEAE à la chaîne principale du chitosane a créé des amines tertiaires qui sont partiellement protonées dans des conditions physiologiques à cause de leur valeur de pKa plus élevée [15, 20]. Cette caractéristique permet la dispersion du chitosane dans une solution de PBS à pH 7.2 et la formation de nanoparticules avec une faible charge positive. Ce fait diminue les interactions avec les membranes cellulaires et/ou les protéines plasmatiques et augmente donc le degré de compatibilité sanguine de notre chitosane modifié. L'influence de la solution de dispersion sur la charge de surface des nanoparticules a déjà été démontrée [124]. Ainsi, dans un milieu acide, la protonation des amines augmente la charge positive de surface des particules, laquelle à son tour accroît les interactions avec les cellules, affectant à la hausse le pourcentage d'hémolyse et d'agrégation plaquettaire et donc la toxicité de la nanoformulation [124]. En utilisant le PBS, nous voulions utiliser un tampon qui égalait les conditions isotoniques du corps humain, ainsi la solution de dispersion des nanoparticules n'aurait aucun impact sur les résultats de biocompatibilité des nanoparticules. Ce choix a été guidé par l'ASTM E2524-8 qui recommande la préparation, la caractérisation et l'évaluation de nanoparticules dans une solution physiologique, afin d'estimer le caractère hémolytique de la formulation [119]. Le raisonnement derrière cette condition est l'effet potentiel que chaque composant de la formulation a sur la réponse biologique et donc la toxicité globale de la préparation [174]. Des surfactants et/ou des additifs utilisés dans la synthèse de

nanomatériaux ont déjà démontré leur influence sur la toxicité de ceux-ci, produisant un effet synergique où la combinaison des composants s'est avérée plus toxique que la somme des produits individuels [175].

Concernant l'hémagglutination, nous avons utilisé des protocoles issus de la littérature, étant donné qu'il n'existe pas de lignes directrices pour cet essai. Ainsi, nos nanoparticules de chitosane ont montré une légère agrégation de globules rouges, sans la destruction de leurs membranes cellulaires, ni la libération de l'hémoglobine, comme en témoignent les résultats du test d'hémolyse. Cet effet peut être expliqué en partie par une augmentation de la charge des particules dans la solution saline (pH 5.5) où les érythrocytes étaient en suspension. Cette augmentation a pu conduire à l'interaction avec les membranes cellulaires chargées négativement et déclencher l'agglutination. Cet argument est supporté par le fait qu'aux conditions physiologiques (pH ~ 7.2) du test d'hémolyse, cette agglutination s'est révélée beaucoup moins importante selon les observations faites sur les tubes qui contenaient les cellules et nos nanoparticules en incubation. Toutefois, l'interaction électrostatique entre les nanoparticules de chitosane et les érythrocytes a déjà été documentée dans diverses conditions expérimentales, où l'attachement facile des particules aux cellules a été invoqué [176] et même la formation d'un filet constitué de ces deux éléments [24]. Afin d'approfondir notre hypothèse, des études supplémentaires évaluant l'effet de nos nanoparticules sur la morphologie des érythrocytes pourraient être accomplies, obtenant ainsi un portrait plus complet des interactions cellule-particules.

De manière générale, les protéines adhèrent aux surfaces de certains types de nanoparticules dès que ces dernières entrent en contact avec les systèmes biologiques [55, 177], conduisant à la formation d'une protéine « corona » autour des particules [178]. Parmi ces protéines se trouvent les opsonines (comme les molécules du complément) et le fibrinogène (facteur de coagulation), qui marquent la particule pour ensuite la retirer du système sanguin par des phagocytes [178]. La formation d'une « corona » de protéines autour de certaines nanoparticules de chitosane a déjà fait l'objet d'études [179-181]. La quantité et le type de protéines de cette « corona » dépendent des caractéristiques physicochimiques des nanomatériaux [178]. La charge, l'hydrophobicité, la taille, la forme et la courbure de surface sont, en général, les propriétés physicochimiques qui

influencent la fixation des protéines sur les nanomatériaux [178, 180]. De plus, les particules de charge neutre sont opsonisées plus lentement que celles qui sont chargées [178]. Dans le cas du chitosane, la charge de ses nanoparticules a déjà été identifiée comme l'un des facteurs jouant un rôle dans l'adsorption des protéines [180]. De ce fait, il est possible de suggérer que la faible charge de nos nanoparticules aurait pu diminuer le taux d'adhésion de protéines du complément et des facteurs de coagulation, affectant très peu les deux systèmes. Dans le cas des facteurs de coagulation, il est possible de spéculer que même si l'interaction et/ou l'adhésion de ces molécules sur la surface des nanoparticules sont envisageables, celle-ci n'est pas intervenue dans leur fonction, comme en témoignent les résultats du test de coagulation où aucune voie de coagulation n'a été affectée. Ceci démontre que nos nanoparticules n'ont pas de propriétés anti- ni pro-coagulantes. Concernant les protéines du complément, bien qu'il existe des preuves que les chaînes natives C3 et C5 sont adsorbées sur la structure du chitosane par des interactions électrostatiques, cette interaction ne déclenche pas le clivage de ces molécules, ni l'activation du système de complément [137]. Nos résultats démontrent clairement que la chaîne C3 α du complément n'a pas été clivée. Dans ce contexte, et afin de découvrir s'il existe une telle interaction entre nos nanoparticules et les protéines plasmatiques, une analyse des protéines présentes dans la « corona » autour des particules, puis de l'identification individuelle de ces protéines par la spectrométrie de masse aideraient à éclaircir cette question [182].

Ces résultats montrent le grand potentiel de nos nanoparticules comme système de livraison de gènes thérapeutiques pour des applications parentérales, grâce à leur hémocompatibilité et leur facilité de préparation dans des conditions physiologiques. Cette biocompatibilité positionne avantageusement notre nano-plateforme par rapport à d'autres nanoformulations où différents niveaux de toxicité ont été décelés dans les systèmes biologiques évalués ici.

3.3 Les nanoparticules DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA n'induisent pas le stress oxydatif et leur cytotoxicité est concentration-, temps- et type cellulaire-dépendants

Il est connu que la cytotoxicité dépend du type cellulaire, de la concentration des nanoparticules utilisée dans les essais et du temps d'exposition [152]. Nous avons évalué la cytotoxicité avec deux méthodes : MTS et LDH. Le premier test mesure le métabolisme mitochondrial qui est associé à la survie cellulaire, et le deuxième reflète l'intégrité membranaire qui est associée à la toxicité [153]. Ces essais ont été réalisés sur trois types cellulaires: PBMC, macrophages Raw 264.7 et les ostéoblastes MG-63. La première publication montre que la viabilité cellulaire des PBMC et des macrophages Raw 264.7 a été plus affectée que celle des MG-63, pour les deux plus hautes concentrations, et surtout pour le temps d'exposition de 48 h. Les résultats sur la libération de la LDH sont en accord avec ceux de la viabilité des PBMC et des MG-63. Cependant, pour les macrophages Raw 264.7 il y a eu une libération importante de la LDH, qui n'est pas cohérente avec le niveau de viabilité cellulaire montré par le test de MTS. Ce fait nous permet de spéculer que l'interaction des nanoparticules avec les cellules a conduit à la libération de la LDH, sans déclencher instantanément un processus de mort cellulaire, comme l'ont démontré les résultats de MTS. Ce raisonnement est appuyé par certaines données de la littérature qui montrent la capacité des polymères cationiques à créer de petites perforations transitoires à l'échelle nanométrique [183] sur la membrane de cellules vivantes. Ces petits trous permettent la libération d'enzymes cytoplasmiques (comme la LDH) et l'entrée de petites molécules [184]. Cette libération de la LDH a été observée dans des concentrations polymériques non toxiques comme démontré par le test de viabilité XTT [184]. Ces données et l'interprétation de nos propres résultats, nous permettent de suggérer que la libération de la LDH obtenue à la concentration plasmatique théorique (TPC) cible pourrait être associée à une augmentation de la perméabilité membranaire et/ou la formation de trous nanométriques, plutôt qu'à la nécrose des cellules. Cette hypothèse est appuyée par la viabilité cellulaire >70% démontrée par le test de MTS à la même concentration. Des essais supplémentaires de MTS et LDH, avec des périodes d'incubation post-exposition, nous permettraient d'observer si les cellules récupèrent après l'ouverture des

trous nanométriques et si le niveau de LDH diminue. Ces études pourraient être appuyées par des essais d'apoptose et des observations par microscopie à force atomique (AFM), afin de comparer l'intégrité membranaire avant, pendant et après l'exposition aux nanoparticules [183, 184].

Concernant les études de stress oxydatif, nos résultats montrent que nos nanoparticules n'induisent pas la production des ROS ni de NO. Ces résultats sont encourageants étant donné que la production de ces radicaux libres est associée à l'inflammation, à la cytotoxicité, à la génotoxicité [28, 75, 76] et au cancer [185], parmi d'autres pathologies. Le chitosane est reconnu pour ses propriétés antioxydantes et sa capacité d'attraper/neutraliser les radicaux libres [185], ce qui retarde ou évite la production de ROS. Cette capacité a été attribuée aux groupes d'amines libres et hydroxyles sur la structure du chitosane qui interagissent avec les radicaux libres pour former des macromolécules de radicaux plus stables [186, 187], par exemple la réaction entre les amines du polymère et les radicaux hydroxyles $\bullet\text{OH}$ [186, 187].

L'absence d'une réponse de stress oxydatif et le niveau acceptable de viabilité cellulaire pour notre concentration cible (TPC) font de nos nanoparticules un système de livraison d'acides nucléiques potentiel pour la thérapie génique.

3.4 La capacité des nanoparticules à induire la sécrétion d'IL-1 β est dépendante du type cellulaire

Le système immunitaire est composé de divers organes, de multiples cellules et de protéines qui sont parfaitement organisés afin de détecter les agents pathogènes et d'induire une réponse coordonnée et appropriée pour les éliminer. Les nanoparticules, étant des agents exogènes, sont rapidement repérées après leur administration, et le type et la magnitude de la réponse biologique déclenchée est directement liée à leurs propriétés physicochimiques [97]. Les cytokines sont de petites molécules de signalisation, sécrétées par divers types de cellules, comme celles du système immunitaire [138]. L'activation de ces cellules par les nanoparticules peut provoquer une réponse immunitaire avec l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 parmi d'autres [138]. Le TNF- α et l'IL-1 β sont reconnus comme les principales cytokines impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire [188].

Le type de réaction immunitaire générée définit l'immunogénicité de la nanoformulation [97, 173]. Afin de compléter le profil toxicologique de nos nanoparticules, nous avons testé leur capacité à induire la sécrétion de cytokines chez les PBMC. Notre première publication montre que nos nanoparticules n'ont pas induit la sécrétion de TNF- α ni d'IL-6 de manière significative. Cependant, il y a eu une sécrétion significative d'IL-1 β et d'IL-8 pour certaines concentrations. Étant donné que l'IL-1 β a été induite sans la sécrétion de TNF- α , cela nous permet de suggérer que les nanoparticules n'ont pas déclenché une réponse inflammatoire à proprement dit. La capacité du chitosane à induire la production de l'IL-1 β suite à l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 a déjà été documentée dans le même type cellulaire [144]. Ceci nous permet de spéculer que les nanoparticules ont pu activer la voie de l'inflammasome chez les PBMC, mais que cette activation est dépendante du type cellulaire. Ce raisonnement est appuyé par les résultats de notre deuxième article où il n'y a pas eu de sécrétion de l'IL-1 β chez les macrophages Raw 264.7, à la même concentration qui a démontré une différence significative chez les PBMC (TPC). Plus important encore, il a déjà été rapporté que les macrophages Raw 264.7 n'activent pas la voie de l'inflammasome NLRP3, car ces cellules n'expriment pas la protéine de type speck-like associée à l'apoptose contenant une CARD (ASC), essentielle dans l'activation de la voie NLRP3 [189, 190]. De plus, la différence dans la réponse induite par le chitosane dans les lignées cellulaires versus les cellules primaires, aussi bien que l'espèce (humain versus souris) a déjà été rapportée dans la littérature [141]. Ce fait nous permet de conclure que l'induction de cytokines par nos nanoparticules est cellule-dépendante, de même que l'activation des voies de signalisation qui conduisent à la production des médiateurs pro-inflammatoires.

3.5 Les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA n'activent pas les voies de signalisation reliées au TLR-4

Les résultats de notre premier article nous ont encouragés à évaluer le mécanisme moléculaire de nos nanoparticules en examinant les voies de signalisation que celles-ci peuvent activer. Guidés par la revue de la littérature, nous avons utilisé la lignée cellulaire de macrophages Raw 264.7, parce qu'ils expriment le TLR-4 [41, 191], le MR [45, 192] et le dectin-1 [193, 194] impliqués dans la reconnaissance du chitosane et/ou de la chitine [195]. De plus, nous voulions utiliser le

même modèle biologique que les autres publications afin de mieux comparer les résultats obtenus.

L'activation des voies de signalisation en aval du récepteur TLR-4 a été évaluée, étant donné que ce récepteur est le plus cité dans la reconnaissance du chitosane. Les résultats de notre deuxième article montrent qu'aucune voie de signalisation, incluant celle de IKK/NF- κ B, les MAPKs et l'AKT, n'a été activée par nos nanoparticules, peu importe la concentration utilisée et le temps d'incubation testé. Cette absence d'activation a été supportée par l'absence de production des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'iNOS et la COX-2.

Nos résultats divergent de ceux issus de la littérature où ces mêmes voies de signalisation ont été activées par des dérivés du chitosane dans le même type cellulaire, les macrophages Raw 264.7. En analysant davantage ces rapports, nous avons constaté que les publications ont utilisé des dérivés de chitosane libre (non-complexé), comparées à notre formulation où le chitosane forme des nanoparticules en complexant des siRNA. À notre connaissance, il n'existe pas d'études mécanistiques sur les nanoparticules de chitosane, ce qui complique la comparaison des résultats, étant donné que les particules à l'échelle nanométrique et les polymères libres peuvent interagir de façon différente avec les cellules. Par exemple, notre chitosane est condensé dans la nanoparticule et ses chaînes ne sont pas disponibles pour des interactions avec les récepteurs au même niveau que les chaînes du chitosane libre. Également, les nanoparticules et les polymères n'ont pas les mêmes propriétés physicochimiques. Dans les publications analysées, le poids moléculaire et le degré de déacétylation sont les seules caractéristiques rapportées qui peuvent être comparées avec notre formulation. Ainsi, nous avons observé que le degré de déacétylation ne semble pas être le facteur qui influence les résultats, car tous les dérivés avaient un DDA similaire au nôtre. Par contre, ces dérivés étaient de faible poids moléculaire < 10 kDa [196-199] comparés à notre chitosane modifié de 259 kDa.

Les rapports dans la littérature qui comparent l'immunoréactivité du chitosane de différents poids moléculaires sont limités. Cependant, des dérivés de chitosane de faible poids moléculaire de 3 kDa ont démontré être plus immunogènes comparés à ceux de 50 kDa [143, 196]. Également, des chitosanes de haut poids moléculaire ont démontré la capacité d'inhiber la réponse

inflammatoire induite par le LPS chez les macrophages Raw 264.7 comparés aux dérivés de faibles poids qui, normalement, l'augmentent [200]. De surcroît, il a été suggéré que le poids moléculaire du chitosane influence son interaction avec des récepteurs de surface et donc l'activation de voies de signalisation [200]. Ces faits nous permettent de suggérer que le poids moléculaire de notre chitosane a pu influencer la réponse cellulaire et expliquent ainsi la divergence dans les résultats de l'activation des voies de signalisation.

Il existe aussi certaines études qui montrent la capacité des dérivés du chitosane à intervenir dans la réponse cellulaire au LPS, ces rapports relient cette capacité à une inhibition de l'activation de la voie de signalisation de MAPKs, PI3K/AKT et/ou les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 [201-204], plutôt que par une intervention au niveau du récepteur TLR-4 [169, 200]. Cependant, des études faites avec des cellules dendritiques dérivées de souris déficientes en TLR4 [40], des cellules dendritiques transfectées avec le siRNA-TLR-4 [42], des macrophages Raw 264.7 incubés avec l'anticorps anti-TLR4 [41] et des cellules épithéliales intestinales d'origine porcine (IPEC-J2) traitées avec l'inhibiteur de TLR-4 (TAK-242) [43] ont suggéré que le TLR-4 est impliqué dans la reconnaissance du chitosane. L'inconvénient que présentent ces dernières publications est l'absence d'information sur le niveau de contamination aux endotoxines des dérivés de chitosane utilisés, ce qui rend difficile l'interprétation des données. Il est bien connu que les formulations contaminées au LPS donnent de faux résultats positifs dans les tests de toxicité, et ceci ne fait pas exception dans l'évaluation mécanistique des nanoparticules et des polymères. Le LPS est un puissant activateur qui est reconnu par le TLR-4 et active sa voie de signalisation [139]. Une étude menée sur l'immunoréactivité du chitosane provenant de différents fabricants a montré que presque tous les échantillons étaient contaminés aux endotoxines (>1 EU/mg) et que cette contamination altérait la réponse immunitaire [205]. Ceci pourrait aussi expliquer les résultats différents obtenus dans d'autres publications concernant les voies de signalisation et les récepteurs du chitosane.

En conclusion, bien que les dérivés du chitosane montrent l'activation de différentes voies de signalisation, il n'existe pas une preuve directe que cette activation est une réponse de l'activation du TLR-4. Malheureusement, étant donné le manque de données par rapport à la contamination aux endotoxines des formulations, il est difficile de départager si l'activation correspond à une

réponse au polymère ou à la contamination au LPS. De plus, étant donné que les voies de signalisation activées par les dérivés du chitosane (IKK/NF- κ B et MAPKs) ne sont pas exclusives au TLR-4, d'autres récepteurs, comme certains récepteurs de lectine de type C (CLR) (dectin-1 et le récepteur de mannose), pourraient être impliqués dans la reconnaissance du chitosane et de ses dérivés.

3.6 Les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA n'activent pas SYK

Le TLR-4 n'est pas le seul récepteur relié à la reconnaissance du chitosane comme le rapporte la littérature. D'autres récepteurs, comme le MR [44-46] et le dectin-1 [49, 52, 206] ont été associés au chitosane et la chitine. Étant donné que nous avons eu une absence d'activation dans les voies de signalisation de TLR-4, nous avons dirigé nos recherches vers l'étude de l'activation de la protéine kinase SYK. SYK est une protéine clé et centrale dans la transduction du signal intracellulaire de dectin-1, dectin-2, mincle [207, 208] et le MR [95]. Les résultats de notre deuxième article montrent que SYK n'a pas été activée par les nanoparticules DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA dans les conditions expérimentales utilisées. Ces résultats excluent de manière indirecte l'implication du récepteur de mannose et le dectin-1 dans la reconnaissance de notre nanoformulation. Étant donné que le récepteur dectin-1 est associé à la reconnaissance de la chitine, l'absence de phosphorylation de SYK était attendue. Concernant le MR, sa voie de signalisation intracellulaire n'est pas connue à ce jour. Cependant, la phosphorylation de SYK a été reliée à l'activation de ce récepteur dans la phagocytose du mycobacterium tuberculosis [95]. La molécule adaptatrice GRB2 et le complexe Rac/Pak/Cdc-42 ont également été associés à la phagocytose médiée par le MR chez les macrophages humains. Toutefois, ces molécules sont apparemment en aval de SYK [95], donc la détection de leur activation n'était pas pertinente dans notre étude. Jusqu'à présent, les rapports qui associent le MR au chitosane se basent sur des études de compétition où le niveau d'internalisation du polymère est visiblement réduit par la présence des ligands du MR [45]. De manière similaire au TLR-4, il n'existe pas une preuve directe de la liaison du chitosane au MR et des études plus approfondies sont nécessaires afin de démontrer leur affinité. À cette fin, des essais de liaison récepteur-ligand avec le marquage soit

du ligand soit du récepteur sont utilisés pour mesurer l'interaction d'un ligand avec son récepteur [209]. D'autres technologies, comme la résonance des plasmons de surface (SPR), déterminent la capacité de liaison du ligand en utilisant des récepteurs immobilisés [209]. Ce type d'essai pourrait confirmer l'interaction du chitosane avec son récepteur et donnerait plus d'évidence à la théorie du TLR-4 comme récepteur de ce polymère.

Ces résultats nous amènent à suggérer qu'il y a possiblement d'autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance de nos nanoparticules. Les récepteurs TLR-2 [50, 206], CD14 [47, 48], CR3 [47] et galectin-3 [195] chez les macrophages, le FIBCD1 [210] et le RegIII γ chez les cellules épithéliales intestinales, et le NKR-P1 chez les cellules tueuses naturelles (NK) ont déjà été associés à la reconnaissance du chitosane et/ou de la chitine [195]. De plus, il est possible que nos nanoparticules utilisent un mécanisme indépendant de récepteurs membranaires pour leur internalisation cellulaire. La diffusion passive et la formation de trous à l'échelle nanométrique sont des mécanismes indépendants de l'endocytose, qui n'utilisent pas des récepteurs [211, 212]. La formation de trous nanométriques a déjà été démontrée pour certaines nanoparticules cationiques [211, 212]. Notre deuxième article montre que nos nanoparticules ont réduit l'expression de la GAPDH, ce qui démontre de façon indirecte leur internalisation cellulaire. Dans notre premier article, nous avons émis l'hypothèse de la formation de petites perforations transitoires à l'échelle nanométrique, à cause de la libération élevée de LDH simultanément à une bonne viabilité cellulaire pour TPC. Ces faits nous font envisager, même si c'est peu probable, la théorie de la formation de trous temporaires comme voie d'internalisation de nos nanoparticules. Cependant, la démonstration d'une telle hypothèse nécessiterait des études plus approfondies.

3.7 Limitation du projet de recherche

Les limitations concernant cette thèse adressent certains tests *in vitro* qui n'ont pas été exécutés et qui auraient donné un profil toxicologique plus complet de nos nanoparticules.

3.7.1 Le test de génotoxicité *in vitro*

Les essais de mutagénicité font partie de la batterie de tests évaluant la sécurité préclinique des nanomatériaux. Ces tests visent à déceler si les nanoparticules ont la capacité d'induire une mutation au niveau génique ou chromosomique. Ces types des mutations sont détectées par l'essai effectué sur les cellules de lymphome de souris (MLA) (OECD 490) [213] pour le premier type de mutation et le test du micronoyau (OECD 487) [214] pour le deuxième. L'OECD publie plusieurs rapports par année concernant l'adaptation des normes aux nanoformulations, et des mises à jour sur la génotoxicité. Ce test nous donnerait plus d'informations concernant l'innocuité de notre nanoformulation.

3.7.2 Étude de l'activation des voies de signalisation sur des PBMC humaines

Le premier article nous a montré que les nanoparticules de chitosane ont stimulé la production d'IL-1 β chez les PBMC. Afin d'élucider la voie impliquée dans la sécrétion de ce médiateur pro-inflammatoire, une étude des voies de signalisation des IKK/NF- κ B, MAPKs et AKT chez les PBMC pourrait être exécutée. Cependant, des rapports issus de la littérature ont démontré l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 et la subséquente sécrétion de l'IL-1 β , chez les PBMC traitées avec le chitosane [144]. Donc, il est probable que la production d'IL-1 β détectée soit reliée à cette voie. Dans le cas d'une confirmation de l'activation de la voie NLRP3, une étude complémentaire sur la capacité du chitosane à induire la production de ROS chez les PBMC pourrait clarifier si ce mécanisme est impliqué dans cette activation, comme c'est le cas dans l'étude mentionnée [144]. L'analyse de nos deux articles a démontré que les PBMC et les Raw 264.7 ne réagissent pas de la même manière à l'exposition aux nanoparticules. Ceci a été vérifié par la différence au niveau de la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, pendant que l'IL-1 β a été induite avec une différence statistiquement significative (pour TPC) chez les PBMC, le niveau de cette cytokine chez les macrophages Raw 264.7 a été indétectable. Cette situation pourrait se reproduire concernant le stress oxydatif, et si le premier article a montré que les nanoparticules n'ont pas induit la

génération de ROS chez les macrophages Raw 264.7, une réponse contraire pourrait être obtenue chez les PBMC. Ceci met en évidence que la réponse biologique aux nanomatériaux est cellule-dépendante et qu'elle n'est pas toujours transférable.

3.7.3 Étude de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 reliée au FR

Nos nanoparticules contiennent 2% d'acide folique lié à la chaîne principale du chitosane par l'intermédiation de PEG. Cette fonctionnalisation permet de cibler des cellules qui surexpriment le récepteur de folate comme les macrophages activés et les cellules cancéreuses [26, 215, 216]. Nos conditions expérimentales du deuxième article étaient limitées à l'étude de l'activation des voies de signalisation du TLR-4, chez les macrophages Raw 264.7 non pré-stimulés. Ce paramètre nous a permis d'obtenir des résultats liés uniquement à la réponse cellulaire aux nanoparticules. Malheureusement, ce type cellulaire doit être préalablement activé afin de stimuler la surexpression du récepteur de folate. Le LPS est l'agent stimulateur des macrophages utilisé couramment dans la littérature [27]. Cependant, étant donné que le LPS est un puissant activateur de TLR-4 et que nous voulions étudier exactement ce récepteur, il aurait été ardu de départager les résultats provenant de l'activation associée aux nanoparticules, de ceux déclenchés par l'intervention du LPS. Nos données préliminaires nous ont montré que le LPS phosphoryle STAT3 après 2 h d'incubation chez les Raw 264.7. L'activation de la voie JAK/STAT3 par la liaison de l'acide folique au récepteur de folate alpha (FR α) a déjà été documentée [217-219]. Puis que notre protéine cible était STAT3, une stimulation préliminaire des cellules avec le LPS aurait possiblement faussé les résultats. L'utilisation des cellules HeLa, qui expriment le récepteur de folate de façon constitutive, pourrait être une bonne alternative pour réaliser l'étude de la voie de signalisation JAK/STAT3. D'ailleurs, notre équipe a déjà utilisé cette lignée cellulaire afin d'analyser le taux de transfection médié par des nanoparticules de chitosane liées à l'acide folique [17]. Donc, cette stratégie pourrait nous aider à contourner l'étape de la pré-stimulation cellulaire.

3.8 Perspectives

Les résultats de cette thèse nous ont montré le potentiel de nos nanoparticules de chitosane comme système de livraison de gènes thérapeutiques dans le cadre de la thérapie génique. Leur bonne efficacité de transfection, ainsi que leur hémocompatibilité et leur faible induction des médiateurs pro-inflammatoires font de ces nanoparticules de plateformes efficaces et surtout sécuritaires, à considérer pour des formulations destinées à l'application systémique.

Ainsi, ce travail sert de base pour de futures études précliniques *in vivo*, où la biodistribution en temps réel de nanoparticules pourrait être analysée à l'aide de systèmes d'imagerie performants, permettant de caractériser de façon plus précise l'accumulation des particules dans des organes vitaux comme le foie, la rate et les reins, afin de mieux identifier leur distribution dans l'organisme. Sur ces mêmes modèles, la toxicité pourrait également être évaluée de façon plus avancée par la quantification des marqueurs de fonctions des organes dans le sérum et/ou le plasma.

D'autres études complémentaires, visant à découvrir la voie d'internalisation de nos nanoparticules, donneraient une vision plus précise du comportement de celles-ci à l'échelle cellulaire. Elles nous renseigneraient sur leur interaction avec les différents types cellulaires et apporteraient, de ce fait, une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action.

Enfin, l'ensemble de ces investigations dirigeront la recherche vers la fin ultime qui est l'utilisation de ces nanoparticules comme agents thérapeutiques dans des maladies inflammatoires telle que la polyarthrite rhumatoïde et mèneront aux études cliniques qui permettraient d'étudier le bénéfice de nos nanoparticules dans la thérapie génique.

Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse nous permettent de conclure que les nanoparticules de DEAE₁₂-CH-PEG-FA₂/siRNA sont hémocompatibles et répondent aux critères réglementaires grâce à leur faible caractère hémolytique, bas niveau d'agrégation plaquettaire et l'absence d'effet sur le système du complément et le système de coagulation. Leur niveau d'innocuité a également été confirmé par la faible réponse oxydative et la non-production des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6. De surcroît, l'absence d'activation des voies de signalisation reliées au TLR-4 permet de compléter le profil sécuritaire de notre nanoformulation. L'ensemble de ces données et l'efficacité de transfection de notre nanoformulation mettent en évidence le potentiel d'utilisation de nos nanoparticules, comme système de livraison des gènes thérapeutiques et nous permettent d'envisager leur application future dans le cadre de la thérapie génique.

Références bibliographiques

1. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. The journal of gene medicine, 2018. **20**(5): p. e3015.
2. Nóbrega, C., L. Mendonça, and C.A. Matos, *Gene and Cell Therapy*, in *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. 2020, Springer.
3. Shi, Q., et al., *Chitosan-DNA/siRNA nanoparticles for gene therapy*. Non-Viral Gene Ther, 2011. **19**: p. 455-480.
4. Salameh, J.W., et al., *Polymer-mediated gene therapy: Recent advances and merging of delivery techniques*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2020. **12**(2): p. e1598.
5. Nóbrega, C., L. Mendonça, and C.A. Matos, *Non-viral Vectors for Gene Therapy*, in *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. 2020, Springer. p. 23-37.
6. Riley, M.K. and W. Vermerris, *Recent advances in nanomaterials for gene delivery—a review*. Nanomaterials, 2017. **7**(5): p. 94.
7. Kim, T.-H., et al., *Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo*. Progress in polymer science, 2007. **32**(7): p. 726-753.
8. de Souza, R.H.F.V., et al., *Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties*. International journal of biological macromolecules, 2018. **119**: p. 186-197.
9. Ahsan, S.M., et al., *Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering*. International journal of biological macromolecules, 2018. **110**: p. 97-109.
10. Mao, S., W. Sun, and T. Kissel, *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*. Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(1): p. 12-27.
11. Baskar, D. and T.S. Kumar, *Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films*. Carbohydrate polymers, 2009. **78**(4): p. 767-772.
12. Huang, M., et al., *Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation*. Journal of controlled release, 2005. **106**(3): p. 391-406.
13. Lavertu, M., et al., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4815-4824.
14. Yang, T.-L., *Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ*. International journal of molecular sciences, 2011. **12**(3): p. 1936-1963.
15. Oliveira, F.d.P.P., et al., *Synthesis and evaluation of diethylethylamine–chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency*. Nanotechnology, 2013. **24**(5): p. 055101.
16. Yu, Y.Y., et al., *Synthesis and characterization of methoxy poly (ethylene glycol)-O-chitosan-polyethylenimine for gene delivery*. Carbohydrate polymers, 2010. **81**(2): p. 269-274.

17. Fernandes, J.C., et al., *Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 5833.
18. Cho, K.C., et al., *Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis*. Journal of controlled release, 2005. **108**(1): p. 121-131.
19. Shi, Q., et al., *In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice*. International journal of nanomedicine, 2018. **13**: p. 387.
20. Martins, G.O., et al., *Amphipathic chitosans improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions*. Carbohydrate polymers, 2019. **216**: p. 332-342.
21. Ragelle, H., G. Vandermeulen, and V. Préat, *Chitosan-based siRNA delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2013. **172**(1): p. 207-218.
22. Bus, T., A. Traeger, and U.S. Schubert, *The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier*. Journal of Materials Chemistry B, 2018. **6**(43): p. 6904-6918.
23. Balan, V. and L. Verestiuc, *Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review*. European Polymer Journal, 2014. **53**: p. 171-188.
24. Lima, J.M.d., et al., *Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes*. BioMed research international, 2015. **2015**.
25. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **99**: p. 28-51.
26. Sudimack, J. and R.J. Lee, *Targeted drug delivery via the folate receptor*. Adv.Drug Deliv.Rev., 2000. **41**(2): p. 147-162.
27. Yang, C., S. Gao, and J. Kijms, *Folic acid conjugated chitosan for targeted delivery of siRNA to activated macrophages in vitro and in vivo*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(48): p. 8608-8615.
28. ISO, *ISO TR 16197. Nanotechnologies - Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials*. www.iso.org. 2014.
29. Mohammed, M.A., et al., *An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery*. Pharmaceutics, 2017. **9**(4): p. 53.
30. Zhu, L. and R.I. Mahato, *Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery*. Expert opinion on drug delivery, 2010. **7**(10): p. 1209-1226.
31. NCL, *NCL Method PCC-2. Measuring Zeta Potential of Nanoparticles*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
32. Xu, R., *Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement*. Particuology, 2008. **6**(2): p. 112-115.
33. Battaglia, L.S. and M.Á. Solinís, *Ana del Pozo-Rodríguez, Alicia Rodríguez-Gascón, Julen Rodríguez-Castejón, Mónica Vicente-Pascual, Itziar Gómez-Aguado*. Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology, 2020. **171**: p. 321-368.
34. UniProt. *UniProtKB - P32067 (LA_MOUSE)*. <https://www.uniprot.org/uniprot/P32067>. Accessed on [13/11/2021].
35. Alberts, B., et al., *From DNA to protein: how cells read the genome, Chapter 7, in Essential cell biology*. 2015, Garland Science.

36. Liang, C., et al., *Sjögren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(1): p. 723-736.
37. Brito-Zeron, P., et al., *Sjögren syndrome*. Nature reviews Disease primers, 2016. **2**(1): p. 1-20.
38. Tsang-A-Sjoe, M. and I. Bultink, *Systemic lupus erythematosus: review of synthetic drugs*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2015. **16**(18): p. 2793-2806.
39. Abrams, M.T., et al., *Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment*. Molecular therapy, 2010. **18**(1): p. 171-180.
40. Villiers, C., et al., *From secretome analysis to immunology chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism*. Molecular & Cellular Proteomics, 2009. **8**(6): p. 1252-1264.
41. Zhang, P., et al., *Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages*. International immunopharmacology, 2014. **23**(1): p. 254-261.
42. Dang, Y., et al., *The effects of chitosan oligosaccharide on the activation of murine spleen CD11c+ dendritic cells via Toll-like receptor 4*. Carbohydrate Polymers, 2011. **83**(3): p. 1075-1081.
43. Shi, L., et al., *Chitosan oligosaccharide-mediated attenuation of LPS-induced inflammation in IPEC-J2 cells is related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway*. Carbohydrate polymers, 2019. **219**: p. 269-279.
44. Han, Y., et al., *Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function*. International immunopharmacology, 2005. **5**(10): p. 1533-1542.
45. Feng, J., L. Zhao, and Q. Yu, *Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **317**(2): p. 414-420.
46. Mori, T., et al., *Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives*. Journal of veterinary medical science, 2005. **67**(1): p. 51-56.
47. Wu, G.J. and G.J. Tsai, *Chito oligosaccharides in combination with interferon- γ increase nitric oxide production via nuclear factor- κ B activation in murine RAW264. 7 macrophages*. Food and chemical toxicology, 2007. **45**(2): p. 250-258.
48. Otterlei, M., et al., *Characterization of binding and TNF- α -inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14*. Vaccine, 1994. **12**(9): p. 825-832.
49. Dong, B., et al., *A chitin-like component on sclerotic cells of Fonsecaea pedrosoi inhibits Dectin-1-mediated murine Th17 development by masking β -glucans*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114113.
50. Shibata, Y., W.J. Metzger, and Q.N. Myrvik, *Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production*. The Journal of Immunology, 1997. **159**(5): p. 2462-2467.
51. Li, X., et al., *Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine*. Clinical and Developmental Immunology, 2013. **2013**.
52. Bueter, C.L., C.A. Specht, and S.M. Levitz, *Innate sensing of chitin and chitosan*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003080.

53. Rhees, R.W. and S.L. Palmer, *Cardiovascular System: Blood, chapter 14 in Schaum's Outline of Human Anatomy and Physiology*. 2013: McGraw-Hill Education.
54. Sherwood, L., *The blood, chapter 11 in Human physiology: from cells to systems*. 2015: Cengage learning.
55. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution*. *Molecular pharmaceutics*, 2008. **5**(4): p. 487-495.
56. Sitharaman, B., *Nanobiomaterials handbook. Chapter 31. Hemocompatibility of Nanoparticles*. . 2016: CRC Press.
57. Neun, B.W. and M.A. Dobrovolskaia, *Method for in vitro analysis of nanoparticle thrombogenic properties*, in *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. 2011, Springer. p. 225-235.
58. NCL, *Method ITA-12. Analysis of Nanoparticle Effects on Plasma Coagulation Times in Vitro*. *Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick*, <http://ncl.cancer.gov/>. 2015.
59. Rondon, E.P., et al., *Evidence Supporting the Safety of Pegylated Diethylaminoethyl-Chitosan Polymer as a Nanovector for Gene Therapy Applications*. *International Journal of Nanomedicine*, 2020. **15**: p. 6183.
60. Ilinskaya, A.N. and M.A. Dobrovolskaia, *Nanoparticles and the blood coagulation system*. *Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials, Volume 2: Haematocompatibility of Engineered Nanomaterials*, 2016: p. 261-302.
61. Levi, M. and H. Ten Cate, *Disseminated intravascular coagulation*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **341**(8): p. 586-592.
62. Sherwood, L., *Body Defenses, chapter 12 in Human physiology: from cells to systems*. 2015: Cengage learning.
63. NCL, *Method ITA-5.1. Qualitative Analysis of Total Complement Activation by Western Blot*. *Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick*, <http://ncl.cancer.gov/>. 2015.
64. Hoffman, R., et al., *Complement and immunoglobulin biology, chapter 22 in Hematology: basic principles and practice*. . 2017: Elsevier.
65. Kindt, T.J., et al., *Hypersensitivity reactions, chapter 15 in Kuby immunology*. 2007: Macmillan.
66. Gupta, S. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases*. *Nature Reviews Nephrology*, 2016. **12**(7): p. 402-413.
67. Monie, T., *Immune cells and the process of pattern recognition, Section 2 in The innate immune system: a compositional and functional perspective*. 2017, Academic Press.
68. Lee, K.H., et al., *Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: a comprehensive review*. *Autoimmunity reviews*, 2017. **16**(11): p. 1160-1173.
69. Monie, T., *Effector Mechanisms and Cellular Outputs, Section 3, in The innate immune system: a compositional and functional perspective*. 2017, Academic Press.
70. El Kebir, D. and J.G. Filep, *Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation*. *TheScientificWorldJournal*, 2010. **10**: p. 1731-1748.
71. Khan, M.M., *Overview of the Immune Response, chapter 1 in Immunopharmacology*. 2016: Springer.

72. Kindt, T.J., et al., *Cells and organs of the immune system, chapter 2 in Kuby immunology*. 2007: Macmillan.
73. Gerhardt, T. and K. Ley, *Monocyte trafficking across the vessel wall*. Cardiovascular research, 2015. **107**(3): p. 321-330.
74. Kindt, T.J., et al., *Innate immunity, chapter 3 in Kuby immunology*. 2007: Macmillan.
75. Manke, A., L. Wang, and Y. Rojanasakul, *Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity*. BioMed research international, 2013. **2013**.
76. Jesus, S., et al., *Hazard assessment of polymeric nanobiomaterials for drug delivery: what can we learn from literature so far*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2019. **7**: p. 261.
77. Hopkins, S.J., *The pathophysiological role of cytokines*. Legal Medicine, 2003. **5**: p. S45-S57.
78. Kindt, T.J., et al., *Cytokines, chapter 12 in Kuby immunology*. 2007: Macmillan.
79. Khan, M.M., *Role of Cytokines, chapter 2 in Immunopharmacology*. 2016, Springer.
80. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nature reviews immunology, 2003. **3**(1): p. 23-35.
81. Zolnik, B.S., et al., *Minireview: nanoparticles and the immune system*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 458-465.
82. Dobrovolskaia, M.A. and S.E. McNeil, *Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines*. Journal of controlled release, 2013. **172**(2): p. 456-466.
83. NCL, *Method ITA-10. Preparation of Human Whole Blood and Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures to Analyze Nanoparticle Potential to Induce Inflammatory Cytokines, Chemokines and Interferons In Vitro*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2015.
84. Fajgenbaum, D.C. and C.H. June, *Cytokine storm*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(23): p. 2255-2273.
85. Robertson, C.M. and C.M. Coopersmith, *The systemic inflammatory response syndrome*. Microbes and Infection, 2006. **8**(5): p. 1382-1389.
86. Betsou, F., et al., *Biospecimen science of blood for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) functional applications*. Current Pathobiology Reports, 2019. **7**(2): p. 17-27.
87. Monie, T., *Integrated Innate Immunity—Combining Activation and Effector Functions, Section 4*, in *The innate immune system: a compositional and functional perspective*. 2017, Academic Press.
88. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(5): p. 816-825.
89. Khan, M.M., *Cytokine Receptors and Signaling, chapter 3*, in *Immunopharmacology*. 2016, Springer.
90. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nature reviews immunology, 2004. **4**(7): p. 499-511.
91. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. Annual review of immunology, 2012. **30**: p. 491-529.
92. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu. Rev. Immunol., 2005. **23**: p. 901-944.

93. Zhang, J., et al., *Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages*. *Molecular biology of the cell*, 2005. **16**(2): p. 824-834.
94. Cambi, A., et al., *Dendritic cell interaction with Candida albicans critically depends on N-linked mannan*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(29): p. 20590-20599.
95. Rajaram, M.V., et al., *M. tuberculosis-initiated human mannose receptor signaling regulates macrophage recognition and vesicle trafficking by FcRγ-Chain, Grb2, and SHP-1*. *Cell reports*, 2017. **21**(1): p. 126-140.
96. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. *Biomaterials*, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
97. Dobrovolskaia, M.A. and S.E. McNeil, *Immunological properties of engineered nanomaterials*. *Nature nanotechnology*, 2007. **2**(8): p. 469-478.
98. Gatoo, M.A., et al., *Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations*. *BioMed research international*, 2014. **2014**.
99. Shin, S.W., I.H. Song, and S.H. Um, *Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity*. *Nanomaterials*, 2015. **5**(3): p. 1351-1365.
100. Dobrovolskaia, M.A., M. Shurin, and A.A. Shvedova, *Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2016. **299**: p. 78-89.
101. Bobo, D., et al., *Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date*. *Pharmaceutical research*, 2016. **33**(10): p. 2373-2387.
102. ISO, *10993-1. Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*. www.iso.org. 2009.
103. ASTM, *F748. Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices*. *ASTM International*, www.astm.org. 2006 (2010).
104. Halamoda-Kenzaoui, B., et al., *Mapping of the available standards against the regulatory needs for nanomedicines*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2019. **11**(1): p. e1531.
105. Locascio, L.E., et al., *Nanomaterial toxicity: emerging standards and efforts to support standards development*, in *Nanotechnology Standards*. 2011, Springer. p. 179-208.
106. NCI. *Nanotechnology Characterization Lab. [homepage on the Internet]*. Available from: <https://ncl.cancer.gov/>. Accessed June 18, 2021.
107. FDA. *Food and Drug Administration [homepage on the Internet]*. *Nanotechnology task force; 2021*. Available from: <https://www.fda.gov/science-research/nanotechnology-programs-fda/nanotechnology-task-force>. Accessed June 21, 2021.
108. ISO. *International Organization for Standardization [homepage on the Internet]*. *ISO/TC 229 nanotechnologies*. Available from: <https://www.iso.org/committee/381983/x/catalogue/>. Accessed June 18, 2021.
109. ASTM. *American Society for Testing and Materials [homepage on the Internet]*. *Normes de nanotechnologie*. Available from: <https://www.astm.org/Standards/nanotechnology-standards.html>. Accessed June 21, 2021.
110. NCL. *Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick. [homepage on the Internet]*. Available from: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>. Accessed June 21, 2021.

111. OECD. *Organization for Economic Cooperation and Development [homepage on the Internet]. Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. Available from: <https://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>. Accessed June 21, 2021.*
112. Dash, B.C., et al., *The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility.* Biomaterials, 2010. **31**(32): p. 8188-8197.
113. Shelma, R. and C.P. Sharma, *Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **84**(2): p. 561-570.
114. Rao, S.B. and C.P. Sharma, *Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential.* Journal of biomedical materials research, 1997. **34**(1): p. 21-28.
115. Song, L., et al., *Evaluation of the coagulation properties of arginine-chitosan/DNA nanoparticles.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2010. **95**(2): p. 374-379.
116. Xiong, W.-y., et al., *Selective carboxypropionylation of chitosan: synthesis, characterization, blood compatibility, and degradation.* Carbohydrate research, 2011. **346**(10): p. 1217-1223.
117. NCL, *Method ITA-1. Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>.* 2015.
118. ISO, *10993-4:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 4: selection of tests for interactions with blood.* www.iso.org. 2009.
119. ASTM, *E2524. Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles.* ASTM International, www.astm.org. 2008 (2013).
120. Pereira, P., et al., *Biocompatibility of a self-assembled glycol chitosan nanogel.* Toxicology in Vitro, 2015. **29**(3): p. 638-646.
121. Guo, X., et al., *Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components.* Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 1412.
122. Lee, D.-W., K. Powers, and R. Baney, *Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles.* Carbohydrate polymers, 2004. **58**(4): p. 371-377.
123. Carreno-Gomez, B. and R. Duncan, *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres.* International Journal of Pharmaceutics, 1997. **148**(2): p. 231-240.
124. Nadesh R, N.D., P R S, Vadakumpully S, Mony U, Koyakkutty M, Nair SV, Menon D, *Hematotoxicological analysis of surface-modified and -unmodified chitosan nanoparticles.* J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(10):2957-66.
125. Banerjee, N., et al., *Functional alteration of a dimeric insecticidal lectin to a monomeric antifungal protein correlated to its oligomeric status.* PloS one, 2011. **6**(4): p. e18593.
126. Stavitsky, A.B. and C. Jarchow, *Micromethods for the study of proteins and antibodies: I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells.* The journal of immunology, 1954. **72**(5): p. 360-367.

127. Fernandes, J.C., et al., *Effects of chitooligosaccharides on human red blood cell morphology and membrane protein structure*. *Biomacromolecules*, 2008. **9**(12): p. 3346-3352.
128. NCL, *Method ITA-2.2. Analysis of Platelet Aggregation by Light Transmission Aggregometry*. *Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick*, <http://ncl.cancer.gov/>. 2015.
129. Chou, T.-C., et al., *Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003. **302**(3): p. 480-483.
130. Jesus, S., et al., *Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020. **8**: p. 100.
131. Li, X., et al., *Platelet compatibility of PLGA, chitosan and PLGA–chitosan nanoparticles*. *Nanomedicine*, 2009. **4**(7): p. 735-746.
132. Sonin, D., et al., *Biological safety and biodistribution of chitosan nanoparticles*. *Nanomaterials*, 2020. **10**(4): p. 810.
133. Bahramzadeh, E., E. Yilmaz, and T. Adali, *Chitosan-graft-poly (N-hydroxy ethyl acrylamide) copolymers: Synthesis, characterization and preliminary blood compatibility in vitro*. *International journal of biological macromolecules*, 2019. **123**: p. 1257-1266.
134. Bertholon, I., C. Vauthier, and D. Labarre, *Complement activation by core–shell poly (isobutylcyanoacrylate)–polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide*. *Pharmaceutical research*, 2006. **23**(6): p. 1313-1323.
135. Suzuki, Y., et al., *Influence of the chain length of chitosan on complement activation*. *Carbohydrate polymers*, 2003. **54**(4): p. 465-469.
136. Suzuki, Y., et al., *Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation*. *Carbohydrate Polymers*, 2000. **42**(3): p. 307-310.
137. Marchand, C., et al., *C3, C5, and factor B bind to chitosan without complement activation*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2010. **93**(4): p. 1429-1441.
138. Elsabahy, M. and K.L. Wooley, *Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity*. *Chemical Society Reviews*, 2013. **42**(12): p. 5552-5576.
139. Dobrovolskaia, M.A., D.R. Germolec, and J.L. Weaver, *Evaluation of nanoparticle immunotoxicity*. *Nature nanotechnology*, 2009. **4**(7): p. 411-414.
140. Magalhães, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review*. *J Pharm Pharm Sci*, 2007. **10**(3): p. 388-404.
141. Hoemann, C. and D. Fong, *Immunological responses to chitosan for biomedical applications*. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, 2017: p. 45-79.
142. Han, H., et al., *In vivo stepwise immunomodulation using chitosan nanoparticles as a platform nanotechnology for cancer immunotherapy*. *Sci Rep [Internet]*. 2016, Nature Publishing Group.
143. Wu, N., et al., *Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264. 7 macrophages*. *Marine drugs*, 2015. **13**(10): p. 6210-6225.
144. Bueter, C.L., et al., *Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan*. *The Journal of immunology*, 2014. **192**(12): p. 5943-5951.
145. Fong, D. and C.D. Hoemann, *Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage*. 2017, Future Science.

146. ICH, *Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals S8*. September 2005. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>.
147. Guideline, I.H.T. *Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6 (R1)*. in *Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. 2011.
148. NCL, *Method ITA-9.1. Phagocytosis Assay*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
149. NCL, *Method ITA-9.2. In vitro assay for assessing nanoparticle effects on monocyte/macrophage phagocytic function*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
150. NCL, *Method ITA-6.1. Leukocyte Proliferation Assay*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
151. NCL, *Method ITA-11. Measurement of Nanoparticle Effects on Cytotoxic Activity of NK Cells by Label-Free RT-CES System*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
152. Rodrigues, S., et al., *Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery*. Journal of functional biomaterials, 2012. **3**(3): p. 615-641.
153. ASTM, *E2526. Standard Test Method for Evaluation of Cytotoxicity of Nanoparticulate Materials in Porcine Kidney Cells and Human Hepatocarcinoma Cells*. ASTM International, www.astm.org. 2008 (2013).
154. ISO, *10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. www.iso.org. 2009.
155. Sarangapani, S., et al., *Chitosan nanoparticles' functionality as redox active drugs through cytotoxicity, radical scavenging and cellular behaviour*. Integrative biology, 2018. **10**(5): p. 313-324.
156. Khanna, P., et al., *Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death*. Nanomaterials, 2015. **5**(3): p. 1163-1180.
157. Hellack, B., et al., *Analytical methods to assess the oxidative potential of nanoparticles: a review*. Environmental Science: Nano, 2017. **4**(10): p. 1920-1934.
158. NCL, *Method GTA-7, Hepatocyte Primary ROS Assay*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2010.
159. Bor, G., et al., *Cytotoxic and cytostatic side effects of chitosan nanoparticles as a non-viral gene carrier*. International journal of pharmaceutics, 2016. **513**(1-2): p. 431-437.
160. Zaki, S.S.O., H. Katas, and Z. Abd Hamid, *Lineage-related and particle size-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles on mouse bone marrow-derived hematopoietic stem and progenitor cells*. Food and Chemical Toxicology, 2015. **85**: p. 31-44.
161. Hu, Y.-L., et al., *Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 3351.
162. Sherwood, L., *The blood vessels and blood pressure, chapter 10 in Human physiology: from cells to systems*. 2015: Cengage learning.
163. Boscá, L., et al., *Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate*. Toxicology, 2005. **208**(2): p. 249-258.
164. Lechner, M., P. Lirk, and J. Rieder. *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin*. in *Seminars in cancer biology*. 2005. Elsevier.

165. NCL, *Method ITA-7, Detection of Nitric Oxide Production by the Macrophage Cell Line RAW264.7*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2015.
166. Jeong, H.-J., et al., *Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor- κ B activation*. International journal of immunopharmacology, 2000. **22**(11): p. 923-933.
167. Yoon, H.J., et al., *Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **358**(3): p. 954-959.
168. Zhu, J., et al., *Inhibitory effects of oligochitosan on TNF- α , IL-1 β and nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 cells*. Molecular medicine reports, 2015. **11**(1): p. 729-733.
169. Qiao, Y., et al., *Chitosan oligosaccharides suppressant LPS binding to TLR4/MD-2 receptor complex*. Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(2): p. 405-411.
170. Pattani, A., et al., *Immunological effects and membrane interactions of chitosan nanoparticles*. Molecular pharmaceutics, 2009. **6**(2): p. 345-352.
171. NCL, *Method GTA-3. Hep G2 Hepatocyte Glutathione Assay*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/> 2016.
172. NCL, *Method GTA-4. Hep G2 Hepatocyte Lipid Peroxidation Assay*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/> 2010.
173. Dobrovolskaia, M.A., *Pre-clinical immunotoxicity studies of nanotechnology-formulated drugs: Challenges, considerations and strategy*. Journal of Controlled Release, 2015. **220**: p. 571-583.
174. Crist, R.M., et al., *Common pitfalls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory*. Integrative Biology, 2013. **5**(1): p. 66-73.
175. Ginzburg, A.L., et al., *Synergistic toxicity produced by mixtures of biocompatible gold nanoparticles and widely used surfactants*. ACS nano, 2018. **12**(6): p. 5312-5322.
176. Fan, W., et al., *Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **95**: p. 258-265.
177. Owens, D.E. and N.A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*. International journal of pharmaceutics, 2006. **307**(1): p. 93-102.
178. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(6): p. 428-437.
179. Almalik, A., et al., *Hyaluronic acid coated chitosan nanoparticles reduced the immunogenicity of the formed protein corona*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-9.
180. Moraru, C., et al., *Understanding the factors influencing chitosan-based nanoparticles-protein corona interaction and drug delivery applications*. Molecules, 2020. **25**(20): p. 4758.

181. Tekie, F.S.M., et al., *Controlling evolution of protein corona: A prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-14.
182. NCL, *Method ITA-4. Analysis of Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins by 2D PAGE*. Nanotechnology Characterization Laboratory of the National Cancer Institute-Frederick, <http://ncl.cancer.gov/>. 2020.
183. Leroueil, P.R., et al., *Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers*. Nano letters, 2008. **8**(2): p. 420-424.
184. Hong, S., et al., *Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability*. Bioconjugate chemistry, 2006. **17**(3): p. 728-734.
185. Ngo, D.-H., et al., *Biological effects of chitosan and its derivatives*. Food Hydrocolloids, 2015. **51**: p. 200-216.
186. Xie, W., P. Xu, and Q. Liu, *Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001. **11**(13): p. 1699-1701.
187. Tamer, T.M., et al., *Free radical scavenger activity of chitosan and its aminated derivative*. J. Appl. Pharm. Sci, 2016. **6**(4): p. 195-201.
188. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**(1): p. d12-d26.
189. Hirano, S., et al., *Differential regulation of IL-1 β and IL-6 release in murine macrophages*. Inflammation, 2017. **40**(6): p. 1933-1943.
190. Zito, G., et al., *Cellular models and assays to study NLRP3 inflammasome biology*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(12): p. 4294.
191. Fang, W., et al., *Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1663.
192. Jeong, H.S., et al., *Effect of space length of mannose ligand on uptake of mannosylated liposome in RAW 264.7 cells: In vitro and in vivo studies*. Journal of biomedical materials research Part A, 2014. **102**(12): p. 4545-4553.
193. Esteban, A., et al., *Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(34): p. 14270-14275.
194. Steele, C., et al., *The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of Aspergillus fumigatus*. PLoS pathogens, 2005. **1**(4): p. e42.
195. Dong, L., H.J. Wichers, and C. Govers, *Beneficial health effects of chitin and chitosan*. in Chitin and Chitosan: Properties and Applications, 2019: p. 145-167.
196. Zheng, B., et al., *Molecular weight-dependent immunostimulative activity of low molecular weight chitosan via regulating NF- κ B and AP-1 signaling pathways in RAW264.7 macrophages*. Marine drugs, 2016. **14**(9): p. 169.
197. Yang, Y., et al., *Immunostimulatory effects of Chitoooligosaccharides on RAW 264.7 mouse macrophages via regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways*. Marine drugs, 2019. **17**(1): p. 36.

198. Yang, Y., et al., *Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3 K/Akt signaling pathway*. International journal of biological macromolecules, 2018. **108**: p. 1310-1321.
199. Yang, Y., et al., *Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan activates RAW 264.7 macrophages through the MAPK and JAK-STAT signaling pathways*. Carbohydrate polymers, 2019. **205**: p. 401-409.
200. Chang, S.-H., et al., *Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW 264.7 macrophage model*. International journal of biological macromolecules, 2019. **131**: p. 167-175.
201. Ma, P., et al., *Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264. 7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**(4): p. 1391-1398.
202. Ahn, C.-B., et al., *Gallic acid-g-Chitosan modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264. 7 cells via NF- κ B, AP-1, and MAPK pathways*. Inflammation, 2016. **39**(1): p. 366-374.
203. Kim, J.-H., et al., *Sulfated chitosan oligosaccharides suppress LPS-induced NO production via JNK and NF- κ B inactivation*. Molecules, 2014. **19**(11): p. 18232-18247.
204. Xu, Q., et al., *The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264. 7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly N-acetylated chitooligosaccharide*. Carbohydrate polymers, 2017. **174**: p. 1138-1143.
205. Ravindranathan, S., S.G. Smith, and D.A. Zaharoff, *Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity*. Marine drugs, 2016. **14**(5): p. 91.
206. Da Silva, C.A., et al., *Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(6): p. 3573-3582.
207. Hadebe, S., F. Brombacher, and G.D. Brown, *C-type lectin receptors in asthma*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 733.
208. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(7): p. 465-479.
209. De Jong, L.A., et al., *Receptor–ligand binding assays: technologies and applications*. Journal of Chromatography B, 2005. **829**(1-2): p. 1-25.
210. Schlosser, A., et al., *Characterization of FIBCD1 as an acetyl group-binding receptor that binds chitin*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(6): p. 3800-3809.
211. Xiang, S., et al., *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*. Journal of controlled release, 2012. **158**(3): p. 371-378.
212. Behzadi, S., et al., *Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell*. Chemical Society Reviews, 2017. **46**(14): p. 4218-4244.
213. OECD, *OECD 490. In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test Using the Thymidine Kinase Gene*. OECD Organization for Economic Cooperation and Development <http://www.oecd.org/>. 2016.
214. OECD, *OECD 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. OECD Organization for Economic Cooperation and Development <http://www.oecd.org/>. 2016.
215. Low, P.S. and A.C. Antony, *Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(8): p. 1055-1058.

216. Turk, M.J., et al., *Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis*. *Arthritis & Rheumatism*, 2002. **46**(7): p. 1947-1955.
217. Hansen, M.F., et al., *Folic acid mediates activation of the pro-oncogene STAT3 via the Folate Receptor alpha*. *Cellular signalling*, 2015. **27**(7): p. 1356-1368.
218. Cheung, A., et al., *Targeting folate receptor alpha for cancer treatment*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 52553.
219. Frigerio, B., et al., *Folate receptors and transporters: biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases*. 2019, BioMed Central.

Annexe 1

Confirm co-authorship of submission to International Journal of Biological Macromolecules

em.ijbiomac.0.754551.64aea281@editorialmanager.com
<em.ijbiomac.0.754551.64aea281@editorialmanager.com>

on behalf of

International Journal of Biological Macromolecules <em@editorialmanager.com>

Thu 8/12/2021 12:27 PM

To: Elsa Patricia Rondon-Cavanzo <elsa.patricia.rondon-cavanzo@umontreal.ca>

This is an automated message.

Journal: International Journal of Biological Macromolecules

Title: Investigation of signaling pathways-induced by pegylated diethylaminoethyl-chitosan nanoparticles: are TLR-4 and C-type lectin receptors involved?

Corresponding Author: Dr Julio Fernandes

Co-Authors: Elsa Patricia Rondon; Francis Vallières; Houda Abir Benabdoun; Marcio José Tiera; Mohamed Benderdour

Manuscript Number:

Dear Elsa Patricia Rondon,

The corresponding author Dr Julio Fernandes has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for International Journal of Biological Macromolecules.

Submission Title: Investigation of signaling pathways-induced by pegylated diethylaminoethyl-chitosan nanoparticles: are TLR-4 and C-type lectin receptors involved?

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:

<https://www.editorialmanager.com/ijbiomac/l.asp?i=1503164&l=QC7JQC0Q>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to:

(1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at

Thank you,

International Journal of Biological Macromolecules

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/30181/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub:

<https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ijbiomac/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.