

Université de Montréal

**Nanotoxicité des points quantiques : Étude *in vitro* chez les cellules épithéliales
alvéolaires humaines A549**

par Myrella Bergeron-Prévost

Unité académique : Département de Biologie moléculaire, Faculté de Médecine

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Biologie
moléculaire**

Janvier 2015

© Myrella Bergeron-Prévost, 2015

Résumé en français

Les nanoparticules (NPs) sont définies comme des particules ayant au moins une dimension comprise entre 1 à 100 nanomètres. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* indiquent que les NPs pourraient constituer un risque potentiel pour la santé des personnes les synthétisant ou les manipulant lors de leur incorporation dans d'autres matériaux. La nanotoxicologie est un domaine de recherche émergent. Les propriétés physico-chimiques particulières des NPs sont responsables d'interférences non spécifiques entre les nanomatériaux et certains des composants des essais *in vitro* pouvant mener à de faux résultats. L'inhalation a été identifiée comme une voie d'exposition présentant un risque important de toxicité. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé la lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines, A549. Nous avons étudié chez cette lignée les conséquences de l'exposition aux points quantiques (PQs), NPs d'intérêt pour leurs applications potentielles en médecine (nanovecteur ou nanosonde). La mise au point des conditions expérimentales (interférence entre l'essai LDH et le milieu de culture) a permis de valider les essais de cytotoxicité MTS et LDH en présence des PQs. Nous avons montré que les PQs présentaient une cytotoxicité à court et long terme, et nous avons par la suite étudié un des mécanismes de toxicité potentielle, la mesure du cadmium (Cd^{2+}) libéré des PQs. Nous avons déterminé que la mesure du Cd^{2+} comportait plusieurs interférences qui invalident cet essai. En conclusion, notre étude a permis d'identifier des interférences qui remettent en question plusieurs conclusions d'études publiées qui n'ont pas vérifié l'existence de telles interférences.

Mots clés: nanoparticules, points quantiques, nanotoxicité, cytotoxicité, interférences, essais *in vitro* de cytotoxicité, mécanismes de toxicité.

Résumé en anglais

Nanoparticles (NPs) are defined as particles with a diameter ranging from 1 to 100 nm. Several studies have suggested or demonstrated that NPs are a health risk factor for workers handling nanomaterials or for the general population using products containing NPs. Nanotoxicology is a new field of research. The particular physicochemical properties of NPs have revealed unexpected interferences of these nanomaterials with components of cytotoxic assays leading to false positive or negative interpretations. Inhalation being one of the most potential risk of NPs exposures, in this project, *in vitro* experiments were performed with the human alveolar epithelial cell line A549. Quantum dots (QDs) have been selected over other NPs because of their potential applications in medicine as nanovectors or nanoprobes. We have first validated the use of nanocytotoxic assays (LDH and MTS with QDs), and found that LDH assay interacts with components of the cell culture medium. A protocol established to counteract this interference has allowed demonstrating that both short and long term exposures to QDs are cytotoxic. We next addressed the underlying mechanisms of QDs nanotoxicity by determining concentrations of free cadmium potentially released from QDs when interacting with cells. We found that the cadmium assay has several interferences which invalidated the use of this assay. In conclusion, our study has allowed to identify several interferences with that call into question conclusions of published studies which have not examined these potential interferences.

Keywords: nanoparticles, quantum dots, nanotoxicity, cytotoxicity, interferences, *in vitro* cytotoxic assays, mechanisms of toxicity.

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en anglais.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles	viii
Liste des abréviations.....	ii
Remerciements.....	ii
Introduction.....	1
1. Nanoparticules	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Classes de NPs et applications	2
1.3 Description et applications des PQs.....	6
1.4 Description des PQs de la compagnie Vive Nano.....	7
1.5 Voies d'expositions potentielles aux NPs	8
1.5.1 L'inhalation.....	8
1.5.2 L'ingestion	9
1.5.3 Le contact cutané	10
2. Nanotoxicologie.....	11
2.1 Cytotoxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des NPs de type NTCSPs, NTCMPs, fullerène et TiO ₂ 12	
2.2 Cytotoxicité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des NPs de type PQs	14
2.3 Interférences des NPs avec les essais de viabilité	20
2.4 Exposition aux NPs et normes de sécurité	21
3. Physiopathologie de l'asthme	22
3.1 Réactivité de l'épithélium de l'arbre trachéo-bronchique en fonction de la condition respiratoire	26
4. Modèles cellulaires pour l'étude des épithéliums de l'arbre trachéo-bronchique	28
4.1 Lignée cellulaire.....	28
5. Objectifs de recherche.....	30
5.1 Mise au point des mesures de nanotoxicité avec les PQs	30
5.2 Mécanismes de nanotoxicité des PQs	31
5.3 Nanotoxicité et pathologie respiratoire	32

6. Publication scientifique: Risk assessment of long-term exposure to coating quantum dots:	
<i>An in vitro</i> study	35
Matériel et Méthodes	52
Résultats	55
7. Publication scientifique: Suitability of cadmium assay for the determination of quantum dots nanotoxicity	59
Discussion	85
Conclusion	93
Perspectives.....	94
Sources documentaires.....	95

Liste des tableaux

Tableau I. Description des différentes classes de NPs.

Liste des figures

- Figure 1. Levels of LDH activity in the cell culture media as a function of the percentage of FBS. N=3
- Figure 2. Interference between low and high concentrations of QDs and FBS-free or 5 % FBS cell culture media. N=3
- Figure 3. Interference between low and high concentrations of QDs and LDH activity measurements. N=3
- Figure 4. Cytotoxicity of QDs in A549 human airway cells in response to short-term and long-term exposures. N=5
- Figure 5. Étude de l'interférence entre les PQs et l'essai MTS dans le milieu de culture contenant 5% FBS. N=3
- Figure 6. Activité mitochondriale des cellules A549 en réponse à l'exposition courte ou prolongée à de faibles et de fortes concentrations de PQs (essai MTS). N=3
- Figure 7. Interference between, either water, incomplete (0% FBS) or complete (5% FBS) cell culture medium and components of the cadmium kit. n=5
- Figure 8. Interference of various media with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. n=6
- Figure 9. Intrinsic fluorescence of Vive Nano QDs in different mediums. n=6
- Figure 10. Interference of CelLytic™ lysis buffer with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. n=3
- Figure 11. Comparison of effective cadmium concentrations *versus* calculated concentrations when using CelLytic™ as lysing buffer. n=3
- Figure 12. Interference of CHAPS Lysis Buffer with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. n=3
- Figure 13. Comparison of effective cadmium concentrations *versus* calculated concentrations when using CHAPS solution as lysing buffer. n=3

Liste des sigles

Å	Ångström
λ	Longueur d'onde
i.e.	<i>id es</i> , c'est-à-dire
$\mu\text{g/ml}$	Microgramme par millilitre

Liste des abréviations

A549	Lignée de cellules épithéliales alvéolaires de carcinome humain
ADAM33	<i>A disintegrin and metalloprotease 33</i>
ADHL	Acide dihydrolipoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Acide mercaptopropionique
B16F10	Lignée de cellules de mélanome murin
CD4 ⁺	Corécepteur <i>cluster of differentiation 4</i>
CD8 ⁺	Corécepteur <i>cluster of differentiation 8</i>
CdS	Sulfure de cadmium
CdSe	Séléniure de cadmium
CdTe	Tellurure de cadmium
CeO ₂	Dioxyde de cérium
CM	<i>Culture medium</i>
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
DW	<i>Deionized water</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FcεRI	Récepteur de haute affinité aux IgE
HeLa	Lignée de cellules d'adénocarcinome du col de l'utérus
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
IgE	Immunoglobuline E
IL-1β	Interleukine-1β
IMR-32	Lignée de cellules de neuroblastome
INF-γ	Interféron-gamma
InP	Phosphure d'indium

MCF-7	<i>Macrophage chemotactic factor-7</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein-2</i>
MUC-5	<i>Epithelial cell mucous-inducing gene 5</i>
N9	Lignée de cellules microgliales murines
NK	Cellules tueuses naturelles « <i>natural killer</i> »
NPs	Nanoparticules
NRK	<i>Rattus norvegicus kidney cells</i>
NTCSPs	Nanotubes de carbone à simple paroi
NTCMPs	Nanotubes de carbone à multiples parois
PbS	Sulfure de plomb
PbSe	Sélénure de plomb
PC12	Lignée de cellules de phéochromocytome de rat
PEG	Polyéthylène glycol
PQs	Points quantiques
RANTES	Chimiokine <i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
T _C 1	Lymphocyte T cytotoxique 1
T _H 1	Lymphocyte T auxiliaire 1 « <i>T_{Helper1} cells</i> »
T _H 2	Lymphocyte T auxiliaire 2 « <i>T_{Helper2} cells</i> »
TiO ₂	Dioxyde de titane
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
PCDH1	Protocadhérine 1
<i>Wnt</i>	<i>Wingless</i>
ZnS	Sulfure de zinc
ZnSe	Sélénure de zinc

Remerciements

L'appui que j'ai reçu tout au long de ma maîtrise par les gens qui m'ont côtoyée s'est avéré déterminant dans mon cheminement.

Ces trois dernières années, le personnel travaillant au centre de recherche à l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, notamment, Lucero Castellanos, Khadije Jizi, Ana Moga, Lyes Tabet, Karine Truflandier, Guillaume Grégoire et Mélanie Welman m'ont appuyée, aidée et encouragée dans tous mes projets. Sans eux, ma maîtrise n'aurait pas été aussi remarquable. Je vous remercie énormément pour ce soutien précieux.

Je remercie également mon directeur de recherche, le Dr. Karim Maghni qui m'a accepté dans son laboratoire et m'a permis de compléter cette prouesse académique.

Finalement, je prends le temps de souligner ma gratitude aux personnes de mon entourage, tout spécialement ma famille et mes amis(es) qui ont été là pour moi dans les moments les plus ardues, tout autant que dans les moments de réussite.

Mes objectifs atteints, je dois ce succès, en partie à toutes les personnes importantes à mes yeux, ainsi qu'à ma détermination et à ma persévérance.

Introduction

1. Nanoparticules

1.1 Généralités

Les nanotechnologies sont l'objet d'un intérêt considérable ces dernières années. Définie par Ferrari comme étant la science impliquant la manipulation de la matière fabriquée par l'homme à l'échelle nanométrique, les nanoparticules (NPs) possèdent au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Les NPs possèdent des propriétés qui résultent du fait de leur très petite dimension (Shvedova *et al.*, 2009) qui se situe entre les atomes et les molécules (Hoet *et al.*, 2004). La taille nanométrique de ces particules leur confère une grande aire de surface car la majorité des atomes les composants se retrouvent à leur surface. Ainsi, plus grande est l'aire de surface, plus grand sera le nombre d'atomes se trouvant au pourtour des NPs, leur allouant des propriétés réactives prééminentes par rapport à leurs homologues micrométriques (Yang *et al.*, 2008). De plus, de nombreuses autres propriétés comme la chimie de surface, la biodégradabilité, le nombre, la forme, la solubilité, la conductivité, la charge de surface, les composants chimiques, la présence d'une couche externe protectrice, leur confèrent des propriétés particulières telles que d'échapper au système immunitaire et la possibilité de traverser la barrière hémato-encéphalique (Yang *et al.*, 2008).

1.2 Classes de NPs et applications

Les NPs de l'environnement ont une origine naturelle ou industrielle (Slezakova *et al.*, 2013). Elles sont créées par différentes voies naturelles, soit par les formations atmosphériques, la végétation, les embruns marins, les éruptions volcaniques ou les feux de forêts (Slezakova *et al.*, 2013). Les activités humaines sont aussi responsables de la création de NPs telles la combustion des moteurs, les émissions industrielles (centrales électriques, incinérateurs et autres processus tels que la fusion, le chauffage et le soudage) et la production commerciale (Slezakova *et al.*, 2013). Les NPs utilisées dans ce projet ont été créées de façon commerciale et seront décrites ultérieurement.

Les NPs peuvent être classées selon plusieurs paramètres, tels que le nombre de dimensions à l'échelle nanométrique (une, deux ou trois), leur composition (une phase solide, deux phases solides ou des systèmes à phases multiples) ou leur processus de fabrication (gaz, liquide ou mécanique). La classification des différents types de NPs manufacturées peut se faire également selon leur composition chimique, incluant ainsi les (1) NPs à base de carbone, les (2) NPs constituées de métaux, les (3) NPs composées de matériaux semi-conducteurs (Lewinski *et al.*, 2008), ainsi que les (4) NPs composées de molécules organiques. Une description de chacune des classes de NPs manufacturées est résumée dans le **tableau I** (p.5).

La première catégorie de NPs inclut les **nanotubes de carbone** à simple (NTCSPs) ou à multiples parois (NTCMPs) et les fullerènes. Les nanotubes de carbone sont caractérisés par une forme cylindrique à une ou jusqu'à vingt couches de graphite (**tableau I**, p.5) (Tabet *et al.*, 2009). Ils possèdent un diamètre de l'ordre du nanomètre, mais peuvent mesurer jusqu'à plusieurs micromètres de longueur (Pacurari *et al.*, 2010; Shvedova *et al.*, 2009; Tabet *et al.*,

2009). Leurs particularités électriques, leur efficacité à conduire la chaleur et leur longueur inhabituelle sont des caractéristiques particulièrement prometteuses dans le domaine de la biomédecine pour le traitement du cancer, la bio-ingénierie et la thérapie génique (Firme et Bandaru, 2010; Tabet *et al.*, 2009) De plus, du fait de leur propriété fluorescente unique (émission près de l'infrarouge), les NTCSPs peuvent être utilisés en imagerie, notamment pour la détection de tumeurs (Liang et Chen, 2010).

Un autre membre de la première catégorie de NPs est le troisième allotrope du carbone (**tableau I**, p.5), le **fullerène** qui contient 60 atomes de carbone sous la forme d'un hexagone (Partha et Conyers, 2009). Afin de contrecarrer la propension à l'agrégation ainsi que l'insolubilité de ce type de matériau, des modifications chimiques tels que l'encapsulation avec des molécules d'eau, du monoxyde de carbone, de l'ammoniac ou du méthane ainsi que l'assemblage supra moléculaire de fullerènes avec d'autres molécules comme l'octaéthylporphyrine de zinc sont effectuées (Partha et Conyers, 2009; Vougioukalakis *et al.*, 2010). Une quantité d'applications pour ces NPs sont alors envisageables par ces modifications. Ainsi, les fullerènes possèdent des activités anti-virale contre le VIH, enzymatique inhibitrice et anti-apoptotique, en plus d'avoir une capacité d'agir comme agents neuro-protectifs ou antioxydants (Chawla *et al.*, 2010). Ils ont des applications biomédicales comme systèmes de transport de médicaments (nanovecteurs), et des applications non biologiques en tant que super-conducteurs ou catalyseurs (Chawla *et al.*, 2010).

La seconde classe de NPs inclut entre autres les NPs d'or, de **dioxyde de titane** (TiO₂) et de dioxyde de cérium (CeO₂) (**tableau I**, p.5). Les NPs d'oxyde de métal peuvent être composées d'une variété de métaux dont le titanium, le zinc, le cérium et l'aluminium (Johnston *et al.*, 2009). Les NPs de TiO₂ sont introduites dans plusieurs produits de consommation, tels que les

cosmétiques, les écrans solaires et les pâtes à dents (Long *et al.*, 2006; Xia, 2006). Le TiO₂ peut être retrouvé sous trois phases. La première est l'anatase, forme arrondie de cristaux de TiO₂ (Li, 2007). La seconde est le brookite qui est une forme de nanocristaux en plaquettes et la troisième, le rutile, est retrouvé sous la forme de tiges à l'échelle nanométrique (Li, 2007). Les formes rutile et anatase prédominent par rapport à la forme brookite (Johnston *et al.*, 2009).

Tableau I. Description des différentes classes de NPs.

Classes	Types	Composants	Applications des principales NPs
NPs à base de carbone	NTCSPs	Carbone (graphène)	Imagerie
	NTCMPs	Carbone (graphène)	Traitement du cancer Bio-ingénierie Thérapie génique
	Fullerène	Carbone	Agent neuro-protecteur Antioxydant Activité anti-virale Enzyme inhibitrice Anti-apoptotique
NPs constituées de métaux	NPs d'or	Or (Au)	Traitement du cancer (détection et diagnostique) Imagerie Microscopie
	NPs de TiO ₂	Titane et oxygène	Photocatalyseur Agent antimicrobien
	NPs de CeO ₂	Cérium et oxygène	Protection contre le stress oxydatif Catalyseur Luminescence
NPs composées de matériaux semi-conducteurs	PQs	Sélénure de cadmium Tellure de cadmium	Imagerie Nanosonde Nanovecteur
NPs composées de molécules organiques	NPs entourées de chitosane	Polymères de chitosane et TPP (anion tripolyphosphate)	Médication orale ou nasale Délivrance ciblée de médicament Thérapie génique

La troisième classe de NPs comprend les **points quantiques** (PQs) («*quantum dots*») qui peuvent être composés, notamment, de tellure de cadmium (CdTe) ou de sélénure de cadmium (CdSe) (Lewinski *et al.*, 2008). Les PQs étant l'objet de notre étude dans ce projet de recherche, le prochain paragraphe sera consacré à leur description détaillée.

1.3 Description et applications des PQs

Les PQs de type CdTe, CdSe, sulfure de cadmium (CdS), séléniure de plomb (PbSe), sulfure de zinc (ZnS) et séléniure de zinc (ZnSe) sont inclus dans le groupe II-VI des nanocristaux semi-conducteurs (Iga *et al.*, 2007; Lewinski *et al.*, 2008). Les PQs du groupe III-V sont généralement composés d'arséniure de gallium (GaAs), de nitrure de gallium (GaN), de phosphure d'indium (InP) ou d'arséniure d'indium (Lewinski *et al.*, 2008).

Les PQs de première (1^e) génération consistent uniquement en un noyau généralement composé de CdTe, de CdSe ou de ZnS (Lovrić, 2005). Le développement de PQs de deuxième (2^e) génération a mené à la fabrication de nombreuses couches externes protectrices, les plus répandues étant manufacturées de ZnS ou CdS (Pelley *et al.*, 2009). La surface externe des PQs peut être composée d'une unique couche protectrice ou de plusieurs concentriques (Su, 2009). Finalement, la modification du revêtement externe permet de modifier les PQs grâce à des groupements fonctionnels ou à la bioconjugation de molécules organiques qui permettent d'ajouter des molécules à la surface des PQs, par exemple des groupes thiols, des anticorps ou de l'acide mercaptopropionique (AMP) (Lewinski, 2008). Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé d'utiliser les PQs de la compagnie Vive Nano composés de CdTe qui sont entourés d'une couche protectrice externe de CdS.

Les PQs de type CdTe ou CdSe possèdent la propriété d'être des particules fluorescentes, de résister au photo-blanchiment, de posséder un large spectre d'absorption et d'émettre dans un étroit spectre d'excitation (Prasad *et al.*, 2010). La fluorescence des PQs composés de matériaux semi-conducteurs binaires est fonction de la taille et de la composition de leur noyau, ce qui permet d'exercer facilement un contrôle sur leur spectre d'émission. De plus, en

variant le revêtement qui entoure les PQs, la fluorescence peut être modifiée (Jamieson, 2007). Par exemple, l'ajout de phospholipides et de polymères à la surface externe des PQs de type CdSe/ZnS a pour conséquence l'augmentation de la taille, passant de 4-8 nm (fluorescence dans le bleu) à 20-30 nm (fluorescence dans le rouge) (Mednitz, 2005).

Tirant avantage de chacune des propriétés des PQs, des applications diverses ont été développées. Notamment, l'avantage des matériaux semi-conducteurs (CdSe ou CdTe) pour la fabrication des PQs peut être utilisé pour améliorer les capacités des transistors (Pelley *et al.*, 2009). Les propriétés fluorescentes sont profitables en imagerie *in vivo* puisque les PQs sont employés comme nanosondes pour le marquage tumoral ou cellulaire (Pelley *et al.*, 2009) pendant et après les interventions thérapeutiques (Diagaradjane *et al.*, 2008). Les PQs seront exploités aussi en tant que nanovecteurs injectés de façon intravasculaire dans l'organisme (Ferrari, 2005). Ces applications biomédicales sont des dispositifs d'intérêt pour le traitement du cancer puisqu'ils transportent et distribuent des agents thérapeutiques à des cibles de façon spécifique et efficace (Ferrari, 2005).

1.4 Description des PQs de la compagnie Vive Nano

Les PQs de la compagnie Vive Nano (Toronto, Ontario, Canada) de type CdTe sont entourés d'une couche externe protectrice composée de CdS. Les PQs sont en suspension dans une solution aqueuse prévenant l'agrégation, maintenue à un pH de 6 à 8. Leur taille oscille entre 1 et 10 nm. Le spectre d'excitation/émission des PQs est de 350/530nm. La pureté de la solution est de 97% en CdTe.

1.5 Voies d'expositions potentielles aux NPs

Que ce soit durant la fabrication ou la manipulation, la présence potentielle de NPs dans l'environnement et leur distribution respective selon les divers modes d'exposition ont été peu étudiées (Ostiguy *et al.*, 2006). Le métabolisme, l'excrétion ou les effets des NPs sur la santé ont également été très peu approfondis pour connaître la toxicocinétique des NPs (Ostiguy *et al.*, 2008). Il existe trois voies principales permettant l'entrée des NPs dans l'organisme humain, soit l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané.

1.5.1 L'inhalation

L'un des modes d'exposition est l'inhalation potentielle des NPs. Le potentiel d'aérosolisation des NPs demeure encore inconnu à ce jour (Pelley *et al.*, 2008). Étant en contact direct avec l'environnement, les poumons pourraient être la première porte d'entrée des NPs dans l'organisme (Yang *et al.*, 2008). Ainsi, l'inhalation pourrait engendrer une absorption importante de NPs dans l'organisme étant donné le contact intime entre le sang et l'air au niveau des alvéoles pulmonaires. De plus, une déposition pulmonaire des NPs pourrait avoir pour conséquence une dégradation possible des NPs étant donné leur contact avec le mucus et le surfactant pulmonaire (Yang *et al.*, 2008). Les particules de plus de vingt micromètres de longueur ne pouvant être phagocytées après leur déposition dans les voies respiratoires, elles seront alors éliminées lentement, persistant donc pour des mois, voir des années dans les poumons (Yang *et al.*, 2008). Or, la déposition pulmonaire prolongée pourrait engendrer une inflammation non spécifique et soutenue entraînant une fibrose pulmonaire (Yang *et al.*, 2008). Dans la possibilité d'être exposé par inhalation aux NPs, il faut également prendre en

considération que la distribution dans l'arbre trachéo-bronchique sera dépendante de la taille des NPs (Ostiguy *et al.*, 2006). Les plus petites nanoparticules ont tendance à se déposer dans les voies respiratoires supérieures (extra-thoracique et trachéo-bronchique) (Ostiguy, 2006). À l'opposé, les nanoparticules de tailles supérieures se déposent préférentiellement dans les voies respiratoires inférieures (au niveau alvéolaire) (Ostiguy, 2006). Ainsi, des particules inhalées peuvent se retrouver dans la circulation systémique et être distribuées dans divers organes (Ostiguy, 2006). Les conséquences physiologiques prédites, suite à l'exposition aux NPs, seront nombreuses telles que de l'inflammation au niveau systémique et des dommages aux systèmes nerveux et cardiovasculaires.

Une étude à l'effet que les NPs de carbone inhalées atteignent la circulation systémique a mis en évidence trois mécanismes possibles pour la translocation des NPs au niveau des alvéoles (Nemmar *et al.*, 2002). Il serait question d'un transport actif via la phagocytose et l'endocytose par les macrophages alvéolaires et les cellules endothéliales ou d'un transport passif par diffusion à travers la membrane. Étant donné la rapidité de translocation des NPs utilisées dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il pourrait être question d'un transport actif ou passif à travers des pores cytoplasmiques des cellules endothéliales ou via des interstices intercellulaires entre les cellules épithéliales (Nemmar *et al.*, 2002).

1.5.2 L'ingestion

L'ingestion est une voie d'exposition potentielle aux NPs. Étant donné que plusieurs sont éliminées sous forme de déchets, leur destin reste encore inconnu à ce jour et les NPs pourraient se retrouver en concentration croissante dans le sol et l'eau potable (Hagens *et al.*,

2007). De plus, les applications au niveau alimentaire seraient une voie supplémentaire pour l'ingestion hypothétique de NPs (Hagens *et al.*, 2007). De nombreux chercheurs mentionnent l'utilisation de NPs dans le domaine alimentaire, notamment comme additifs et agent aromatisant, mettant ainsi en évidence que leur ingestion est un mode d'exposition récent (Duncan, 2001; Hong *et al.*, 2008; Ostiguy *et al.*, 2008; Sozer et Koniki, 2009).

Il a été démontré que les NPs se retrouvant au niveau gastro-intestinal peuvent pénétrer l'organisme via les plaques de Peyer, les entérocytes ainsi que par la persorption (Hagens *et al.*, 2007). Ce processus correspond à la pénétration paracellulaire de particules intactes à travers la paroi intestinale jusque dans la circulation lymphatique et sanguine (Hagens *et al.*, 2007). De plus, il existe une possibilité que les NPs soient rejetées via le système excréteur ou accumulées dans les organes suite à l'ingestion orale (Hagens, 2007). L'ingestion de NPs de zinc chez le modèle de souris a été réalisée (Wang *et al.*, 2006). Des conséquences graves ont été observées au niveau rénal (lésions), intestinal (obstruction) et comportemental (léthargie) (Wang *et al.*, 2006). L'ingestion a même causée la mort d'animaux traités (Wang *et al.*, 2006), mettant de l'avant la nécessité de bien caractériser la toxicocinétique des NPs utilisées, notamment dans les produits alimentaires.

1.5.3 Le contact cutané

Il a été démontré *in vitro* que l'exposition cutanée à court terme était suffisante pour permettre à certaines NPs de traverser la couche épidermale superficielle de la peau porcine (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2006). Or, la flexion mécanique est déterminante dans la pénétration de l'ensemble des couches cellulaires de la peau par les NPs de type fullerène qui se retrouvent

alors dans la circulation systémique (Hagens, 2007; Rouse, 2007). Le contact direct avec les NPs causé par leur présence dans les cosmétiques (crème solaire à base de TiO₂) ainsi que dans les pansements antibactériens (à base de NPs d'argent) représente donc une voie d'absorption possiblement importante (Hagens *et al.*, 2007; Crosera *et al.*, 2009). Finalement, les expositions potentielles liées au milieu de travail pourraient inclure le contact cutané lors de la fabrication des NPs, de l'utilisation de pesticides ou de produits pharmaceutiques contenant des NPs (El-Ansary et Al-Daihan, 2009).

2. Nanotoxicologie

Malgré l'intérêt grandissant que suscite le développement des NPs, les propriétés uniques de ces nouveaux matériaux utilisés en nanomédecine ainsi que dans les milieux industriels soulèvent de nombreuses interrogations quant à leurs répercussions sur la santé humaine (Shvedova, 2009). Non seulement les répercussions sur la santé humaine ne sont pas encore bien cernées, mais également, les données liées à la nanoécotoxicologie sont soit limitées, hautement hypothétiques (concentrations de NPs retrouvées dans l'environnement) ou totalement inconnues (effets sur l'édaphon) (Scheringer, 2008). Dans les dix dernières années, seulement 2% des études sur les NPs ont porté sur la nanotoxicité (Shvedova *et al.*, 2010). Étant une discipline en émergence, la nanotoxicologie s'intéresse particulièrement aux risques associés aux NPs puisqu'elles sont retrouvées tant au niveau domestique dans les produits de consommations (écrans solaires, cosmétiques) (Nohynek *et al.*, 2007) qu'au niveau industriel

dans les usines de fabrication. De plus, les voies d'exposition potentielles aux NPs sont nombreuses (inhalation, ingestion et cutanée) (Pelley *et al.*, 2009). C'est pourquoi, des auteurs ont suggéré que les études de nanotoxicité soient basées sur l'induction du stress oxydatif, par la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), afin d'établir un standard permettant une comparaison du potentiel toxique des NPs (Shvedova *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2006). Il devient important de porter une attention particulière aux DRO mitochondriaux puisque de faibles niveaux sont associés à la prolifération et la différenciation cellulaires, alors que des niveaux intermédiaires permettent une adaptation ou une augmentation du « *fitness* » des organismes. Les standards devront donc tenir compte des niveaux plus élevés de DRO qui entraînent la sénescence ou encore la mort cellulaire (Hamanaka et Chandel, 2010).

2.1 Cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* des NPs de type NTCSPs, NTCMPs, fullerène et TiO₂

La cytotoxicité des NPs de TiO₂ a été démontrée. Des expositions *in vitro* à court terme (quarante-huit heures et moins) de cellules au TiO₂ ont démontré une augmentation de DRO, liée à une toxicité cellulaire, que ce soit en présence de particules fines, ultrafines, sous la forme anatase ou sous la forme rutile (Møller *et al.*, 2010). Également, des études *in vivo* chez la souris ont démontré la génération de réponses inflammatoires, de dommages pulmonaires ainsi que de la génotoxicité (Singh *et al.*, 2009).

Parmi les NPs à base de carbone, les NTCSPs ont fait l'objet de nombreuses études de nanotoxicité. Les NTCSPs non purifiés, c'est-à-dire en suspension dans des solutions contaminées par les métaux utilisés pour leur synthèse, démontraient une induction du stress

oxydatif ainsi qu'une production de DRO *in vitro* (Pacurari *et al.*, 2008, Tian *et al.*, 2006). Des études *in vivo* ont également été effectuées sur les NTCSPs, démontrant la biopersistance des nanotubes de carbone. Non seulement des NTCSPs ont été observés dans les macrophages et l'espace alvéolaire des souris quatre-vingt-dix jours après une instillation intratrachéale (Pacurari *et al.*, 2010), mais aussi dans les macrophages des tissus du foie et de la rate jusqu'à quatre mois après l'exposition (Schipper *et al.*, 2008). Les études sur les modèles de souris et de rats ont également mis en évidence la nanotoxicité en démontrant que les NTCSPs induisaient des réponses inflammatoires, une formation de granulomes et des mécanismes de mort cellulaire comme la nécrose (Pacurari *et al.*, 2010).

La cytotoxicité des NTCMPs est également soulevée dans la littérature où l'on compare ces derniers à l'amiante, vu leurs effets à induire de la fibrose pulmonaire (Pacurari *et al.*, 2010). Dans les études *in vitro* impliquant des NTCMPs, les différents types cellulaires exhibaient des réponses de stress ainsi que des désordres dans le métabolisme et les fonctions cellulaires dont le transport et les niveaux de protéines intracellulaires (Pacurari *et al.*, 2010). D'autres conséquences importantes ont également été observées *in vitro* dont des réponses inflammatoires et des effets génotoxiques (Pacurari *et al.*, 2010). Utilisant des NTCMPs dans des expériences *in vivo* (rats et souris), des chercheurs présentaient également des résultats de réponses inflammatoires, de biopersistance (soixante jours) et de formation de tumeurs (granulomes ou mésothéliomes) (Pacurari *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus dans les études *in vitro* sur les C₆₀ fullerènes indiquaient une production de DRO plus que doublée par rapport au contrôle (Harhaji *et al.*, 2007; Isakovic *et al.*, 2006;

Jacobsen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009), indiquant l'induction du stress oxydatif ainsi que des effets génotoxiques (Møller *et al.*, 2010). Les études *in vivo* ont démontré une inflammation aiguë et transitoire des voies respiratoires suite à une exposition aux C₆₀ fullerènes (Møller *et al.*, 2010; Shvedova *et al.*, 2005; Warheit *et al.*, 2004).

2.2 Cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* des NPs de type PQs

Les PQs peuvent pénétrer la cellule et ce, par des voies spécifiques ou non (Prasad *et al.*, 2010). Parmi les mécanismes connus, l'entrée de NPs dans la cellule peut s'effectuer par endocytose, phagocytose ou pinocytose (Jungkyun *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010). Des hypothèses sont également émises à l'effet que l'utilisation d'autres mécanismes pour l'entrée de NPs dans la cellule seraient possibles. Il a aussi été proposé que l'endocytose médiée par les clathrines serait la voie d'entrée privilégiée des PQs et que la progression intracellulaire pourrait se faire au niveau des endosomes, des lysosomes ou par fuite du système endolysosomal afin d'atteindre le cytosol (Delehanty *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010).

La pinocytose comporte deux catégories, la macropinocytose et la micropinocytose (Xiao *et al.*, 2010) La micropinocytose serait la voie d'accès au milieu intracellulaire privilégiée par les petites particules (Xiao *et al.*, 2010). La micropinocytose regroupe trois catégories soient l'endocytose médiée par les clathrines, l'endocytose médiée par les cavéolines ainsi que l'endocytose indépendante des clathrines et cavéolines (Xiao *et al.*, 2010). Il est suggéré que les NPs ayant une taille d'environ 120 nm pourraient entrer préférentiellement par la première catégorie de micropinocytose, les NPs d'environ 60 nm entreraient par la voie médiée par les

cavéolines et que les NPS de taille d'environ 90 nm utiliseraient la voie indépendante de ces protéines. Des études effectuées avec des kératinocytes humains ont démontré que la macropinocytose n'était pas une voie possible d'absorption des PQs (Xiao *et al.*, 2010), alors que d'autres études ont démontré que l'opposé est peu fréquent, mais possible, par exemple chez les cellules HeLa avec des PQs sous forme de complexe (Gomes *et al.*, 2001; Jungkyun *et al.*, 2011).

Les applications envisagées des PQs dans le traitement du cancer, notamment en tant que nanovecteurs et nanosondes, mettent en évidence que le mode d'exposition aux PQs sera généralement par injection. Les PQs se retrouvant dans l'organisme (souris) par suite d'une injection ont une tendance à quitter la circulation systémique, se déposer et persister au niveau de certains organes, qui sont généralement la rate et le foie (Gao *et al.*, 2008). Le patron de déposition dans les organes dépend de la taille des PQs, du temps écoulé depuis l'entrée des PQs dans la circulation ainsi que du mode d'exposition (Ostiguy *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2008). Ce dernier facteur implique que la déposition se fera préférentiellement dans certains organes suite à une injection intraveineuse tandis qu'une injection sous-cutanée induira un profil de déposition différent. Considérant la localisation différentielle des PQs selon le mode d'exposition, il a été rapporté que certains PQs avaient également la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique dans le cas d'une administration intranasale (Gao *et al.*, 2008).

Afin de quantifier la nanotoxicité de ce type de NPs, de nombreuses études *in vitro* (cellules de glandes mammaires cancéreuses, leucémiques, rénales, intestinales, neuronales, ou épidermales) et *in vivo* (souris principalement) ont été effectuées pour démontrer la

cytotoxicité potentielle associée aux PQs. Des essais de viabilité (MTS et MTT) et de mortalité (LDH, Bleu trypan, microscopie à fluorescence et puces à ADN) ont été utilisés dans les études *in vitro* pour quantifier l'action toxique des PQs. D'autres types d'essais ont été réalisés pour mesurer les réponses cellulaires suite aux expositions comme le relâchement d'ions cadmiums du noyau ou des couches externes des PQs pour expliquer l'action cytotoxique de ces NPs. De plus, la mesure de la production de chimiokines ou de cytokines comme marqueurs d'une réponse inflammatoire induite par les PQs a aussi été déterminée (Hardman, 2006; Pelley *et al.*, 2009). L'utilisation de la microscopie, d'observations histologiques (histopathologie), de mesures comportementales, d'analyses d'urine ou d'évaluation de la locomotion ont notamment été effectuées lors des essais *in vivo* avec les PQs (Lewinski *et al.*, 2008; Pelley *et al.*, 2009).

Les études sur les PQs de première génération, i.e. les PQs non modifiés de type CdTe ont démontrés une toxicité importante pour les cellules PC12 (phéochromocytome de rat) et N9 (microgliale murine) à une concentration aussi faible que 10µg/ml, comparativement aux PQs du même type possédant une couche protectrice d'AMP (Lovrić *et al.*, 2005). Dans cette même étude la cytotoxicité des PQs de type CdTe a été associée à la libération des ions cadmiums du noyau (Lovrić *et al.*, 2005). La cytotoxicité des ions cadmiums a été démontrée par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Hossain *et al.*, 2009; Kondoh *et al.*, 2002; Lòpez *et al.*, 2003; Wätjen *et al.*, 2002). Ainsi, des hypothèses émises à l'effet que l'action toxique des PQs serait issue de la libération d'ions cadmiums ont été vérifiées par l'utilisation de N-acétylcystéine (NAC), un inhibiteur de toxicité causée par le cadmium, qui réduisait significativement la nanotoxicité des PQs de type CdTe (Lovrić *et al.*, 2005). Il est à noter que

l'utilisation de NAC augmente les niveaux intracellulaires de glutathion (protège la cellule des radicaux libres) qui confère au NAC son pouvoir antioxydant non spécifique envers les ions cadmium (Xue, 2011). Également, il a été démontré que le NAC a aussi la capacité de former un complexe avec le cadmium, ce qui réduit l'absorption du cadmium dans les cellules ainsi que la cytotoxicité des ces ions métalliques (Jalilehvand, 2011; Luczak, 2013).

Des auteurs ont souligné l'importance des propriétés physico-chimiques des PQs dans leurs mécanismes de nanotoxicité (Su *et al.*, 2010). Cette hypothèse fut vérifiée en démontrant la toxicité moindre des ions cadmiums contenu dans les molécules de CdCl₂ que ceux contenu dans des PQs de type CdTe (Su *et al.*, 2010). La taille étant également un facteur à considérer, puisque certains auteurs ont relevé une localisation nucléaire ou cytosolique des PQs de 2.2 nm et 5.2 nm respectivement (Lovrić *et al.*, 2005). D'autres études *in vitro* ont également démontré la nanotoxicité des PQs de type CdSe, notamment sur les cellules IMR-32 où l'apoptose était induite, ainsi que chez des hépatocytes isolés de rats où la viabilité cellulaire a été significativement réduite (Chan *et al.*, 2006; Derfus *et al.*, 2004). Une autre étude a mis en évidence d'autres mécanismes de toxicité des PQs de type CdTe enrobé d'AMP avec l'utilisation de la lignée tumorale de cellules humaines MCF-7 (Lovrić *et al.*, 2005b). Il a été démontré chez les MCF-7 que l'exposition à ces PQs induisait des dommages membranaires (plasmique, nucléaire et mitochondrial) causant la production de DRO ainsi que le relâchement de cytochrome c dans le cytosol (Lovrić *et al.*, 2005b). Une hypothèse émise par ces auteurs indiquait que la dégradation de la couche d'AMP était possiblement la cause des dommages cellulaires (Lovrić *et al.*, 2005b). Cette étude fait aussi mention des études *in vitro* montrant que les PQs de type CdSe causent des dommages cellulaires tels que la formation

d'oxygène sous forme singulet, de DRO et des ruptures dans la molécule d'ADN (Lovrić *et al.*, 2005b). Ces sources de stress (oxydatifs et génotoxiques) peuvent également avoir des conséquences encore plus graves en enclenchant des mécanismes de mort cellulaire (Lovrić *et al.*, 2005b). Des auteurs ont également montré l'existence d'une atteinte relative des cellules du système immunitaire dans une étude menée avec des PQs de type CdTe (Nguyen *et al.*, 2012). Des lignées, notamment de macrophages, ont été exposées à des PQs de type CdTe préalablement à *Pseudomonas aeruginosa* (Nguyen *et al.*, 2012). Les défenses immunitaires étaient alors affectées et les auteurs mentionnaient que le recrutement de neutrophiles ne s'effectuerait probablement pas comme il se doit *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2012). Il faut noter que toutes ces études ont été réalisées à court terme (vingt-quatre heures d'incubation) et qu'elles démontrent l'action cytotoxique des PQs de première génération.

Le développement de couches protectrices externes avait pour but de minimiser la cytotoxicité et maximiser la stabilité des PQs (Chang *et al.*, 2006). Plusieurs études *in vitro* ont démontré les effets négligeables des PQs de type CdSe/ZnS enrobés, notamment d'acide dihydrolipoïque (ADHL), sur la viabilité ainsi que sur la croissance cellulaire des lignées HeLa (Jaiswal *et al.*, 2003) ou B16F10 (Voura *et al.*, 2004). De nombreuses études ont également démontré la diminution de la libération de cadmium et de la toxicité à court terme par l'ajout de couches protectrices externes (CdS ou ZnS) et de revêtement comme le polyéthylène glycol (PEG) (Chang *et al.*, 2006; Hoshino *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). De plus, des essais *in vitro* ont établi que les PQs de type CdTe pouvaient induire des changements dans le métabolisme (PC12), sans toutefois entraîner la mort cellulaire, à des concentrations faibles, et ce, même après des temps d'incubations prolongés (vingt-quatre à soixante-douze heures) (Prasad *et al.*, 2010; Przybytkowski *et al.*, 2009). Les auteurs ont donc

émis l'hypothèse que cette protection était concédée par la couche externe des PQs composée de gélatine et d'acide thioglycolique (Prasad *et al.*, 2010) ou de ZnS (Przybytkowski *et al.*, 2009). Des données *in vivo* recueillies sont en accord avec les résultats *in vitro* puisqu'elles démontrent aussi que même les plus fortes concentrations de PQs de type CdSe/ZnS n'ont pas d'effets toxiques notables dans le modèle animal de rat, et ce jusqu'à quatre-vingt jours après l'injection (Hauck *et al.*, 2010).

Malgré ces résultats encourageant, il n'en reste pas moins que de nombreuses études ont démontré l'action toxique des PQs de deuxième génération. Notamment, une étude ayant utilisé les cellules NRK, une lignée de fibroblastes sensibles aux ions métalliques dont le cadmium, a démontré l'effet toxique de ces cations libérés des PQs de type CdSe ou CdSe/ZnS *in vitro* (Kirshner *et al.*, 2005). Les résultats ont indiqué que l'exposition à de faibles concentrations de cadmium provoquait le détachement des cellules NRK. De plus, les cellules en suspension, encore vivantes, entraient éventuellement dans un mécanisme de mort cellulaire par apoptose (Kirshner *et al.*, 2005). Toutefois, l'incubation des cellules NRK en présence de concentrations élevées de cadmium entraînait une mort cellulaire par nécrose, alors que les cellules étaient encore adhérentes au substrat (Kirshner *et al.*, 2005). Les PQs de deuxième génération ont aussi fait l'objet d'études de nanotoxicité *in vivo*. Une étude a révélé que les fortes doses de PQs de type CdSe/ZnS avaient des effets prothrombotiques et pouvaient entraîner la mort immédiate chez le modèle animal murin suite à des injections intraveineuse (Geys *et al.*, 2008).

En conclusion, la toxicité des PQs peut être influencée par différents facteurs, dont la taille, la charge, la concentration, la bioactivité de la couche externe protectrice et les mécanismes

photolytiques et oxydatifs (Hardman, 2006). L'importance de la biopersistence des PQs a également été soulevée dans une étude puisqu'il était possible d'observer des PQs au niveau des ganglions lymphatiques et de la moelle épinière cent trente-trois jours après l'injection intraveineuse initiale chez la souris (Hardman, 2006). Aussi, malgré le fait que des études à court terme *in vitro* et *in vivo* aient démontré une absence de cytotoxicité (Ballou *et al.*, 2004; Hanaki *et al.*, 2003; Larson *et al.*, 2003; Voura *et al.*, 2004), il n'en reste pas moins que de nombreuses études ont observé une nanotoxicité significative et que les effets sur de nombreux autres organes et systèmes restent encore à être étudié (Lewinski *et al.*, 2008; Ostiguy *et al.*, 2008). Ces faits mettent donc en évidence l'importance des études en nanotoxicologie sur les PQs avant leur utilisation en biomédecine. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons étudié la nanotoxicité potentielle de PQs de deuxième génération de la compagnie Vive nano chez une lignée humaine de pneumocytes de type II, les cellules A549.

2.3 Interférences des NPs avec les essais de viabilité

La caractérisation complète des NPs et la validation des essais de cytotoxicité s'avèrent être des étapes importantes en nanotoxicologie. Des études ont démontré l'existence d'interactions entre plusieurs NPs et des composants du milieu de culture (Asha Jhonsi *et al.*, 2009; Casey *et al.*, 2007a; Casey *et al.*, 2007b; Casey *et al.*, 2008; Naveenraj *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2009). Une attention particulière a par la suite été portée vers l'interaction possible des NPs avec les essais de viabilités *in vitro*. Subséquemment, l'utilisation de l'essai MTT a été invalidée avec les NTCSPs. L'interaction entre cet essai et ces NPs spécifiques a été démontré par l'inexactitude et la variabilité des résultats obtenus (Wörle-Knirsch *et al.*, 2006). L'utilisation

de l'essai MTT permet de quantifier les cellules métaboliquement actives puisqu'elles transforment enzymatiquement les sels de tétrazolium (MTT) en formazan et que la formation de formazan, mesurée par spectrophotométrie, est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Belyanskaya, 2007). Un article a spécifiquement étudié l'interaction entre cet essai et les NTCSPs afin d'en démystifier les mécanismes (Belyanskaya, 2007). Il a été démontré, en absence de cellules, que la réduction des sels de tétrazolium en MTT se produisait de façon non enzymatique par les NTCSPs (Belyanskaya, 2007). D'ailleurs, l'utilisation de l'essai MTT a aussi été invalidé lors d'études sur les NTCMPs et les C₆₀ fullerènes (Monteiro-Rivière *et al.*, 2009; Simon-Deckers *et al.*, 2008). Malgré la disponibilité de nombreux tests de viabilité, plusieurs (Bleu Alamar®, Bleu Commassie®, Rouge Neutre, CytoTox One™, MTS et WST-1) ont été identifiés comme inappropriés dans l'étude des NPs de type NTCSPs (Casey *et al.*, 2007b; Monteiro-Rivière *et al.*, 2009; Simon-Deckers *et al.*, 2008). Finalement, les PQs ont fait l'objet d'analyses et il s'est avéré que les essais Rouge Neutre et MTT sont invalides lors de l'évaluation de la viabilité suite à des exposition aux PQs puisque les résultats sont significativement sous-évalués (Monteiro-Rivière *et al.*, 2009).

2.4 Exposition aux NPs et normes de sécurité

L'émergence de la nanotoxicologie a permis d'accroître le nombre d'études sur les risques associés aux NPs. Malgré le nombre croissant de publications sur chacune des classes de NPs, les lacunes quant aux connaissances en nanotoxicologie sont encore considérables. L'absence d'essais standardisés permettant des études comparatives entre les chercheurs du monde entier est encore à ce jour un facteur limitant dans les études de toxicité. La population générale

utilisant des produits contenant des NPs (crème solaire, pansements et autres produits de consommation) ainsi que les travailleurs œuvrant dans les usines de fabrication de NPs sont de plus en plus sujet à l'exposition aux différentes classes de NPs. À ce jour, il n'existe aucune norme de sécurité quant à la manipulation des NPs. De plus, il n'existe aucune donnée sur le fait qu'une personne atteinte d'un problème respiratoire (e.g. asthme) ou de tabagisme soit plus sensible à l'action cytotoxique des NPs. Il est donc impératif pour le travailleur et la population en général de définir des normes relatives à la toxicité des différentes classes de NPs et de prendre en compte la condition respiratoire dans l'établissement de ces normes.

Le but initial de ce projet était de définir l'existence potentielle d'une telle sensibilité car la thématique de recherche du laboratoire porte aussi sur l'étude des mécanismes de la pathogénèse de l'asthme. Ainsi, nous décrirons brièvement cette pathologie respiratoire.

3. Physiopathologie de l'asthme

L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité bronchique non-spécifique (Sumi et Hamid, 2007) et par une obstruction réversible des voies respiratoires attribuable en partie à une production excessive de mucus par les cellules de Clara (Holgate, 2007). L'asthme se distingue également par une inflammation bronchique chronique suivi le plus souvent par un processus de remodelage des voies respiratoires; ce dernier étant plus ou moins important selon la sévérité de la maladie. La problématique du remodelage des voies respiratoires chez les sujets asthmatiques, tout comme les patients atteints de MPOC, vient du fait que le remodelage est chronique et associé à une altération de la structure et de la fonction des tissus

(Jeffery, 2001). Les interactions réciproques entre les différents types cellulaires présents (principalement cellules épithéliales, musculaires lisses et fibroblastes) et ayant infiltré les voies respiratoires (principalement lymphocytes T CD4⁺, éosinophiles, mastocytes, cellules dendritiques, neutrophiles et basophiles) ont un rôle déterminant dans l'induction de la chronicité de l'inflammation et le processus de remodelage. De plus, une augmentation du nombre de cellules musculaires lisses bronchiques conjointement à un épaississement de la paroi des voies respiratoires ont été démontré chez les asthmatiques comparativement aux sujets témoins (Holgate, 2007). L'augmentation du nombre de cellules musculaires lisses bronchiques semble associée à la fois à une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire (Sumi et Hamid, 2007; Ramos-Barbón *et al.*, 2005).

L'intensité de l'inflammation bronchique et le remodelage des voies respiratoires retrouvés chez les sujets asthmatiques résulteraient en partie de réparations cellulaires incomplètes suite à des dommages épithéliaux (Holgate, 2007). Ces dommages cellulaires sont causés, entre autres choses, par la présence d'éosinophiles qui relâchent leurs granules cytotoxiques et induisent la production de DRO (Holgate, 2007). Les dommages épithéliaux peuvent aussi être aggravés par la présence d'agents nuisibles physiques, chimiques et biologiques retrouvés dans l'air inhalé, comme des gaz irritants, de la poussière et des microorganismes (Holgate, 2007). En réponse à ces agressions, les cellules épithéliales produisent de façon exagérée de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines (éotaxine-1, IL-5, RANTES, MCF « *macrophage chemotactic factor* » et TSLP « *Thymic stromal lymphopoietin* »), les chimiokines (« *CXC-chemokine ligand* » (CXCL): CXCL9, CXCL10 et CXCL11) et certains facteurs de croissance (facteur de croissance épidermique (EGF), amphiréguline, facteur

fibroblastique de croissance 1 et 2, facteur de croissance dérivé des plaquettes, neurotrophines (ex : facteur de croissance des nerfs), facteur de croissance endothéliale vasculaire, facteur de croissance ressemblant à EGF se liant à l'héparine et facteur de croissance apparenté à l'insuline) (Barnes, 2008; Holgate, 2007).

Les cytokines principalement surexprimées dans la pathologie de l'asthme sont l'interleukine (IL-) -4 (IL-4), IL-5 et IL-13 produites par les lymphocytes CD4⁺ de type T_H2 (cellules T_H2) (Chung, 2001) et les basophiles (Barnes, 2008). L'implication de l'IL-4 et de l'IL-13 est fondamentale dans la réaction d'hypersensibilité liée à la production d'immunoglobulines E (IgE) spécifiques à chaque type d'allergène (Oettgen et Geha, 2001). En effet, la différenciation des cellules B en plasmocytes sécrétant des IgE spécifiques est une cascade moléculaire dépendant de l'action de ces cytokines (Barnes, 2008; Yssel *et al.*, 1998). La reconnaissance de l'allergène par des IgE spécifiques liés à leur récepteur de haute affinité, le FcεRI, exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles forme un complexe qui induit le relâchement de médiateurs vasoactifs, la transcription de cytokines et la synthèse de leucotriènes et de prostaglandines (Oettgen et Geha, 2001). L'implication de la cytokine IL-5 dans l'asthme a été soulevée. En effet, il a été démontré que l'IL-5 permettait le soutien pour la croissance et la différenciation des cellules B activées (Takatsu et Nakajima, 2008). Également, le recrutement des éosinophiles par l'expression de ce médiateur inflammatoire a été l'objet d'études antérieures (Takatsu et Nakajima, 2008).

Conséquemment, chez le sujet asthmatique la libération chronologique de ces divers médiateurs conduit à une obstruction aiguë des voies respiratoires caractérisée par une

contraction des cellules musculaires lisses et une production plus importante de mucus (réponse immédiate) (Holgate, 2007). Cette réponse aigüe est renversée au cours du temps ou suite à la prise de broncho-relaxants comme les β_2 agonistes (Dickey *et al.*, 2010). Une deuxième phase d'obstruction des voies respiratoires plus tardive suit le plus souvent la phase aigüe (réponse semi-retardée) (Holgate, 2007). Elle se traduit par un recrutement de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires suivi par une obstruction des voies respiratoires selon les deux mécanismes décrits ci-haut (Charlesworth *et al.*, 1989; Jeffery, 2001; Oettgen et Geha, 2001).

L'implication de l'épithélium bronchique dans le processus inflammatoire a majoritairement été démontré par l'étude histologique de biopsies réalisées à l'aide de plusieurs techniques (Jeffery *et al.*, 1989; Puddicombe *et al.*, 2000). Notamment, des colorations pour évaluer la mort cellulaire, l'immunohistochimie pour déterminer par exemple la quantité de protéines de la MEC comparativement au contrôle ainsi que l'utilisation de la microscopie (optique ou électronique) pour observer les changements morphologiques des cellules (Jeffery *et al.*, 1989; Puddicombe *et al.*, 2000). Il existe encore d'autres méthodes comme l'analyse des expectorations et des lavages broncho-alvéolaires pour quantifier la production de mucus, pour identifier les types cellulaires et leur abondance relative (Dabbagh *et al.*, 1999; Erjefalt, 1997). Également, des études *in vitro* (lignées cellulaires immortalisées) ou *in vivo* (cochon d'inde, souris) ont permis de mesurer plusieurs paramètres comme la production de cytokines et la prolifération cellulaire (Dabbagh *et al.*, 1999; Erjefalt, 1997).

3.1 Réactivité de l'épithélium de l'arbre trachéo-bronchique en fonction de la condition respiratoire

Dans la pathologie de l'asthme, l'épithélium bronchique orchestre l'inflammation perpétuelle ainsi que le remodelage important des voies respiratoires en produisant de nombreux médiateurs (Holgate, 2007). L'importance de l'épithélium bronchique se situe tant au niveau de la pathogénèse de l'asthme, que dans le maintien des conditions pathologiques par l'expression de gènes de susceptibilité (Haïtchi *et al.*, 2005). On retrouve notamment MUC-5 (« *epithelial cell mucous-inducing gene 5* ») qui est impliqué dans la surproduction de mucus, PCDH1 (protocadhérine-1) qui est une molécule d'adhésion intercellulaire de la famille des cadhérines et ADAM33 (« *A Disintegrin And Metalloprotease 33* ») qui a été associé à l'hyperréactivité bronchique (Haïtchi *et al.*, 2005).

Normalement, en réponse aux dommages cellulaires, des processus de réparation sont enclenchés pour accroître la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire vers le site lésé (Holgate, 2007). Cependant, la prolifération des cellules basales étant diminuée chez les patients asthmatiques, les capacités de régénération de l'épithélium sont affaiblies (Holgate, 2007). La perméabilité de l'épithélium étant également affectée, l'affaiblissement du réseau de jonctions permet un passage permissif de molécules toxiques, de pathogènes et d'allergènes (Holgate, 2007). Au niveau intracellulaire, une quantité moindre d'antioxydants, dont la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase est retrouvée, ce qui réduit la capacité des personnes asthmatiques à résister aux stress (Holgate, 2007). Parallèlement à ces dérèglements épithéliaux, l'augmentation de l'apoptose et la desquamation des cellules épithéliales rendent les voies respiratoires sensibles à l'action toxique des agents

inhalés (Holgate, 2007). Ainsi, le processus de réparation cellulaire altéré, l'intégrité de la barrière épithéliale vraisemblablement rompue, la production d'antioxydants diminuée, l'apoptose des cellules épithéliales augmentée et la desquamation accrue contribuent à la susceptibilité accentuée des voies respiratoires chez les patients asthmatiques (Holgate, 2007). Ces dysfonctions épithéliales sont perceptibles par l'augmentation de l'expression de marqueurs de stress chez ces patients, tels que les protéines de choc thermique (HSP70) et ce, même dans les cas les moins sévères (Holgate, 2008).

Les cellules épithéliales ont également un rôle dans le processus inflammatoire par leur interaction avec le mésenchyme sous-jacent (Holgate, 2007). Par la production de cytokines et de chimiokines, ces cellules fournissent un milieu propice au maintien de l'inflammation induite par les cellules T_H2 (Holgate, 2007). D'ailleurs, la production de facteurs de croissance par les cellules épithéliales induit aussi un accroissement de l'inflammation et du remodelage en exerçant un effet activateur sur les cellules mésenchymateuses (Holgate, 2007).

Quant au rôle des cellules épithéliales dans le remodelage des voies respiratoires, il peut encore une fois être imputé à la production de médiateurs chimiques, dont le TGF- β , l'IL-11 et l'IL-17 (Chakir *et al.*, 2003). Des changements histologiques observables ont pour particularité l'apparition de fibroses sous-épithéliales (Chakir *et al.*, 2003), issues de la déposition de tissus fibreux et de protéines extracellulaires sous la membrane basale des cellules épithéliales (Jeffery, 1992). Des études *in vitro* ont indiqué que les fibroblastes étaient stimulés par le TGF- β et que ces cellules sécrétaient alors une quantité supérieure de protéines de la MEC (collagène de type I et III, fibronectine, protéoglycans et ténascine) (Chakir *et al.*,

2003). D'ailleurs, chez les sujets asthmatiques, une quantité supérieure de TGF- β est produite dans les voies respiratoires et le niveau de sévérité de la maladie correspond au niveau de TGF- β retrouvé dans les voies respiratoires (Chakir *et al.*, 2003). De plus, des études *in vitro* ont constaté que le niveau plus élevé d'IL-17 menait à une augmentation de la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-11 qui sont des médiateurs profibrotiques (Chakir *et al.*, 2003). L'IL-11 a également été reconnu comme ayant un effet promoteur sur l'accumulation de myocytes et myofibroblastes dans les voies respiratoires (Chakir *et al.*, 2003). L'immunoréactivité pour le TGF- β , l'IL-17 et l'IL-11 a déjà été démontré comme significativement plus importante chez les patients asthmatiques (asthme modéré à sévère) et correspondait à l'augmentation de la quantité de collagène de type I et II dans les voies respiratoires (Chakir *et al.*, 2003).

4. Modèles cellulaires pour l'étude des épithéliums de l'arbre trachéo-bronchique

4.1 Lignée cellulaire

Ce projet de recherche vise éventuellement l'utilisation de cellules épithéliales bronchiques humaines reconstituées de la compagnie MatTek (Ashland, Massachusetts, États-Unis) pour leur nombreux avantages dans le cas d'études *in vitro*. Nommées cellules EpiAirway™ (<http://www.mattek.com/pages/products/epiairway>), ces cellules sont un modèle en trois dimensions d'épithélium différencié. Le coût associé à l'achat de cellules EpiAirway™ est très important (près de \$US 1,200 et 2,000 pour un sujet sain ou un patient asthmatique,

respectivement). Nous avons donc décidé de débiter la mise au point des expériences avec les PQs étudiés (i.e. établissement de l'échelle de concentrations pour la toxicité, risque d'interférence avec les essais *in vitro*, etc.) avec la lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines, A549 (ATCC American Type Culture Collection. Manassas, Virginie. États-Unis). Cette lignée correspond à des cellules épithéliales alvéolaires humaines provenant d'un carcinome pulmonaire (ATCC). Bien que cette lignée ne corresponde pas à des cellules épithéliales bronchiques, elles sont la référence dans les études de nanotoxicité pour déterminer le potentiel toxique des NPs sur le système respiratoire humain. La limitation de l'utilisation de cellules primaires épithéliales bronchiques étant la difficulté associée à la croissance cellulaire. La population de cellules A549 doublant à toutes les vingt-deux heures, comparativement à environ quarante-huit heures pour une population de cellules épithéliales bronchiques primaires (HBEP), l'atteinte d'un nombre suffisant de cellules pour la réalisation des expériences est de loin plus rapide avec les lignées immortalisées. Le coût associé aux cellules primaires est de loin plus important également avec un temps d'utilisation plus court (\$CA 646) qu'avec les cellules A549 (\$CA 431). Finalement, le nombre de passage maximal à atteindre est d'environ seize pour les cellules HBEP alors qu'il est en théorie infini pour les cellules A549 (recommandé entre huit et dix passages maximum ou deux mois). Cela permet d'avoir un nombre suffisant de cellules durant la période d'expérimentations avec les A549.

5. Objectifs de recherche

5.1 Mise au point des mesures de nanotoxicité avec les PQs

Dans un premier temps, l'objectif de mon projet de recherche était d'effectuer la mise au point des conditions pour l'utilisation des PQs de la compagnie Vive Nano avec la lignée cellulaire A549 (ATCC). Chacune des classes de NPs ayant des comportements distincts autant dans les milieux de culture que dans les essais de cytotoxicité. Nous avons donc débuté le projet par la réalisation de la mise au point et la caractérisation des PQs. Il s'agissait donc de vérifier les possibles interactions entre les PQs et le milieu de culture, les essais de cytotoxicité et de fluorescence ainsi qu'entre les essais de cytotoxicité et de fluorescence et le milieu de culture, et cela avant de démarrer les expériences avec la lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549.

Dans le cadre du congrès *International Academy of Science, Engineering and Technology (ASET)*, nous avons soumis un article qui a été accepté avec révision par un comité de pairs pour publication dans le *Proceedings of the International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications*. Cet article relate mes travaux de recherche sur cette première partie de mon projet qui porte sur la mise au point des essais de nanotoxicité des PQs étudiés chez la lignée cellulaire A549.

En ce qui concerne la réalisation expérimentale de cet article, j'ai travaillé en laboratoire pour réaliser toutes les expériences de mise au point. Mon directeur de recherche, le Dr. Karim

Maghni et son associée de recherche au laboratoire, le Dr. Mélanie Welman, m'ont aidé à préparer les protocoles de recherche, à établir la logique de la progression des expériences, ainsi qu'à m'assister pour parfaire l'analyse des résultats. Le Dr. Welman m'a également aidé à quelques reprises pour réaliser certaines étapes expérimentales en laboratoire (passage cellulaire, débiter une expérience ou participer lors de la réalisation des expériences si nécessaire). Le Dr. Stéphane Hallé, professeur Département de génie mécanique de l'École de Technologie Supérieure (ÉTS), a permis de faire quelques essais de caractérisation des PQs. Des mesures pour déterminer par exemple l'état granulométrique de ces NPs par microscopie électronique à transmission (MET) a été tenté. D'autres mesures de caractérisation seront effectuées. J'ai donc réalisé la totalité des expérimentations en laboratoire à l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal ainsi que la majorité de la rédaction du premier article.

5.2 Mécanismes de nanotoxicité des PQs

Le projet de recherche cible également l'étude des mécanismes de toxicité de ces PQs. Étant donné les résultats de cytotoxicité obtenus au cours de la première partie du projet, nous avons décidé de déterminer les mécanismes de toxicité non seulement à court terme, mais également d'identifier les modes d'actions à long terme des PQs. De nombreuses études dans la littérature ont démontré la libération des ions cadmiums du noyau ou des couches externes protectrices des PQs. Nous avons tenté de vérifier si la toxicité des PQs de la compagnie Vive Nano est attribuable à la dégradation de la couche externe protectrice, menant ainsi à la libération des ions cadmium dans le milieu de culture.

Pour cette phase du projet, j'ai réalisé la totalité des expérimentations en laboratoire ainsi que l'intégralité de la rédaction de l'article scientifique relatant ces résultats (**Article : Nonspecific interactions between CdTe/CdS QDs and components of culture medium and *in vitro* cadmium assay kit**). Mon directeur de recherche, le Dr. Karim Maghni et son associée de recherche au laboratoire, le Dr. Mélanie Welman, m'ont encore une fois aidé à élaborer les protocoles, à ajuster la logique de la progression des expériences, ainsi qu'à parfaire l'analyse des résultats. Le Dr. Welman m'a également assistée à l'occasion pour quelques étapes de l'expérimentation en laboratoire (passage cellulaire, débiter une expérience ou participer lors de la réalisation des expériences si nécessaire).

Il n'a pas été possible de compléter cet objectif de recherche puisque les étapes de validation et de mise au point des expériences nous ont permis de détecter la présence d'interactions non spécifiques entre les NPs et les différentes solutions (milieu de culture, solution de lyse, etc.) lors de la quantification du cadmium libre. Il sera question de trouver des méthodes alternatives pour mesurer la libération des ions cadmiums.

5.3 Nanotoxicité et pathologie respiratoire

Les conditions expérimentales établies, nous avons pu inclure une partie des résultats de mise au point dans la première publication (article **Risk assessment of long-term exposure to coating quantum dots: An *in vitro* study**) ainsi que dans la section résultats de ce mémoire.

La suite du projet de recherche ciblera l'étude des cellules EpiAirwayTM (MatTek) s'apparentant à l'épithélium retrouvé dans les poumons humains pour une condition respiratoire donnée, soit des cellules provenant de patients asthmatiques.

L'hypothèse initiale étant que dans des conditions pathologiques l'épithélium serait plus sensible à l'action toxique des PQs, Les réponses cellulaires associées à l'inflammation, la cytotoxicité et la génotoxicité suite aux incubations avec les PQs seront mesurées sur les cellules EpiAirwayTM. La réalisation de l'étude de cette condition respiratoire nous permettra d'accomplir le deuxième objectif de recherche qui est d'étudier les réponses cellulaires en fonction de la pathologie respiratoire. L'objectif 5.3 n'a pas pu être réalisé pour cause principale du temps restant pour finaliser les exigences académiques de maîtrise.

6. Publication scientifique: Risk assessment of long-term exposure to coating quantum dots: An *in vitro* study

Risk assessment of long-term exposure to coating quantum dots: *An in vitro* study

Bergeron-Prévost Myrella¹, Welman Mélanie¹, Hallé Stéphane², Maghni Karim¹

¹Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec Canada, H4J 1C5; ²École de technologie supérieure, Département de génie mécanique, 1100 Notre-Dame Ouest, Montréal, Québec, Canada, H3C 1K3

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are fluorescent nanocrystals forming a heterogeneous class of engineered nanoparticles. Those unique properties confer them many potential clinical applications. Cytotoxic effects of QDs have been reported. Physical characteristics of QD, such as size, charge, concentration and bioactivity of the outer coating have been identified as determining factors for nanotoxicity. Efforts have been made to manufacture novel outer coatings for inhibiting or reducing QDs toxicity. Although coating of QDs seems to prevent potential cell damages, long-term toxic effects of coating QDs remain poorly investigated.

Aim: To determine the long-term biosafety of coating nanocrystals of cadmium telluride/cadmium sulfide (CdTe/CdS) QDs in human alveolar epithelial cells.

Methodology: CdTe/CdS QDs were purchased from the Vive Nano Company. QDs sizes range from 1 to 10 nm. Interferences between QDs and culture cell media, and QDs and the assay used to assess nanotoxicity were determined. The A549 human alveolar epithelial cell line was used as an *in vitro* airway cell model to determine CdTe/CdS QDs biosafety. QDs toxicity was determined by quantifying intracellular lactate dehydrogenase (LDH) release (LDH assay). To do this, A549 cells were incubated with CdTe/CdS QDs (1 to 2000 µg/ml) for 16, 24, 48 and 72 hours.

Results: Interference experiments revealed no significant interactions between QDs and the culture media or QDs with the LDH assay. CdTe/CdS QDs 100 µg/ml displayed no toxic effects on A549 human alveolar epithelial when incubated for 16 hrs. In contrast, the concentration of 2000 µg/ml CdTe/CdS QDs was highly toxic 16 hrs post-exposure. Interestingly, long-term exposure (72 hrs) of A549 cells with CdTe/CdS QDs 100 µg/ml resulted in a marked decreased in cell viability (LDH assay).

Conclusion: We found that long-term exposure of human alveolar epithelial cells to coating CdTe/CdS QDs induces toxicity for concentrations being not toxic in a short-term exposure. Further studies are needed to understand long-term toxic effects of coating QDs.

1 INTRODUCTION

Described as the industrial revolution of the end of the 20th century, it is predicted that \$1 trillion will be spent by 2012 on nanotechnologies for a variety of applications (Hardman, 2006). Amongst the growing type of nanoparticles produced, quantum dots (QDs) are promising useful tools in biomedicine (Madl, 2009; Surendiran, 2009) with applications for drug delivery, tumour biology investigation and *in vivo* imaging (Iga, 2007; Surendiran, 2009). QDs biosensors are generally made of an inorganic core surrounded by an inorganic shell. The first generation of QDs had an unmodified surface and was classified as uncoated QDs. Studies on biosafety of uncoated QDs indicated that these nanoparticles are strong activators of oxidative stress responses and apoptosis in different cell types (Chan, 2006; Derfus, 2003; Lovric, 2005b; Rzigalinski, 2009). Recent advances to prevent or reduce QDs nanotoxicity led to the development of coated nanoparticles, such as aqueous inorganic coated QDs (Iga, 2007) or Zinc Sulfide (ZnS) coated QDs (Su, 2009; Hoshino, 2004; Kirshner, 2005). Several *in vitro*

and *in vivo* studies have suggested that coated QDs are less toxic than uncoated QDs (Mancini, 2006; Cho, 2007; Su, 2009; Hauck, 2010). However, these studies also revealed that further investigations are needed to improve coated QDs biocompatibility. Development of new molecules for QDs production, coating modification, and prevention of QDs aggregation aim to reduce coated QDs nanotoxicity. «Toxic-free» coated QDs are needed because of their future biomedical applications, for instance, as biosensors in cancer diagnosis or nanovectors in nanomedicine therapy (Jamieson, 2007; Smith, 2008). Thus, administered QDs in human subjects should have to present very low toxicity in a long-term period to avoid major damages in tissues (e.g. skin) or organs (e.g. lungs) (Lewinski, 2008; Singh, 2009; Pelley, 2009).

Nanotoxicology is an emerging discipline in toxicology science since the beginning of the 21st century (Donaldson, 2004; Oberdörster, 2005; Kurath, 2006). Recent reports have identified major problems with some standard toxicity tests attributed to interferences between nanoparticles and the cell-viability assay which led to false positive toxicity measurements, and thus, wrong conclusions. For instance, strong interference of carbon nanotubes and boron nitride nanotubes with the MTT metabolic assay has been reported for (Wörle-Knirsch, 2006; Ciofani, 2010). The main consequence of such interferences is that a certain type of nanoparticles may be identified as dangerous to human health while they may be not. Thus, the identification of interferences between cell-viability tests and nanoparticles, particularly for novel or existing but newly functionalized nanoparticles, is an important issue to address to trust nanotoxicity data, and subsequent conclusions on the risk of those nanoparticles for human health.

Long-term toxic effects of coating QDs remain unanswered, which is a critical issue for QDs biomedical applications. In the present study, we have examined the biosafety of coating QDs produced by the Vive Nano Inc. company. Those QDs have been selected over others because the coating used allows them to be soluble and remain disperse in water, which physical properties should reduce QDs cytotoxicity (Hoshino, 2004; Lovric, 2005b; Nahar, 2006; Zhang, 2006; Liu, 2009). We have first determined potential interferences between QDs and the cell-viability assay, and then investigated the biosafety of QDs in human alveolar epithelial cell line in response to short-term and long-term exposures.

2 METHODS

Quantum dots

Cadmium Telluride/Cadmium Sulfide nanocrystals (CdTe/CdS QDs) stabilized by polyacrylate sodium were purchased from the Vive Nano Inc. company (Toronto, Canada). These QDs are very fluorescent, ultra-small (between 1-10nm) and water-dispersible. The excitation/emission wavelengths are 350/530 nm.

***In vitro* human airway cell model**

A549 human alveolar basal epithelial cells (ATCC, Manassas, Virginie, États-Unis) were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (HyClone, UT, USA) and 1% penicillin-streptomycin, at 37 °C under the humidified atmosphere (5% CO₂).

Short and long-term exposures

The biosafety of low and high concentrations of CdTe/CdS QDs (1 to 2000 µg/ml) in A549 human cells was addressed in a short-term (16 and 24 hours) and long-term (48 and 72 hours) exposures at 37 °C under the humidified atmosphere (5% CO₂) and in dark.

LDH Cytotoxicity assay

To determine the biosafety of CdTe/CdS QDs (1 to 2000 µg/ml) in a short-term and long-term exposure, 2,5X10³ cells/well were seeded on a 96-well plate 24 hours prior to address QDs cytotoxicity. Cells were then incubated in the presence or absence of QDs for 16, 24, 48 and 72 hours. Levels of lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture media were determined as a marker of cell damage and so, of QDs cytotoxicity. LDH released by control QDs-unexposed cells was also determined (Background control) of LDH released in culture media was quantified using the Cytotoxicity Detection kitPLUS (LDH) from Roche (Mississauga, Canada). Briefly, a reaction mix composed of a catalyst (diaphorase/NAD⁺ mixture) and a dye solution (iodotetrazolium chloride (INT) and sodium lactate) was added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature (protected from light). Control cells (no QDs exposure) were lysed for 15 minutes at room temperature with a kit buffer lysis solution to measure the total LDH activity in cultured cells (Total LDH release). After reactions were stopped, samples optical density (Experimental values) was read in an ELISA microplate reader at 490nm with a reference wavelength at 690nm. The percentage of cytotoxicity of CdTe/CdS QDs was calculated as followed:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{Experimental values} - \text{Background control}}{\text{Total LDH release} - \text{Background control}} \times 100$$

Levels of LDH activity in cell culture media

LDH activity has been reported previously in FBS. This background of LDH activity may affect the determination of LDH release from damage cells in response to QDs exposure. Thus, LDH activity levels in the cell culture media was measured as a function of the percentage of FBS (1.25 to 10 %). LDH activity levels were determined as described in the above section, and they were expressed as optical density (OD) values. All measurements were done in triplicate and for three independent experiments.

Interference between QDs and the cell culture media

To determine the potential interaction of CdTe/CdS QDs with the cell culture media, fluorescence intensity of QDs (1 to 2000 $\mu\text{g/ml}$) was determined in serum-free culture, and culture media containing 5 % FBS. The fluorescence was directly measured with the POLARstar microplate reader using filters at 485/520 nm excitation/emission. All measurements were done in triplicate and for three independent experiments.

Interference between QDs and the LDH assay

To determine the potential interaction of CdTe/CdS QDs with the quantification of LDH activity, QDs (1 to 2000 $\mu\text{g/ml}$) were incubated in culture media containing 5 % FBS. LDH activity levels were determined as described in the above section, and they were expressed as OD values. All measurements were done in triplicate and for three independent experiments.

3 RESULTS

LDH activity level in cell culture media

LDH activity has been reported previously in FBS. However, the LDH assay is based on the quantification of LDH released from damage cells in media of cultured cells when exposed to toxic agents. Therefore, levels of LDH activity in the Hyclone's FBS was quantified to determine the best compromise value of FBS percentage for keeping cell alive (FBS contains most nutriments for cells survival) while having a suitable quantification of LDH released by damage cells in response to QDs exposures. Our data indicate that 5 % FBS corresponds to best compromise for optimal cell growth while decreasing background level of LDH activity for cytotoxicity experiments (**Figure 1**).

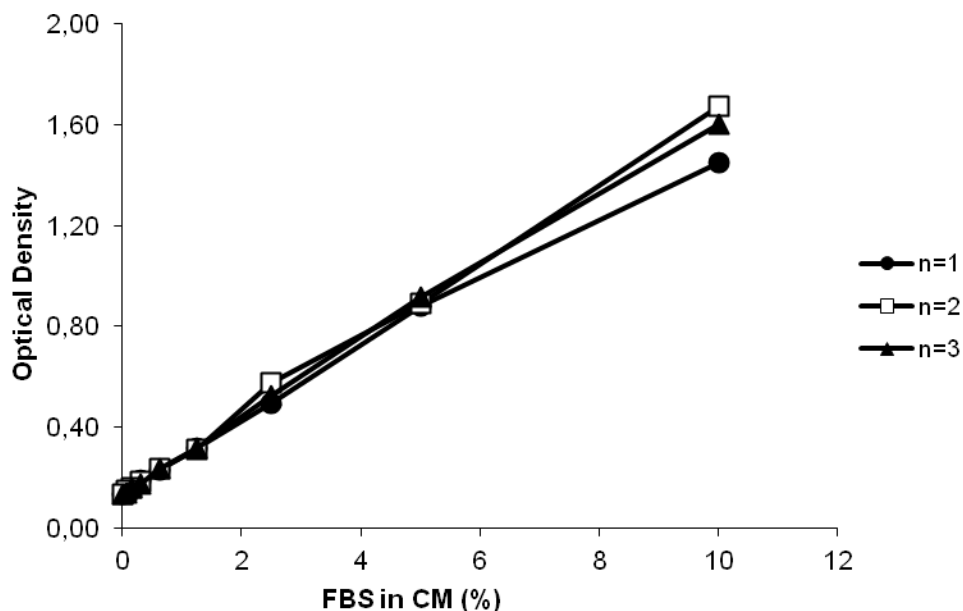


Figure 1. Levels of LDH activity in the cell culture media as a function of the percentage of FBS. N=3

Interference between QDs and the cell culture media

To investigate potential interactions of CdTe/CdS QDs with components of the cell culture media, we have quantified the fluorescence intensity of QDs (1 to 2000 $\mu\text{g/ml}$) in the cell culture media containing 5% FBS in comparison to FBS-free media. Our data indicated that the fluorescence intensity of low to high concentrations of QDs are similar between FBS-free and 5% FBS culture media (**Figure 2**), which finding suggests that components of the culture media with 5 % FBS do not interfere with CdTe/CdS QDs.

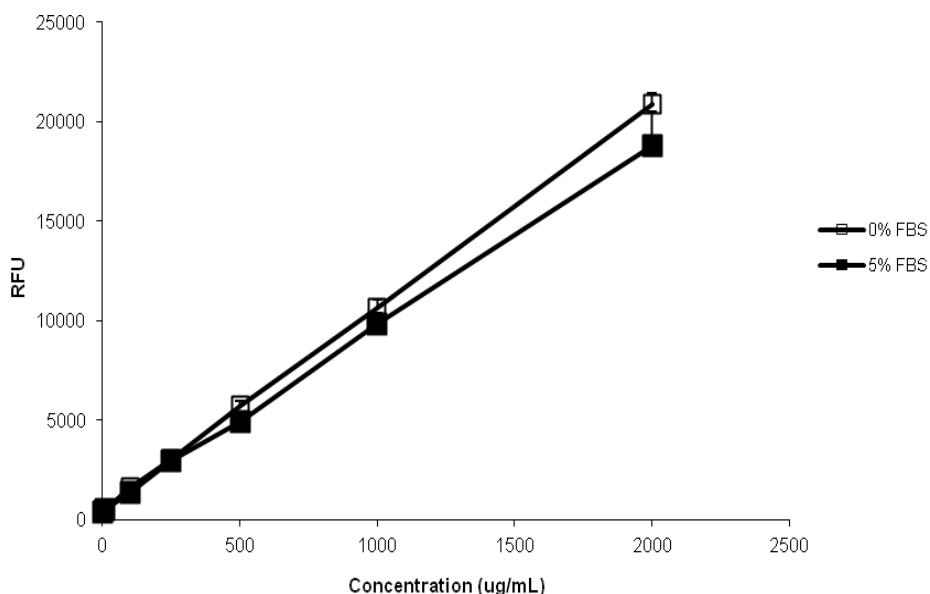


Figure 2. Interference between low and high concentrations of QDs and FBS-free or 5 % FBS cell culture media. N=3

Interference of QDs with the LDH assay

Because interference between nanoparticles and cytotoxic assays have been previously reported (Wörle-Knirsch, 2006; Ciofani, 2010), we have examined whether CdTe/CdS QDs may interfere with the quantification of LDH activity levels. Our data indicated that concentrations of CdTe/CdS QDs ranging from 1 to 2000 $\mu\text{g/ml}$ do not interfere with the LDH assay (**Figure 3**). All together, these data validate our experimental conditions to assess the risk of CdTe/CdS QDs cytotoxicity in human airway cells in response to short-term and long-term exposures.

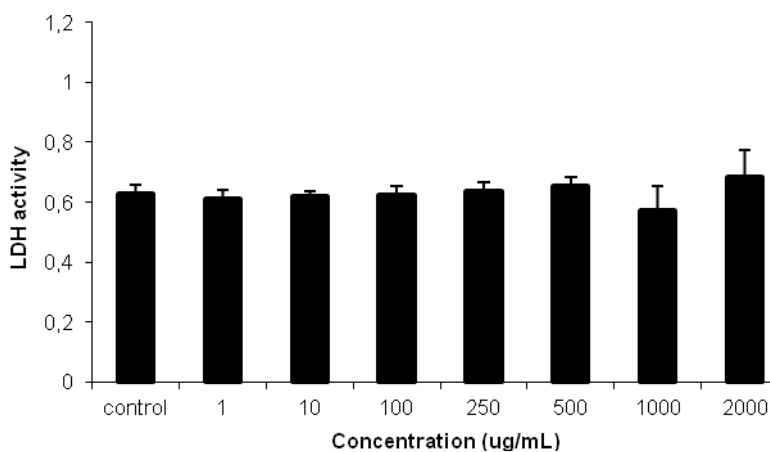


Figure 3. Interference between low and high concentrations of QDs and LDH activity measurements. N=3

Assessment of CdTe/CdS QDs cytotoxicity in short-term and long-term exposures

Our data indicate that the exposure of A549 human airway cells to CdTe/CdS QDs 100 $\mu\text{g/ml}$ for 16 hours had no toxic effect on cells (**Figure 4**). However, the concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$ CdTe/CdS QDs was highly toxic 16 hrs post-exposure. In marked contrast, long-term exposure (72 hrs) of A549 cells with CdTe/CdS QDs 100 $\mu\text{g/ml}$ resulted in a decrease in cell viability. Interestingly, a plateau was reached for the cytotoxic effect of CdTe/CdS QDs from the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ when human airway cells were exposed for 72 hrs in comparison to the other time periods (**Figure 4**).

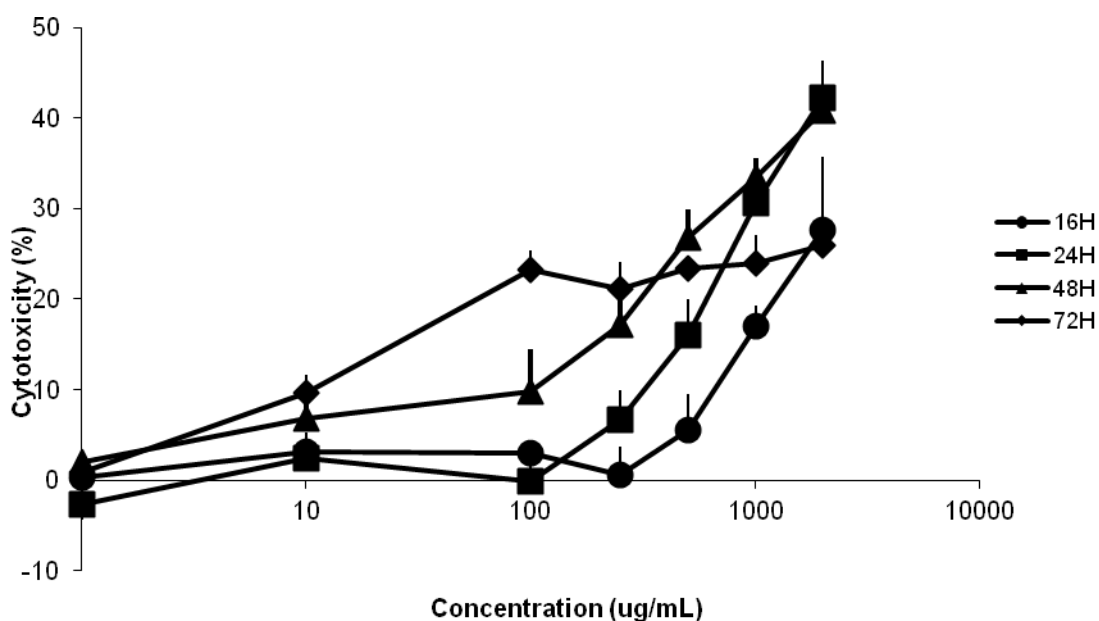


Figure 4. Cytotoxicity of QDs in A549 human airway cells in response to short-term and long-term exposures. N=5

4 CONCLUSION

Risk assessments of nanomaterials are needed for responsible development of all new manufactured nanoparticles to identify risks to human health, workplace and general environments, and the ecosystem. However, there is a lack of knowledge on the intrinsic cytotoxicity of most nanoparticles and consequences of nanoparticles exposures for human health. Risk assessments of nanobiosensors and nanovectors developed for nanomedicine is another concern because those nanomaterials are administered to human subjects. QDs are promising useful tools in biomedicine. Although coated QDs are less cytotoxic than uncoated QDs, the risk assessment of long-term exposure to coated QDs is still poorly investigated. Cho et al. (2004) found that long-term exposure to CdTe, but not molecule capped core/shell CdSe/ZnS nanoparticles, were cytotoxic in human breast cancer MCF-7 cells. More recently, long-term exposure of capped CdTe QDs on PC12 cellular activity showed that alterations in cell functions (i.e. viability, DNA quantification and proliferation) were concentration dependant and influenced by the QDs surface environment (gel or non-gel capped) (Prasad, 2010).

In the present study, we have examined the biosafety of coating CdTe/CdS QDs. Having established the more suitable percentage of FBS in cell culture media to maintain cell growth while decreasing FBS-derived LDH activity, we have first demonstrated the absence of interference of coating CdTe/CdS QDs with components of the cell culture media, and the LDH assay. Assessments of CdTe/CdS QDs biosafety showed that long-term exposure of human alveolar epithelial cells to coating CdTe/CdS QDs induces toxicity for concentrations being not toxic in a short-term exposure. Mechanisms underlying nanotoxicity of low concentrations of coating CdTe/CdS QDs in human airway alveolar epithelial cells in a long-

term exposure is presently unknown. Several studies have suggested that QDs cytotoxic effects may be related to cadmium ions (Cd^{2+}) released from the QDs cores. However, other studies showed that there is no concentration-dependent association between cell viability and concentration of free Cd^{2+} (Cho, 2004). This suggests that cytotoxic effects of low concentrations of coating CdTe/CdS QDs may be not related to degradation of coating CdTe/CdS QDs in time. Nanoparticles shape and density are important properties for nanosafety. Therefore, scanning electron microscopy coupled with image processing techniques will be used to provide valuable information on the coating CdTe/CdS QDs morphology in short-term and long-term exposures in relationship to QDs cytotoxicity. Furthermore, whether molecular mechanisms responsible for cell toxicity are different for high QDs concentrations at short-term exposure compared to low QDs concentrations at long-term exposure are unknown but have to be determined. Nanomedicine is an emerging field that holds great promise, however, risk assessments and safety issues are still needed to ensure that QDs are safe for applications in the diagnosis and treatment of human disease.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by a grant from the Réseau de Recherche en Santé et Sécurité du Travail (RRSST) du Québec (Fonds de recherche en santé du Québec; FRSQ) and a grant from the Center for Asthma in the Workplace (Canadian Institutes of Health Research). Myrella Bergeron-Prévost has received a master studentship from the Center for Asthma in the Workplace.

REFERENCES

- Chan W.-H., Shiao N.-H. and Lu P.-Z. (2006). CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicology Letters*, 167; 191-200.
- Cho S. J., Maysinger D., Jain M., Röder B., Hackbarth S. and Winnik F. M. (2007). Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*, 13; 23(4): 1974-1980.
- Ciofani G., Danti S., D'Alessandro D., Moscato S., Menciassi A. (2010). Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: Interference with the MTT assay. *Biochemical Biophysical Research Communication*, Mar 10. [Epub ahead of print].
- Derfus A. M., Chan W. C. W. and Bhatia S. N. (2003). Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters*, 4(1): 11-18.
- Donaldson K., Stone V., Tran C. L., Kreyling W. and Borm P. J. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(9): 727-728.
- Hardman R. (2006). A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environmental Health Perspectives*, 114(2): 165-172.
- Hauck T. S., Anderson R. E., Fischer H. C., Newbigging S. and Chan W. C. W. (2010). *In vivo* Quantum-Dot Toxicity Assessment. *Small*, 6, No. 1, 138–144.
- Hoshino A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K. and Yamamoto K. (2004). Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Letters*, 4 (11): 2163–2169.
- Iga A. M., Robertson J. H. P., Winslet M. C. and Seifalian A. M. (2007). Clinical Potential of Quantum Dots. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2007, Article ID 76087, 10 pages.
- Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M. and Seifalian A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 28(31): 4717-32.
- Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A. M., Gaub, H. E., Stölzle S., Fertig N. and Parak W. J. (2005). Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles. *Nano Letters*, 5(2): 331-338.
- Kurath M. and Maasen S. (2006). Toxicology as a nanoscience?--disciplinary identities reconsidered. *Particle and Fibre Toxicology*, 28;3:6.

Lewinski N., Colvin, V., and Drezek R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1): 26-49.

Lovric, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin. G. R. A., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005a). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine*, 83: 377–385.

Lovric, J., Cho, S. J., Winnik, F. M., & Maysinger, D. (2005b). Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry & Biology*, 12(11): 1227-34.

Madl A. K., and Pinkerton K. E. (2009). Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles. *Toxicology*, 39(8):629-658.

Mancini M. C., Kairdolf B. A., Smith A., and Nie S. (2008). Oxidative Quenching and Degradation of Polymer-Encapsulated Quantum Dots: New Insights into the Long-Term Fate and Toxicity of Nanocrystals *in vivo*. *Journal of the American Chemical Society*, 130 (33): 10836–10837.

Nahar M., Dutta T., Murugesan S., Asthana A., Mishra D., Rajkumar V., et al. (2006). Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 23(4): 259-318.

Oberdörster G., Oberdörster E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113:823-839.

Pelley J. L., Daar A. S., and Saner M. A. (2009). State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots. *Toxicological Sciences*, 112(2):276-96.

Prasad B.R., Nikolskaya N., Connolly D., Smith T.J., Byrne S.J., Gerard V.A., Gun'ko Y.K., Rochev Y. (2010). Long-term exposure of CdTe quantum dots on PC12 cellular activity and the determination of optimum non-toxic concentrations for biological use. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1):7. [Epub ahead of print].

Rzagalinski B. A. and Strobl, J. S. (2009). Cadmium-containing nanoparticles :Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3) :280-288.

Singh N., Manshian B., Jenkins G. J., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J. and Doak S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23-24): 3891-914.

Smith A. M., Duan H., Mohs A. M., and Nie S. (2008). Bioconjugated Quantum Dots for *In Vivo* Molecular and Cellular Imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11): 1226–1240.

Su Y., He Y., Lu H., Sai L., Li Q., Li W., Wang L., Shen P., Huang Q. and Fan C. (2009). The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating. *Biomaterials*, 30(1):19-25.

Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S. C. and Adithan C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medical Research*, 130: 689-701.

Wörle-Knirsch J.M., Pulskamp K., Krug H.F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters*, 6(6): 1261-1268.

Zhang T., Stilwell J. L., Gerion D., Ding L., Elboudwarej O., Cooke P. A., Gray, J. W., Alivisatos A. P. and Chen F. F. (2006). Cellular Effect of High Doses of Silica-Coated Quantum Dot Profiled with High Throughput Gene Expression Analysis and High Content Cellomics Measurements. *Nano Letters*, 6(4): 800-808.

Matériel et Méthodes

Points Quantiques

Les PQs synthétisés par la compagnie Vive Nano (Toronto, Ontario, Canada) ont été utilisés pour les expériences. Composées d'un noyau de Tellure de Cadmium et d'une couche protectrice externe de Sulfure de cadmium (CdTe/CdS), ces nanocristaux sont également stabilisés par du polyacrylate de sodium. Ces PQs sont hautement fluorescents, de très petite taille (entre 1 et 10 nm) et sont dispersés dans une solution aqueuse. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 350 et 530 nm respectivement.

Modèle et culture cellulaire

La lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 a été utilisée comme modèle cellulaire *in vitro*. Les cellules A549 (ATCC, Manassas, Virginie, États-Unis) ont été maintenues dans le milieu de culture DMEM-F12 (HyClone, UT, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine. Les conditions d'incubation étaient maintenues à 37 °C dans des conditions atmosphériques humidifiées (5% CO₂).

Incubations avec les PQs

La nanotoxicité des faibles et fortes concentrations des PQs de type CdTe/CdS a été évaluée en utilisant les concentrations de 1, 10, 100, 250, 500, 1000 et 2000 µg/mL. La lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 a été estimée à court (seize et vingt-quatre heures d'incubation) et à long terme (quarante-huit et soixante-douze heures d'incubation).

Les expositions ont été effectuées à 37 °C dans des conditions atmosphériques de 5% CO₂, à la noirceur.

Essai de viabilité cellulaire MTS

Pour déterminer la biosécurité des PQs de type CdTe/CdS, des concentrations de 1 à 2000 µg/mL ont été utilisées à court et long terme. Les plaques de quatre-vingt-seize puits étaientensemencées avec $2,5 \times 10^3$ cellules, vingt-quatre heures avant les mesures de cytotoxicité des PQs. Les cellules étaient par la suite incubées en présence ou en absence (contrôle) de PQs pour une période de seize, vingt-quatre, quarante-huit ou soixante-douze heures. Le niveau de l'activité mitochondriale était ensuite déterminé grâce à l'essai *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS) de la compagnie Promega (Madison, Wisconsin, États-Unis) pour évaluer le métabolisme cellulaire et ainsi quantifier la nanotoxicité. Des mesures de métabolisme cellulaire effectuées sur des cellules ayant subi les mêmes traitements et incubations en absence de PQs permettaient d'évaluer le métabolisme normal des cellules A549. Sommairement, 20µL d'une solution de réactifs était ajoutée à tous les puits (contenant déjà 100µL de milieu de culture avec ou sans PQs) immédiatement après les incubations, pour une période de quatre-vingt-dix minutes à 37 °C, à la noirceur. La solution, composée de MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) et d'un réactif, le méthosulfate de phénazine (PMS), était préparée selon les instructions du fabricant. Des lectures d'absorbance étaient ensuite réalisées avec un lecteur de microplaque ELISA (BioTek, Winooski, Vermont, États-Unis) à 490 nm, avec une longueur d'onde de référence de 690 nm. Pour évaluer la cytotoxicité des PQs, le pourcentage du contrôle était calculé selon cette équation:

$$\% \text{ du contrôle} = \frac{\text{moyenne des valeurs expérimentales}}{\text{moyenne des valeurs contrôles}} \times 100$$

Analyse statistique

Les résultats ont été analysés avec le *test t de Student*. Les résultats ont été établis comme statistiquement significatifs lorsque le niveau de significativité $p < 0,01$. Les résultats significatifs sont identifiés par le sigle « ** ». Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écart type.

Pour compléter les expérimentations ayant fait l'objet d'une publication scientifique, nous avons effectué des mesures expérimentales supplémentaires. Dans un premier temps, nous avons complété des mesures de mise au point pour s'assurer de la validité de l'essai MTS en présence des PQs de la compagnie Vive Nano. Nous avons par la suite réalisé des mesures de cytotoxicité et comparé ces résultats avec les précédents obtenus (essai LDH). L'ensemble des résultats est présenté au cours des pages suivantes.

Résultats

Additional results to the first manuscript.

L'absorbance a été mesurée pour déterminer la validité de l'essai MTS en présence des NPs de PQs. Les essais ont été réalisés en absence de cellules, à des intervalles de seize, vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures. Le signal d'absorbance observé à la **Figure 5** est constant pour toutes les périodes d'incubations des PQs dans le milieu de culture à 5% FBS.

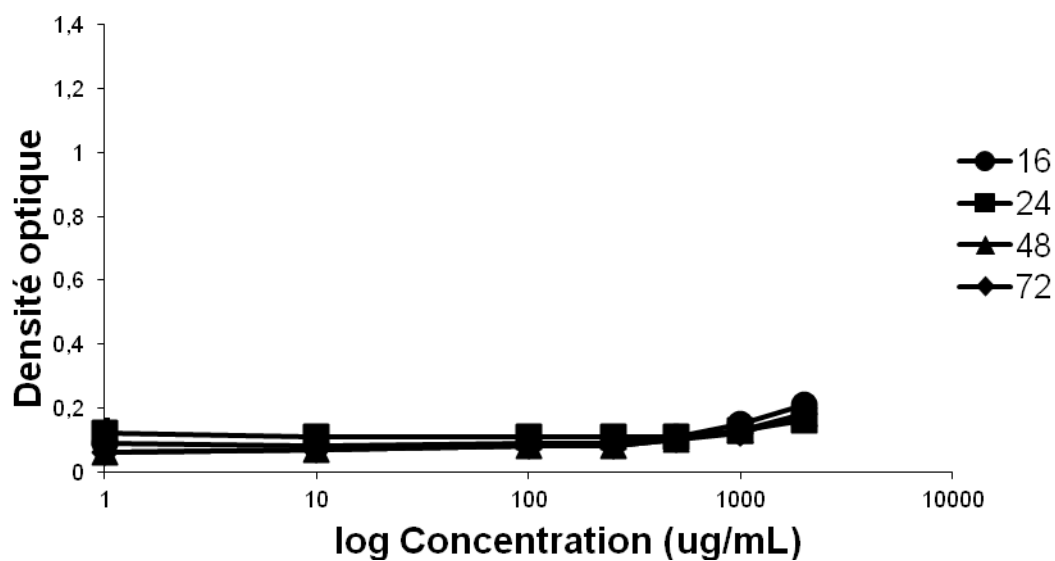


Figure 5. Étude de l'interférence entre les PQs et l'essai MTS dans le milieu de culture contenant 5% FBS. N=3

Des mesures d'absorbance ont été réalisées en présence de la lignée cellulaire A549 (**Figure 6**), pour quantifier cette fois l'activité mitochondriale. Le pourcentage de toxicité par rapport au contrôle a été calculé en fonction de l'activité mitochondriale pour toutes les incubations (seize, vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures) en présence des PQs (1, 10, 100, 250, 500, 1000 et 2000 $\mu\text{g/mL}$). Les faibles concentrations (1 et 10 $\mu\text{g/mL}$) n'ont pas entraîné de changements importants au niveau du métabolisme cellulaire. Les expositions prolongées ont entraîné une réduction de l'activité mitochondriale aux concentrations intermédiaires (100, 250 et 500 $\mu\text{g/mL}$) et les fortes concentrations (1000 et 2000 $\mu\text{g/mL}$) ont causé une réduction marquée du métabolisme après seulement seize heures d'incubation. Une différence significative de cytotoxicité a été observée à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ entre seize et soixante-douze heures ($p < 0,01$).

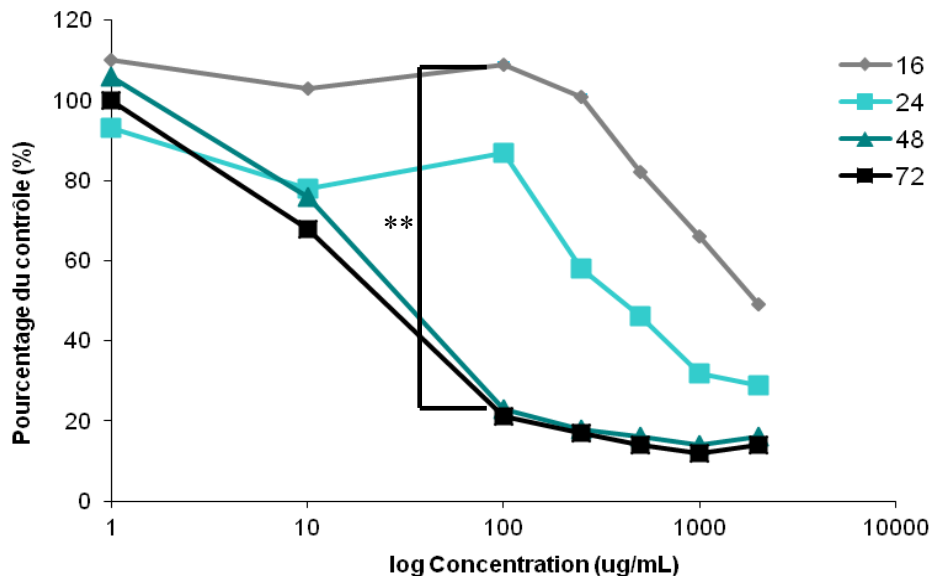


Figure 6. Activité mitochondriale des cellules A549 en réponse à l'exposition courte ou prolongée à de faibles et de fortes concentrations de PQs (essai MTS). N=3

Dans le deuxième objectif de recherche portant sur les mécanismes de toxicité des PQs, nous avons étudié si la libération du cadmium de la structure des PQs lors de leur interaction avec les cellules serait responsable de la toxicité de ces particules. Pour ce faire, nous avons utilisé un test *in vitro*, soit le *Measure-iTTM Lead and cadmium assay kit*. Prenant en considération les résultats de mise au point des premières expérimentations (article #1) pour s'assurer de la validité des résultats de la suite du projet, nous avons d'abord déterminé si cet essai comportait des interférences car aucune information n'a été trouvée dans la littérature à ce sujet. Nos résultats ont démontré des interférences imprévisibles de cet essai avec des composants du milieu de culture et les tampons de lyse utilisés pour obtenir des extraits cellulaires. L'ensemble des résultats de ces interférences ont fait l'objet du second article présenté dans ce mémoire.

7. Publication scientifique: Suitability of cadmium assay for the determination of quantum dots nanotoxicity

Suitability of cadmium assay for the determination of cellular mechanisms of quantum dots toxicity

Myrella Bergeron-Prévost¹, Mélanie Welman¹, Lyes Tabet¹, Karim Maghni^{1,2}

1. Research Centre, Sacré-Cœur Hospital of Montreal, Department of Medicine, Université de Montréal, 5400 boulevard Gouin West, Montreal, Quebec, H4J 1C5, Canada.
2. Co-leader of the International Team in NanosafeTy (TITNT)

Communication addressed to: Dr. Karim Maghni,
Research Center, Sacré-Coeur Hospital,
5400 Blvd Gouin West
Montreal, Quebec
H4J 1C5, Canada
Phone: (514) 338-2222
FAX: (514) 338-3123

Running head: Interferences of cadmium assay with cell culture components

Keys words: Quantum dots, nanotoxicity, cadmium assay, interferences, suitability

ABSTRACT

Nanoparticles (NP) are nanosized particles, naturally or industrially generated with properties significantly different from their bulk or micrometer equivalent material. Quantum dots (QDs) are fluorescent nanocrystals with potential applications in biomedicine as nanovectors or nanoprobe. Despite their multiple promising applications, the limitation of using NPs is mainly related to the risk for inducing cytotoxicity. Nanotoxicology is an emerging field of toxicology that addresses all aspects of nanomaterials interactions with cells and organs. Nanotoxicological studies also revealed that NPs may also interact with components of biochemical assays (e.g. cytotoxic assays) leading to data misinterpretation (e.g. erroneous conclusion on NP toxicity).

Aim: To determine the suitability of cadmium assay for adequately evaluating nanotoxicity mechanisms related to cadmium telluride/cadmium sulphide (CdTe/CdS) QDs.

Methodology: In a free-cell system, interferences of cadmium assay with various media when assessing concentrations of free cadmium were examined. Therefore, interferences of cadmium assay with FBS-free culture medium or supplemented with 5% FBS (to exemplify examination of extracellular mechanisms of QD toxicity) and with lysis buffers CelLytic™ or CHAPS (to exemplify examination of intracellular mechanisms of QD toxicity) were determined.

Results: We showed that significant interferences exist between components of the cadmium assay and cell culture medium. However, interferences were different for ranges of free cadmium concentrations in medium alone versus medium supplemented with 5% FBS. We also found that both CelLytic™ and CHAPS lysis buffers interfere with the cadmium assay. However, when reporting RFU cadmium values into the standard curve done in deionized

water, we found that cadmium concentrations were greatly overestimated over the effective concentrations of cadmium when determined in the CellLytic™ in comparison to the CHAPS lysis buffer. Our results indicate that when assessing cellular mechanisms of QDs toxicity, the cadmium assay is an unsuitable assay for the quantification of free extracellular and intracellular cadmium released from QDs.

Conclusion: Our study brought new elements to this field of research by demonstrating that biochemical assays may also interfere with cell culture medium and lysis buffers. Therefore, our study provides new insight to the research community dealing with NP toxicity by strongly recommending the examination of potential interferences of biochemical assays with cell culture media and lysis buffers prior to assess NP mechanisms of toxicity.

1 INTRODUCTION

Nanoparticles (NPs) are nanosized particles, naturally or industrially generated, with properties significantly different from their bulk or micrometer equivalent material (Kroll, 2009; Shrand 2010). To be classified as nanoparticles, their size has to range from 1 to 100 nm, in at least one dimension (Kroll, 2009; Shrand 2010). According to their commercial applications, NPs are present in nearly all aspects of our lives; biocides, antibiotic treatment, bedding, washers, water purification systems, tooth paste, shampoo, fabrics, deodorants, filters, paints, kitchen utensils, toys, humidifiers, cosmetics, to say the least (Shrand, 2010). Their use in medicine as antiviral, antibacterial, antifouling, antifungal, biosensors, imaging techniques, delivery vehicles, and other useful biological tools is quite promising (Shrand, 2010). There are many classes of nanoparticles composed of different materials, for instance, carbon nanotubes (CNT), titanium dioxide (TiO₂), quantum dots (QDs) and countless variations.

Different types of QDs are currently being industrially developed for their unique properties. Cadmium containing QDs are the most frequently used, but indium phosphide (InP) QDs, lead sulfide (PbS) QDs and silicon QDs are also synthesized for multiple biomedical applications (Wu, 2014). Indeed, it is well known that semiconductors QDs have distinct properties, which differentiate them from other NPs, such as a narrow emission spectra and a particular fluorescence characteristic (Chu, 2012). Above all, high fluorescence quantum yield (QY), superior stability against photobleaching, narrow and symmetric emission spectrum as well as a broad and continuous excitation spectrum are all examples of particularly interesting properties of CdTe QDs (Chu, 2012). In recent years, CdTe and CdSe nanocrystals have been the most prominent QDs used for life science applications. They exhibit higher fluorescent

QDs and the procedure of their synthesis in aqueous solutions represents major advantages over other NPs with fluorescence properties (Chu, 2012). QDs are promising NPs with several different applications as biomarkers, nanoprobe to diagnose cancers and nanovectors for drug delivery systems (Azzazy, 2009; Gao, 2010, Xue, 2012).

The unique properties and applications of QDs are tremendous but there is a downside. For instance *in vitro* core degradation and cadmium release, interference with assay kit and disruption of cellular mechanisms depending on QDs location, among examples (Lewinski, 2008; Lovric, 2005a). Furthermore, *in vitro* experiments demonstrated other mechanisms of QDs nanotoxicity such as translocation from airways to the whole body causing toxicity by accumulation and differential dispersion in the organism, mainly in kidneys, liver, spleen and lungs. QDs translocations result in the release of pro-inflammatory marker (interleukin-6) and biopersistence over time (Haque, 2012; Ostiguy et al, 2006).

Several studies in nanotoxicology revealed the need of using a common relevant parameter to express cytotoxicity because of the difficulty of comparing nanotoxicity data (Lewinski, 2008). Major difference between primary cells and cell lines responses, and between cell types as well as important experimental differences (e.g. incubation time, mode of dispersion, cytotoxic ranges of NPs concentrations) raise physiologically relevant questions about cytotoxicity data (Lewinski, 2008; Yong, 2013).

Studies on the potential mechanisms QDs nanotoxicity *in vitro* indicated that the intracellular degradation of QDs with cadmium release and ROS generation are two major mechanisms involving in cell death (Tsoi, 2013).

In addition, potential interactions between NPs and culture medium or assays components have also been examined. For example, culture medium proteins depletion, by single-walled

carbon nanotubes, (SWCNTs) causes cytotoxicity independently of SWCNT intrinsic toxicity when existing (Casey, 2007a; Casey, 2008). Several studies have also demonstrated nonspecific interactions between some NPs and components of cytotoxic assays. For instance, it is well documented that MTT, Alamar Blue, Coomassie Blue, Neutral Red and WST-1 assays have been invalidated for determining cytotoxicity of SWCNTs (Casey et al., 2007b; Wörle-Knirsch et al., 2006). QDs showed interferences with CytoTox One™ Homogeneous Membrane Integrity (CTO), Alamar Blue, Neutral Red and MTT assays (Monteiro-Riviere, 2009). Nanotoxicology studies revealed that the particular physicochemical properties of NPs are responsible for these interactions and that the nature of these interactions is numerous (Casey, 2007b). Nonetheless, different degrees of interactions have also been reported (Casey, 2007b).

Therefore, in the last decade, nanotoxicology studies raised critical issues regarding the availability of reference materials, and the existence of potential interferences of NPs with some viability assays leading to false interpretations of experimental *in vitro* data (Kroll, 2009). Therefore, for researchers to have conviction in the applicability of tested methods employed they should validate assays prior to undergo nanotoxic experiments (Kroll, 2009). Herein, we have examined the suitability of an assay aims to quantify cadmium concentrations in QDs, as well as when released as free cadmium from QDs.

2 METHODS

Characterization of QD

QDs purchased from Vive Nano (Toronto Ontario, Canada) are coated QDs composed of a cadmium telluride core and a cadmium sulfide shell (CdTe/CdS) suspended in an aqueous solution (pH 6-8). QDs were also stabilized by sodium polyacrylate, and have a size range between 1 and 10 nm (purity >97% CdTe) and an excitation/emission spectra of 350/530 nm. QDs were diluted to various concentrations in different media (culture medium with 0% or 5% FBS, and deionized water).

Cadmium assay kit and chemicals

To determine concentrations of total cadmium and released concentrations of free cadmium in media the Measure-iT™ Lead and Cadmium Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) was used. Experiments were performed and standard curves were established in deionized water according to the manufacturer's instructions. Cadmium standard curves were done in various media: DMEM/F12 culture media supplemented or not with 5% foetal bovine serum (FBS; Hyclone USA), CelLytic™ (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA) and CHAPS lysis buffer (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA). Briefly, working solution (200 µL) consisted of deionized water, buffer concentrate and Measure-iT™ Leadmium reagent was added to black 96-wells plates. Control wells contained 10 µL of deionized water whereas a known concentration of cadmium was added to standard curve wells. Levels of cadmium in QDs purchased from ViveNano diluted in various media at different concentrations (50, 100, 500 and 1000 µg/mL) were determined by adding 20 µL to respective wells. Measurements were immediately carried out with the POLARstar microplate reader with excitation/emission wavelengths of 490nm/520nm (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). Standard curves

were drawn to calculate cadmium concentrations in deionized water (standard kit procedure) and cadmium concentrations prepared in various media for the investigation of assay interferences with components of these media. Measurements were performed in duplicates.

Interference assays

In a black 96-well plate, 50 μL of each sample and 10 μL of the prepared mixture, also used for standard curve measurements, were added to wells already containing 200 μL of working solution. According to the kit booklet, standard curves were prepared, using three different diluents (deionized water, 0% or 5% cell culture medium). Samples were also prepared in those three diluents to obtain a concentration of 1680 nM of cadmium. Again, measurements were carried out immediately after preparation with a POLARstar microplate reader as described above.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). A Student's t test was used for paired comparisons. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3 RESULTS

Interference of the cadmium assay with complete culture medium

Several studies have reported that QDs cytotoxicity is at least in part related to the release of cadmium from its core-shell structure and determined as a free form in the media of cultured cells. However, to the best of our knowledge there is no report on potential interferences between the cadmium assay with components of completed cell culture medium. Therefore, potential interference of the cadmium assay used with culture medium completed with FBS was determined in a free-cell system. Culture medium containing 5% FBS was used in our experiments because this cell culture condition is suitable for cell survival and nanocytotoxicity studies.

In a first series of experiments, the cadmium concentration of 1680 nM was selected since it is in the middle range of the cadmium standard curve concentrations, and so allowing the determination of potential increase or decrease in cadmium fluorescent signal. Data showed that cell culture medium (with no FBS) produced no interference with the quantification of cadmium; calculated values of cadmium being 1704 nM and 1876 nM, respectively for deionized water (DW) and culture medium (CM) (**Figure 7**). In marked contrast, cell culture medium completed with 5% FBS (CM+FBS) provoked a major significant interference in the quantification of cadmium (**Figure 7**) with a calculated value of 244 nM (instead of the experimental concentration of 1680 nM).

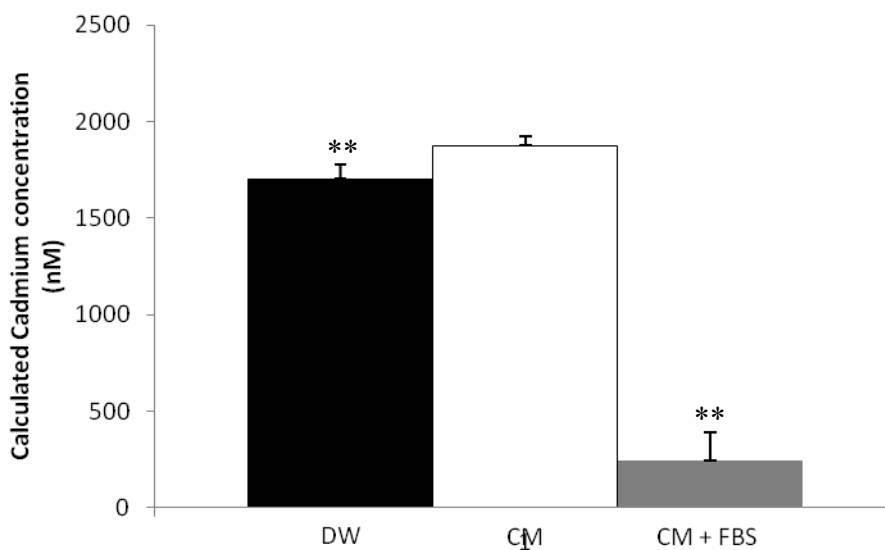


Figure 7. Interference between, either water, incomplete (0% FBS) or complete (5% FBS) cell culture medium and components of the cadmium kit. $n=5$. $ p < 0.05$.**

To further complete this series of experiments in a free-cell system, interference of cadmium assay with cell culture medium was then examined on the full range of the standard curve cadmium concentrations. We found that cell culture medium alone (no FBS; CM) provoked a marked interference (i.e. decrease in RFU values when compared to values in deionized water) with lowest cadmium concentrations (between 210 and 840 nM). RFU values for highest cadmium concentrations measured in cell culture medium returned closely to values measured in deionized water (DW) (**Figure 8**). In opposite, our data indicated that, in the complete cell culture medium (5 % FBS; CM+FBS), for cadmium concentrations between 210 and 840 nM, there was no interference when measuring cadmium concentrations (i.e. similar RFU values when compared to values in DW) whereas marked interferences (i.e. decrease in RFU values) are observed for the highest concentrations (between 1680 and 4200 nM) (**Figure 8**).

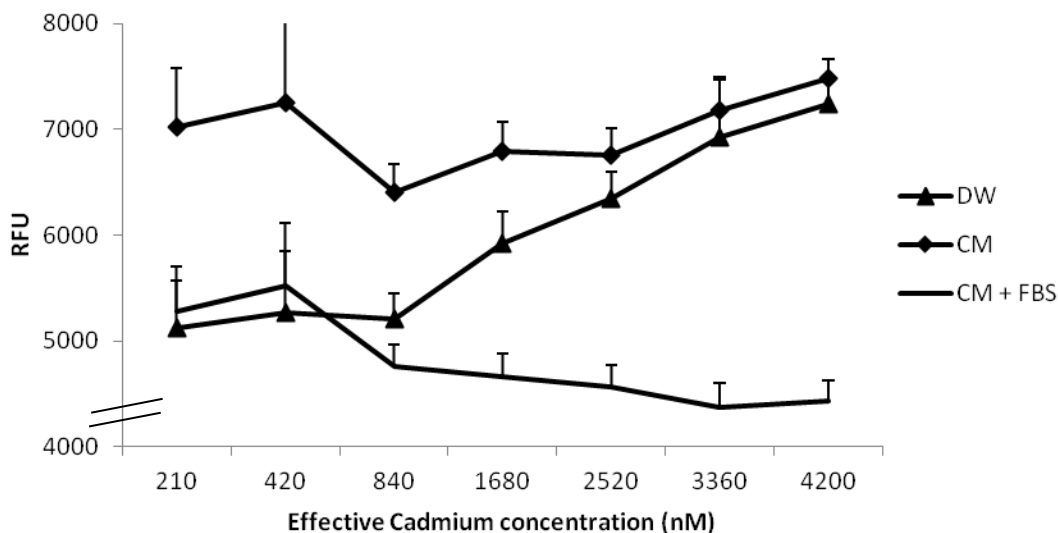


Figure 8. Interference of various media with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. $n=6$

Assessment of potential interferences between QDs and the various cell culture medium

The determination of QDs internalisation in cells and the subsequent levels of intracellular cadmium-derived QDs is one of the issues to address its mechanism of nanocytotoxicity. Internalisation of QDs in cells is often determined by epifluorescence microscopy or flow cytometry. However, these methodologies are not suitable when internalized QDs are degraded into cells since its level of degradation results in a proportional decrease in fluorescent signals detected. Furthermore, these methodologies give no information on the intracellular levels of free cadmium. Among other approaches to determine levels of extracellular and intracellular levels of QDs, the quantification of cadmium concentrations is determined in the supernatant of culture media and in lysed cells, respectively. Before determining potential interferences of media when assessing cadmium concentrations in QDs, we have first determined whether these various medium produce interferences with the intrinsic fluorescence of QDs. Our data showed there is no significant interference of medium tested with the measurement of QDs fluorescence for concentrations ranging from 50 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 9**).

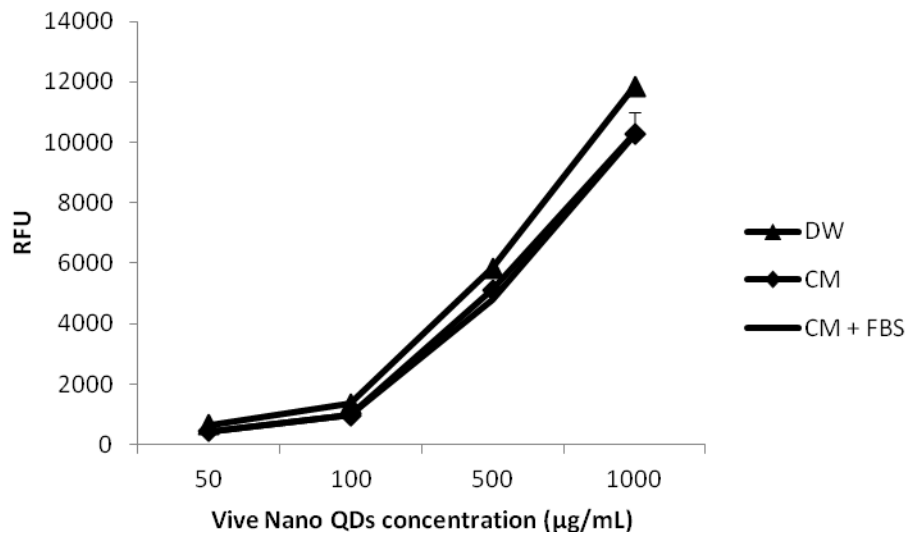


Figure 9. Intrinsic fluorescence of Vive Nano QDs in different mediums. $n=6$

Interference between lysis buffers and cadmium assay

As mentioned above, the determination of intracellular concentrations of cadmium in lysed cells is an interesting approach to address the underlying mechanism of QDs nanocytotoxicity. Therefore, we have next addressed whether CelLytic™ lysis buffer may interfere with the cadmium assay in a cell-free system. Our data showed that the full range of the standard curve cadmium concentrations was inadequately measured when cadmium is diluted in CelLytic™ lysis buffer (Figure 10). The kit booklet recommends to report cadmium RFU measurements done in respective medium into the standard curve performed in deionized water. However, when reporting cadmium RFU values found in CelLytic™ lysis buffer into the standard curve performed in deionized water, we found that this analysis led to an overestimation of cadmium concentrations (Figure 11) over the effective concentrations of cadmium.

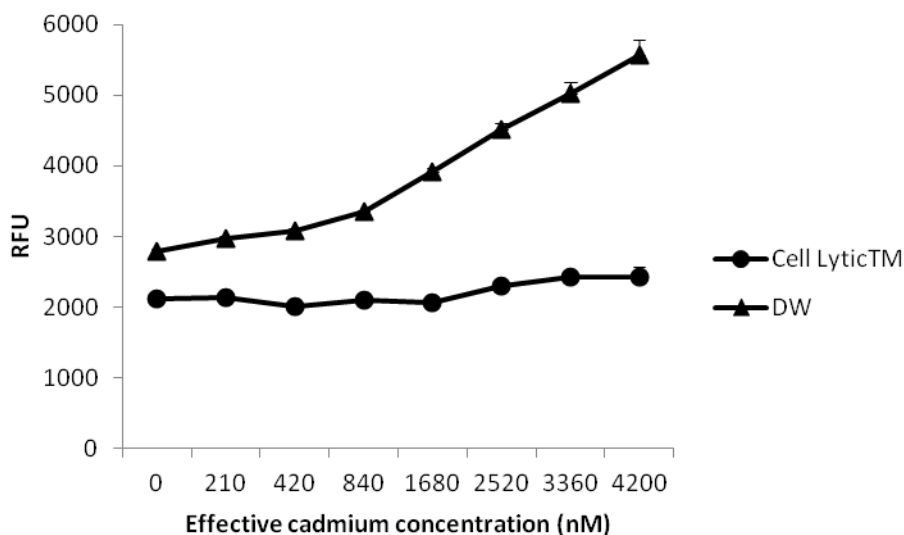


Figure 10. Interference of CelLytic™ lysis buffer with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. n=3

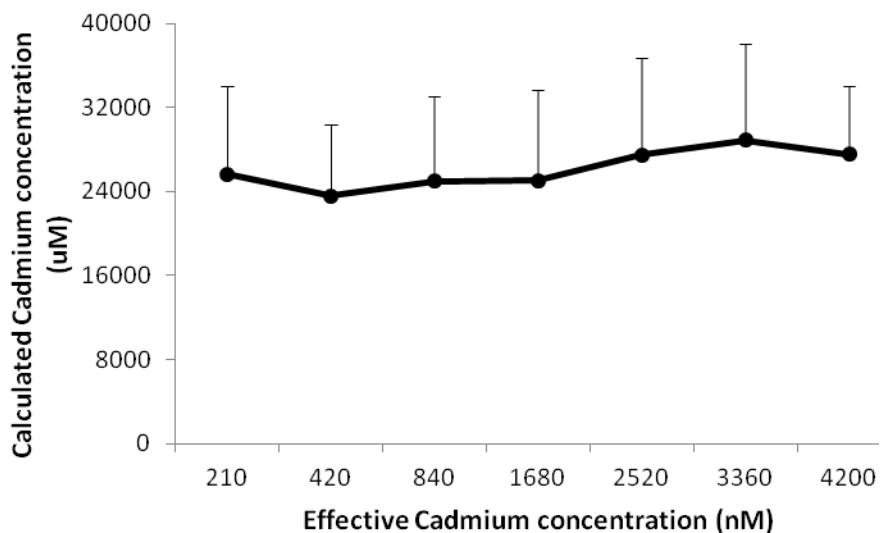


Figure 11. Comparison of effective cadmium concentrations versus calculated concentrations when using CellLyticTM as lysing buffer. n=3

We next addressed whether the CHAPS lysis solution should be an appropriate buffer for determining intracellular levels of cadmium. We found that the full range of the standard curve cadmium concentrations was also inadequately measured when cadmium is diluted in the CHAPS lysis solution (**Figure 12**). Furthermore, when reporting cadmium RFU values found in CHAPS lysis solution into the standard curve done in deionized water, we found that this analysis led to an overestimation of cadmium concentrations (**Figure 13**) over the effective concentrations of cadmium.

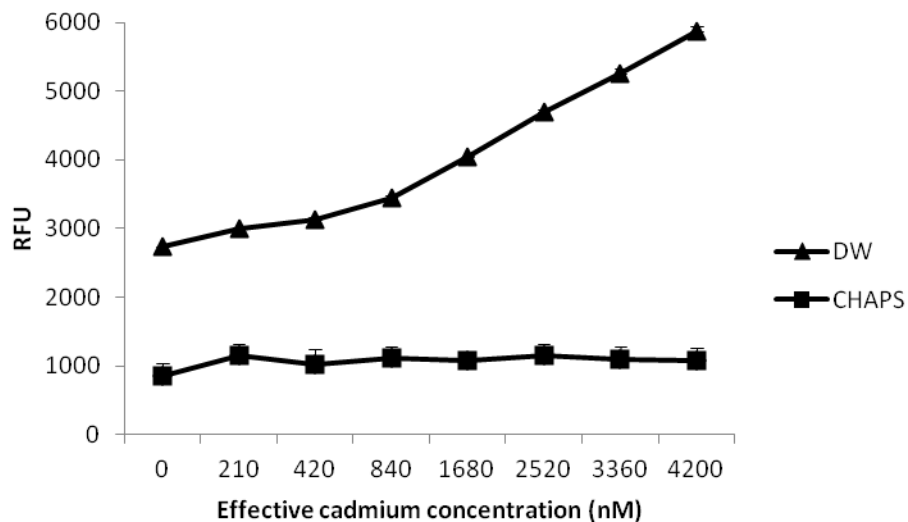


Figure 12. Interference of CHAPS Lysis Buffer with the cadmium assay when assessing the full range of the standard curve concentrations. $n=3$

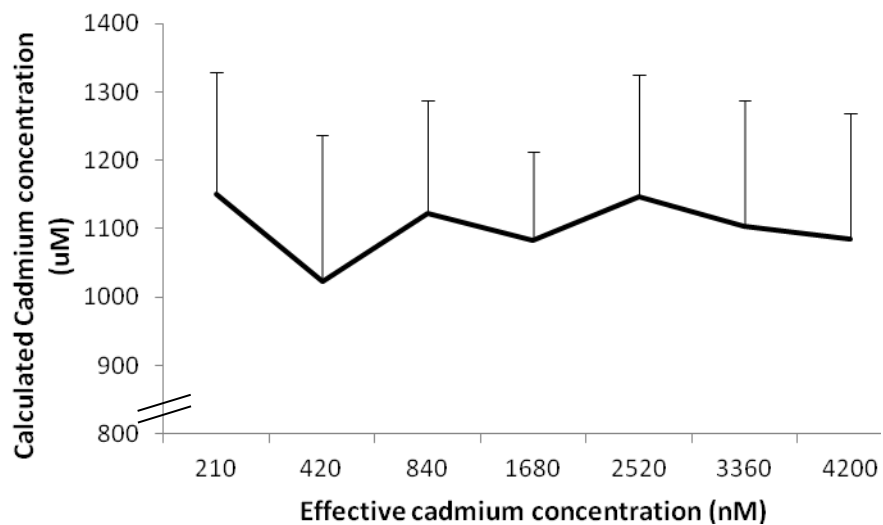


Figure 13. Comparison of effective cadmium concentrations versus calculated concentrations when using CHAPS solution as lysing buffer. $n=3$

4 DISCUSSION

From the last two decades, nanotechnology has been revealed as a promising technology that is now present in nearly all aspects of our life. The anticipated one trillion dollar for the nanotechnology industry by 2015 is an indicator of this booming sector (Shrand, 2010). Applications of nanotechnology in medicine are also becoming more important. QDs are among the most promising tool for biology and medicine applications as an alternative to fluorescent organic dyes for targeting and imaging both *in vitro* and *in vivo* specific molecules and cell types. Tumor detection, diagnostic of its state of progression and determining the adequate therapeutic treatment are among the challenges in cancer. QDs offer the possibility of multiple detection of specific tumor markers during cancer stages progression or in response to drug therapy. The multiplexing capability of QDs (i.e. distinct fluorescent signatures in a labeled tissues or cells) makes this NP a tremendous biomedical tool for improving decisions on cancer diagnosis, prognosis and for the adjustment of therapies. Furthermore, specific targeting allows localized treatments and then offers the possibility of lowering the amounts of drug administered, and therefore potential side effects associated with chemotherapy with increasing chance of survival. In addition, photothermal cancer therapy is also a hopeful venue for cancer treatment with CdTe QDs (Chu, 2012).

Despite the multiple promising applications of QDs, the limitation of using NPs is mainly related to the risk for inducing cytotoxicity which may lead to cell death or transformation. Nanotoxicology is an emerging field of toxicology that addresses all aspects of nanomaterial interactions with cells and organs, and so the risk for NPs to impair physiologic functions. Nanotoxicological studies also revealed that NPs may also interact with component of

biochemical assays (e.g. cytotoxic assays) leading to misinterpretation of cytotoxic analyses (e.g. false positive cytotoxic effect) (Monteiro-Riviere, 2009). Among the numerous interferences determined between NPs and cytotoxic assays, the non-enzymatic conversion of tetrazolium salts into formazan *in vitro* in the presence of SWCNT is one of the first illustration of such interferences (Wörle-Knirsch *et al.*, 2006). Furthermore, the adsorption of FBS proteins by SWCN resulted in a lack of essential components to cells in culture medium, and medium depletion was shown to be responsible for SWCN-induced toxicity rather than intrinsic toxic properties of SWCN (Casey, 2008). Therefore, the determination of potential interferences between NPs and biochemical assays has become a key issue when assessing nanomaterial cytotoxicity *in vitro*. The release of free cadmium from QDs core-shell has been proposed as one of the mechanisms for its toxicity. Usually, released free cadmium concentrations are measured in the supernatant of culture media and in lysed cells. However, to the best of our knowledge, the existence of potential interferences between components of the cadmium assay and cell culture medium (i.e. extracellular quantification) or lysing buffers (i.e. intracellular quantification) have never been addressed. Therefore, in the present study, we have examined in a cell-free system potential interferences of various media with a cadmium assay designed to quantify free cadmium in biological samples.

In the present study, we have first examined whether the cadmium assay may interfere with various media. When using a cadmium concentration in the middle of the standard curve, we found that DMEM/F12 culture medium has no interference with the cadmium assay whereas supplemented this media with 5 % FBS provoked a major interference with assay leading to a marked decrease in the fluorescence signals. Interestingly, when examining levels of interferences of various medium over the full range of the standard curve cadmium

concentrations, we found that levels of interference showed opposite variations in cell culture medium alone (i.e. increase of RFU values) in comparison to medium supplemented with 5 % FBS (i.e. decrease of RFU values). Our study provides the first evidence that the quantification of free cadmium in the DMEM/F12 media leads to erroneous analysis. Whether interference of this cadmium assay may be observed with other types of cell culture medium has not been examined. However, we found that culture medium completed with FBS, the common supplement used in most, if not all, cell culture media, also causes major interferences with the cadmium assay. The underlying mechanisms responsible for interferences of the cadmium assay with cell culture medium remain to be determined. However, two main conclusions rise from these results. The first is that this cadmium assay, and may be other commercially available cadmium assay based on same biochemical principle, are unsuitable for the quantification of free cadmium released from QDs in cell culture medium. The second conclusion relates to previous published studies having quantified free cadmium in cell culture medium by rebutting their conclusions since potential interferences of cadmium assay with culture media were not examined.

The determination of intracellular concentrations of cadmium in lyzed cells is an interesting approach to address the underlying mechanism of QDs nanocytotoxicity. We have first determined whether intrinsic fluorescence of QDs may be altered in different media, and found that there is no alteration. However, we found that both CellLyticTM and CHAPS lysis buffers interfere with the cadmium assay. Furthermore, when reporting RFU cadmium values into the standard curve done in deionized water, we found that cadmium concentrations were overestimated over the effective concentrations of cadmium. The underlying mechanisms responsible for interferences of the cadmium assay with lysis buffer remain to be established.

However, our findings indicated that both CellLytic™ and CHAPS lysis buffers are unsuitable for the quantification of intracellular cadmium. The development of new assays showing no interference with NPs is absolutely required to provide for valid cytotoxic measurements (Arora, 2012). There are alternative methods to biochemical assays for the quantification of extracellular and intracellular levels of cadmium. Cadmium measurements may be accomplished using spectroscopy, for instance, inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). However, ICP-MS is very expensive equipment, and this technology appears not always available in biomedical research centers.

The MINChar Initiative developed a minimum check list to ensure appropriate material characterization in nanotoxicity studies. Parameters like particle size and size distribution, agglomeration, shape, composition, purity, surface properties, stability and context/media should be studied to obtain solid results. Interferences of NPs with biochemical assays are a major issue in nanotoxicology studies which is still neglected in nanotoxicological studies. However, the existence of these interferences may require modifying conventional *in vitro* biochemical assays when using NPs (Laurent et al., 2012). These modifications should take in account crucial endpoints not aren't considered in traditional assays, for instance absorption of proteins and other essential biomolecules onto the surface of NPs (Laurent, 2012). To ensure experimental quality and validity of nanotoxicology measurements, Laurent *et al.* (Laurent, 2012) have recently established three specific criteria: « (i) the characterization of the nanomaterials to be tested; (ii) the validity and suitability of the selected toxicity methods; and (iii) the influence of “cell vision” ».

5 CONCLUSION

Nanotoxicology studies revealed that interactions of NPs with various components of biochemical assays are highly probable because of their particular chemical and physical properties. Our study brought new elements to this field of research by demonstrating that biochemical assays may also interfere with cell culture medium and lysis buffers. Therefore, our study provides new insight to the research community dealing with NPs toxicity by recommending the examination of potential interferences of biochemical assays with cell culture media and lysis buffers before performing nanotoxicology studies. Furthermore, our study may rebut conclusions of previous published studies having quantified *in vitro* concentrations of free cadmium released from QDs using biochemical assays.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by a grant from the Réseau de Recherche en Santé et Sécurité du Travail (RRSST) du Québec (Fonds de recherche en santé du Québec; FRSQ) and a grant from the Center for Asthma in the Workplace (Canadian Institutes of Health Research). Myrella Bergeron-Prévost has received a master studentship from the Center for Asthma in the Workplace.

REFERENCES

- Aillon, K.L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C.J. et Forrest, M.L. (2009). "Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity." Adv Drug Deliv Rev **61**(6):457-66.
- Arora, S., Rajwade, J.M., et Paknikar, K.M. (2012). "Nanotoxicology and *in vitro* studies : the need of the hour." Toxicol Appl Pharmacol **258**(2):151-165.
- Azzazy, H.M. et Mansour, M.M. (2009). *In vitro* diagnostic prospects of nanoparticles. Clin Chim Acta **403**(1-2):1-8.
- Bergeron-Prévost, M., Welman, M., Hallé, S. et Maghni, K. (2010). "Risk assessment of long-term exposure to coating quantum dots: An *in vitro* study." Proceedings of the International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications 524/1-524/8.
- Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., Lyng, F.M., Byrne, H.J. et Chambers, G. (2007a). "Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing." Carbon **45**: 34–40.
- Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J. et Chambers, G. (2007b). "Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity" Carbon **45**: 1425–1432.
- Casey, A., E. Herzog, et al. (2008). "Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells." Toxicol Lett **179**(2): 78-84.
- Chu, M., Pan, X., Zhang, D., Wu, Q., Peng, J. et Hai, W. (2012). "The therapeutic efficacy of CdTe and CdSe quantum dots for photothermal cancer therapy." Biomaterials **33**(29):7071-83.
- Gao, J., Chen, X. et Cheng, Z. (2010). "Near-infrared quantum dots as optical probes for tumor imaging." Curr Top Med Chem **10**(12):1147-57.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. et Delie, F. (2008). "Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters." Eur J Pharm Biopharm **69**(1):1-9.
- Ghasemi, Y., Peymani, P. et Afifi, S. (2009). "Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting." Acta Biomed **80**(2):156-65.

Han, S., Mu, Y., Zhu, Q., Gao, Y., Li, Z., Jin, Q. et Jin, W. (2012). "Au:CdHgTe quantum dots for *in vivo* tumor-targeted multispectral fluorescence imaging." Anal Bioanal Chem **403**(5):1343-52.

Haque, M.M., Im, H.Y., Seo, J.E., Hasan, M., Woo, K. et Kwon, O.S. (2012). "Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice." J Appl Toxicol [Epub ahead of print].

Hardman, R. (2006). "A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors." Environ Health Perspect **114**(2): 165-172

Kroll, A., M. H. Pillukat, et al. (2009). "Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges." Eur J Pharm Biopharm **72**(2): 370-377.

Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U.O. et Mahmoudi, M. (2012). "Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and "cell vision"." PLoS One **7**(1):e29997.

Lewinski, N., V. Colvin, et al. (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." Small **4**(1): 26-49.

Li, W.T. (2009). "Nanotechnology-based strategies to enhance the efficacy of photodynamic therapy for cancers." Curr Drug Metab **10**(8):851-60.

Lovric, J., H. S. Bazzi, et al. (2005a). "Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots." J Mol Med (Berl) **83**(5): 377-385.

Monteiro-Riviere, N. A., A. O. Inman, et al. (2009). "Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line." Toxicol Appl Pharmacol **234**(2): 222-235.

Ostiguy, C., Lapointe, G., Ménard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Boutin, M., Antoun, M. et Normand, C. (2006). "Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures." Studies and Research Projects / Report R-470, Montréal, IRSST, 100 pages.

Pelley, J. L., A. S. Daar, et al. (2009). "State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots." Toxicol Sci **112**(2): 276-296.

Przybytkowski, E., M. Behrendt, et al. (2009). "Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability." FEBS J **276**(21): 6204-6217.

Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A. et Syed, A.F. "Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **2**(5):544-68.

Singh, N., Manshian B., Jenkins G. J., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J. et Doak S. H. (2009). "NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials." Biomaterials **30**(23-24): 3891-914.

Su, Y., M. Hu, et al. (2010). "The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties." Biomaterials **31**(18): 4829-4834.

Tsoi, K.M., Dai, Q., Alman, B. A. et Chan, W.C.W. (2013). "Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies" Accounts of Chemical Research **46**(3):662–671.

Worle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, et al. (2006). "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." Nano Lett **6**(6): 1261-1268.

Wu, T. et Tang, M. (2014). "Toxicity of quantum dots on respiratory system" Inhalation toxicology **26**(2):128–139.

Xue, B., Deng, D.W., Cao, J., Liu, F., Li, X., Akers, W., Achilefu, S. et Gu, Y.Q. (2012). "Synthesis of NAC capped near infrared-emitting CdTeS alloyed quantum dots and application for *in vivo* early tumor imaging." Dalton Trans **41**(16):4935-47.

Yong, K.-T., Law, W.-C., Hu, R., Ye, L., Liu, L., Swiharte, M.T. et Prasad, P.N. (2013). "Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies" Chem Soc Rev **42**:1236-1250.

Zhao, M.-X., Xia, Q., Feng, X.-D., Zhu, X.-H., Mao, Z.-W., Ji, L.-N. et Wang, K. (2010). "Synthesis, biocompatibility and cell labeling of L-arginine-functional β -cyclodextrin-modified quantum dot probes" Biomaterials **31**: 4401–4408.

Discussion

La nanotoxicologie est un domaine de recherche émergeant de la toxicologie. Les études actuelles et passées sur la nanotoxicité des PQs ont mené à des résultats intéressants, mais difficiles à comparer entre eux puisque les PQs ont chacune leurs propriétés physico-chimiques particulières et que les études utilisent différents tests et concentrations de NPs. La problématique associée à la difficulté de faire des analogies entre les études est aussi justifiée par l'absence de concordance entre les unités utilisées pour exprimer les concentrations de NPs utilisées (Yong, 2013).

Les études *in vitro*, récentes ou non, démontrent une toxicité à court et long terme (exposition variant entre une heure et vingt-deux jours) des différents types de PQs (CdSe/ZnS, InP/ZnS, GQDs, CdSe chargée + ou -, etc.) (Lewinski, 2008; Pelley, 2009; Wu, 2014). Une variété de cellules ont été utilisées pour les différentes études *in vitro*, on retrouve entre autres les cellules A549, NHBE (« *normal human bronchial epithelial* »), CHL (« *hamster chinese lung* »), Caco-2 (« *human colon carcinoma 2*»), HPeG2 (« *human caucasian hepatocyte carcinoma 2*»), etc. Les mécanismes de cytotoxicité de ce type de NPs sont connus et relèvent de la production de DRO conjuguée ou non à la dégradation des couches protectrices de ces NPs, libérant ainsi des ions toxiques (tels que le cadmium) (Tsoi, 2013).

Contrairement, à ces résultats effectués sur des cultures cellulaires, les conclusions retenues des études *in vivo* sont prometteuses, sans être suffisantes pour clore le débat sur l'absence de nanotoxicité chez les organismes vivants (Wu, 2014). Un faible nombre d'études réalisées *in*

in vivo ont démontré une absence de dommage tissulaire, de changements de comportement ou de poids, de modification de certains marqueurs hématologiques, d'inflammation ou de changements biochimiques ou histologiques chez les animaux ayant reçu une dose de PQs, même plusieurs mois après l'exposition initiale (Tsoi 2013; Yong, 2013). Toutefois, certaines analyses chez des souris ont établi qu'il y avait une atteinte à la prolifération des cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes) (Hoshino 2009; Wu, 2014) D'autres études ont obtenu des résultats suggérant une augmentation des transformations lymphoblastiques ou encore une suppression de l'immunocompétence (Wu, 2014). Dans plusieurs cas, les PQs ont généré une réponse immunitaire intense (expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires, infiltration de neutrophiles et lymphocytes et remodelage du tissu pulmonaire) (Ho, 2013; Wu, 2014). Une étude a également démontré la formation de granulomes au niveau du tissu pulmonaire (Ho, 2013). La dégradation *in vivo* des couches protectrices revêtant les PQs expose ainsi le noyau contenant les métaux et est responsable de la toxicité observée dans ces études (Wu, 2014; Yong, 2013).

Les résultats obtenus par les études *in vitro* et plusieurs des études *in vivo* indiquent une toxicité sur le vivant. Cependant, ce ne sont pas tous les résultats des études *in vivo* qui vont dans ce sens. La différence de complexité entre ces deux modèles peut altérer la réponse à un agent toxique et mener à des résultats qui ne prennent pas en compte l'architecture et les interactions entre les cellules (Tsoi, 2013). De plus, la nature particulière des NPs fait en sorte que l'exposition constante (*in vitro*) ou en flux (*in vivo*) peut modifier les réponses de cytotoxicité observées (Tsoi, 2013).

Les données de la littérature ont montré qu'il est devenu primordial de créer une série de tests et d'essais pour caractériser les NPs et permettre une comparaison entre les différentes études en nanotoxicité (Shvedova, 2010; Xia, 2006; Yong, 2013). Ces procédures communes de caractérisation pour l'exposition aux NPs et l'uniformisation des unités de mesures faciliteront la reproductibilité et la comparaison entre les études à la fois *in vitro* et *in vivo* (Tsoi , 2013; Yong , 2013). Les études antérieures ont montré que les propriétés physicochimiques particulières des NPs sont responsables de leurs interactions avec certains composants des essais de toxicité. Les molécules de surface ou les ions contenus dans les PQs (par exemple Zn^{2+}) ont été démontré comme pouvant interférer avec les réactions de réduction du MTT (Kroll, 2009). Du fait de leurs propriétés optiques, les NPs présentes dans les solutions de réactifs ou dans le milieu de culture peuvent directement influencer les lectures d'absorbance en augmentant l'absorption de lumière, ce qui a été prouvé avec le titanate de sodium (Kroll, 2009). Lorsqu'elles se produisent, la conséquence principale de ces interactions est une interprétation erronée des données de nanotoxicologie conduisant à de fausses conclusions (i.e. présence ou absence de nanotoxicité). La détermination de l'existence potentielle de ce type d'interférence entre les NPs et les composantes des essais de toxicité est donc aussi une étape importante dans les études de nanotoxicologie. Nous avons donc étudié les possibles interactions entre les PQs et les essais *in vitro* en effectuant des mesures préalables.

La première partie de ce projet a donc permis de valider l'utilisation des essais LDH et MTS en présence des PQs pour la détermination de la toxicité de ce type de PQs chez les cellules humaines A549. Ainsi, les PQs n'ont montré aucune interférence avec les essais LDH et MTS puisque les mesures d'absorbance sont restées constantes après les différentes périodes

d'incubation, et ce, quelques soient les concentrations de PQs (1 à 2000 µg/ml) utilisées dans la méthodologie (**Figure 3 et 16**).

En second lieu, pour explorer les mécanismes de toxicité des PQs, un essai de fluorescence pour mesurer les concentrations de cadmium a été utilisé. Il s'est avéré que des interactions existaient entre les composants du kit et le sérum de veau fœtal (SVF) ainsi que le milieu de culture. Ces interactions ont rendu l'utilisation de ce kit impossible dans ces conditions (**8 et 20**). De plus, un ou plusieurs des composants de cet essai ont également réagit avec les PQs et par le fait même invalidé l'utilisation de ce kit avec les PQs utilisés dans notre étude (**figure 11**). Une méthode alternative permettant de mesurer le cadmium intracellulaire ou dispersé dans le milieu de culture pourrait être la spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS).

D'autres facteurs peuvent affecter les essais de toxicité. Par exemple, l'essai LDH est significativement altéré dans des conditions de faibles pH alors que le substrat est désactivé par de hautes valeurs de pH (Kroll, 2009). L'essai colorimétrique MTT mesurant l'activité mitochondriale est également sensible aux valeurs de pH (Kroll, 2009). Il a été démontré que le spectre d'absorption du MTT est réduit en fonction du pH.

Dans le cadre des études de nanotoxicologie, il est aussi important de vérifier les composants des solutions de NPs pour s'assurer de l'absence d'impuretés, et aussi pour déterminer la présence de molécules qui modifient les PQs. Certaines solutions saturée de ligands ou de molécules amphiphiles modifient les PQs, tels que des groupements thiols, des anticorps ou de

l'acide mercaptopropionique (AMP) (Lewinski, 2008; Yong, 2013). Il est nécessaire de vérifier la présence de ces dernières molécules puisque les propriétés biologiques et physiques des PQs sont fortement influencées par ces molécules de surface. De plus, le diamètre hydrodynamique est directement relié à l'épaisseur de la couche surface (Yong, 2013). Dans de nombreuses applications, le volume de molécules inorganiques est grandement dépassé par le nombre de molécules organiques de surface (Yong, 2013). La compagnie Vive Nano ne précise pas de données à ce sujet pour les PQs utilisés dans cette étude.

La plupart des études portant sur les NPS utilisent des essais *in vitro* de viabilité ou de mesure du métabolisme cellulaire pour quantifier les risques potentielles de cytotoxicité lors de l'exposition aux PQs (Kroll, 2009; Wilhelmi, 2012).

Dans notre étude, des mesures de viabilité cellulaire ont permis de montrer une diminution marquée de l'activité mitochondriale après seulement seize heures d'incubation à une concentration de 2000 µg/ml comparativement aux faibles concentrations tel que 100 µg/ml. Les particules de PQs sont donc hautement cytotoxiques à court terme lorsque de fortes concentrations sont utilisées. L'exposition prolongée des cellules A549 à 100 µg/mL a induit une diminution marquée du métabolisme après soixante-douze heures d'incubation (**Figure 6**). Nos données indiquent que la toxicité des PQs étudiés est dépendante de la concentration et du temps d'exposition chez les cellules humaines A549.

Il est important de noter les limitations de l'utilisation de ces techniques qui ne sont pas conçues pour des molécules ou produits chimiques à l'échelle nanométrique (Wilhelmi, 2012).

Tout comme il est suggéré dans la littérature, les essais d'interférence en fonction de notre design expérimental et de multiples mesures d'un seul paramètre (mesures de densité optique et de fluorescence en présence des différents réactifs, sans cellules ni PQs) ont été effectués (Wilhelmi, 2012). Nous avons donc suivi cette procédure pour étudier les effets des PQs étudiés chez les cellules A549 comme première investigation en préparation aux étapes suivantes de ce projet de recherche qui utiliseront le modèle de cellules EpiAirway™ provenant de patients asthmatiques ou de sujets sains.

Ces modèles *in vitro* plus complexes seront utilisés pour compléter un aspect de ce projet concernant les voies d'exposition aux différentes NPs. Actuellement, il n'existe pas de véritables données factuelles à ce sujet (Wu, 2014). Que ce soit en milieu de travail, dans l'environnement ou le milieu biomédical, les NPs sont actuellement utilisées dans de nombreux produits de consommation et cette notion doit être prise en compte lors des études, en utilisant des sujets sains, atteints de différentes pathologies ou vulnérables (Holgate, 2007; Nohynek, 2007). La toxicité peut non seulement s'avérer importante à court terme, mais aussi s'accroître, perdurer dans le temps ou finalement induire des dommages dans certains cas particuliers (causer des dommages au système reproducteur, traverser la barrière placentaire ou hémato-encéphalique, etc.) (Tsoi, 2013)

Les résultats de toxicité soulèvent une importante question en ce qui a trait à la santé et sécurité au travail, en plus des questions biomédicales soulevées précédemment. Les travailleurs exposés aux nanoparticules courent également des risques liés à la santé. Les risques de toxicité associés aux expositions prolongées les concernent directement. S'ajoute

également à cette problématique, la condition physique dans laquelle se trouvent les personnes exposées. Les personnes asthmatiques ou fumeuses qui sont exposées aux NPs courent-elles plus de risques? Les personnes atteintes de MPOC ou d'autres pathologies respiratoires sont-elles plus susceptibles de souffrir rapidement de l'exposition ? Les réactions inflammatoires et l'état vulnérable des voies respiratoires comparativement aux personnes en bonne santé sont-ils des facteurs qui peuvent aggraver la situation ? Les seuils de toxicité seront possiblement différents d'un état pathologique à l'autre, et ainsi devront influencer les designs expérimentaux.

Nous n'avons pour l'instant pas de réponses à ces questions. Cependant, plusieurs études *in vivo* dans des modèles animaux d'asthme expérimental ont démontré une augmentation des marqueurs allergiques (tels que IgE, LTE4, cytokines de type Th2, IL-13, etc.), une infiltration accrue de cellules dans le tissu pulmonaire (neutrophiles, lymphocytes et éosinophiles), une aggravation de la réponse inflammatoire, un remodelage des voies respiratoires (hyperplasie des cellules à gobelet et hypertrophie des cellules musculaires lisses des bronches) et dans certains cas des dommages épithéliaux et de l'œdème pulmonaire. Différentes classes de NPs ont induit ces changements telles que les NTCMPs, les NPs d'argent ou de type TiO₂ (Inoue, 2009; Hussain, 2011; Chuang, 2013). Il peut s'avérer critique de ne pas tenir compte de la condition respiratoire des patients exposés aux NPs vu les effets nanotoxicologiques amplifiés dans ces cas de figure.

L'inhalation étant le principal mode d'exposition, cette voie devra donc également être prise en considération dans les études portant sur la nanotoxicité des PQs. Dans nos études, la

nanotoxicité des PQs étudiés est dépendante de la concentration et du temps d'exposition chez les cellules humaines A549. De telles observations ont d'importantes répercussions sur les applications potentielles des PQs telles que le marquage des cellules, l'imagerie des tissus, la technologie de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*), les transporteurs de médication contre le cancer et la détection par cytométrie en flux de biomarqueurs (autoanticorps, cellules T spécifiques de tumeur, cellules cancéreuses circulant dans le sang, etc.) (Akinfiyeva, 2013; Zhang, 2011). Les injections répétées ainsi que les traitements sur de longues périodes entraîneront des expositions prolongées à de faibles concentrations qui pourraient avoir des répercussions sur la santé des patients. Le développement de nouvelles couches protectrices, l'utilisation de matériaux de moindre toxicité ou la combinaison de différents PQs pour les traitements biomédicaux sont des avenues possibles pour réduire les risques associés à l'utilisation des PQs en médecine.

Les études portant sur les récents développements concernant les PQs devront porter une attention particulière à ce qui a déjà été relevé dans la littérature pour s'assurer que les avancés en terme de matériaux composants les PQs et de couches protectrices empêchent la dégradation de ces dernières et la libération d'ions toxiques dans le milieu, la bioaccumulation et la production de DRO qui sont responsables de la cytotoxicité des PQs.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que les expositions prolongées (soixante-douze heures) des cellules A549 aux PQs 100 µg/ml ont induit une diminution marquée de l'activité mitochondriale. Les PQs de type CdTe/CdS présentent donc une cytotoxicité à long terme à des concentrations sans effet à court terme, chez les cellules épithéliales alvéolaires humaines. Notre étude expose donc toute l'importance d'étudier les effets des NPs à court et à long terme en fonction de la concentration de ces nanomatériaux. La deuxième partie de notre étude a porté sur la détermination des mécanismes de toxicité potentiellement associé aux PQs, en particulier la mesure du cadmium libéré de la structure chimique des PQs. Nous avons montré que la mesure du cadmium libre ou contenu dans les cellules après interactions avec les PQs comportaient plusieurs interférences qui invalident cet essai. En conclusion, notre étude a permis d'identifier des problèmes d'interférences des essais de cytotoxicité et de mesure du cadmium libre, et de ce fait elle remet en question plusieurs conclusions d'études publiées qui n'ont pas vérifiées ces interférences.

Nous avons mis au point les conditions expérimentales pour déterminer la cytotoxicité des points quantiques de type CdTe/CdS pour notre future étude sur la démonstration de la nécessité d'établir des normes de sécurité pour l'exposition aux nanoparticules prenant en compte la condition respiratoire du travailleur.

Perspectives

La suite de ce projet permettra de prendre en considération l'état respiratoire du patient ainsi que les modes d'exposition à privilégier. En effet, les expérimentations seront effectuées sur des cellules EpiAirway™ de la compagnie MatTek afin de permettre un mode d'exposition *in vitro* qui se rapprochera le plus possible de l'épithélium bronchique grâce à sa structure en 3D et à la différenciation cellulaire présente dans ce modèle. Également, les cellulesensemencées sur ces plaques proviendront de personnes normales ou de patients asthmatiques permettant ainsi de déterminer les conséquences de la pathologie respiratoire sur la réponse aux NPs et leurs effets nanotoxicologiques.

Les prochaines études auront pour but de déterminer la libération d'ions cadmium en utilisation une autre technologie et les mécanismes de mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Basé sur des études ayant mis en évidence l'action toxique des PQs par l'induction du stress oxydatif et de réponses inflammatoires, nous vérifierons aussi les niveaux de production de chimiokines et d'isoprostane. Finalement, la localisation cellulaire ayant été identifiée comme un facteur déterminant dans la cytotoxicité des PQs, nous déterminerons par microscopie à épifluorescence avec analyse par déconvolution le compartiment cellulaire où se situent les PQs (noyau ou cytoplasme).

Sources documentaires

Akinfieva, O., Nabiev, Igor et Sukhanova, A. (2013). "New directions in quantum dot-based cytometry detection of cancer serum markers and tumor cells" Critical Reviews in Oncology/Hematology **86**:1–14.

Asha Jhonsi, M., Kathiravan, A. et Renganathan, R. (2009). "Spectroscopic studies on the interaction of colloidal capped CdS nanoparticles with bovine serum albumin." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **72**: 167–172.

Ballou, B., B. C. Lagerholm, et al. (2004). "Noninvasive imaging of quantum dots in mice." Bioconjug Chem **15**(1): 79-86.

Barnes, P. J. (2008). "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Nat Rev Immunol **8**(3): 183-192.

Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A. et Wick, P. (2007). "The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction." Carbon **45**(13): 2643-2648.

Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., Lyng, F.M., Byrne, H.J. et Chambers, G. (2007a). "Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing." Carbon **45**: 34–40.

Casey, A., Herzog, E., Davoren, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J. et Chambers, G. (2007b). "Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity" Carbon **45**: 1425–1432.

Casey, A., E. Herzog, et al. (2008). "Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells." Toxicol Lett **179**(2): 78-84.

Chakir, J., J. Shannon, et al. (2003). "Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1293-1298.

Chan, W. H., N. H. Shiao, et al. (2006). "CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals." Toxicol Lett **167**(3): 191-200.

Chang, E., N. Thekkek, et al. (2006). "Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake." Small **2**(12): 1412-1417

- Charlesworth, E. N., O. Iliopoulos, et al. (1989). "Cells and secretagogues involved in the human late-phase response." Int Arch Allergy Appl Immunol **88**(1-2): 50-53.
- Chawla, P., V. Chawla, et al. (2010). "Fullerenes: from carbon to nanomedicine." Mini Rev Med Chem **10**(8): 662-677.
- Chuang, H.-C., Hsiao, T.-C., Wu, C.-K., Chang, H.-H., Lee, C.-C., Chang, C.-C. et Cheng, T.-J. (2013). "Allergenicity and toxicology of inhaled silver nanoparticles in allergen-provocation mice models" International Journal of Nanomedicine **8**:4495–4506.
- Chung, K. F. and I. M. Adcock (2001). "Pathophysiological mechanisms of asthma. Application of cell and molecular biology techniques." Mol Biotechnol **18**(3): 213-232.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Crosera, M., M. Bovenzi, et al. (2009). "Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature." Int Arch Occup Environ Health **82**(9): 1043-1055.
- Dabbagh, K., K. Takeyama, et al. (1999). "IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia *in vitro* and *in vivo*." J Immunol **162**(10): 6233-6237.
- Delehanty, J. B., C. E. Bradburne, et al. (2010). "Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol: escaping from the endolysosomal system." Integr Biol (Camb) **2**(5-6): 265-277.
- Derfus, A. M., Chan W. C. W. et Bhatia S. N. (2003). "Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots." Nano Lett **4**(1): 11-18.
- Diagaradjane, P., A. Shetty, et al. (2008). "Modulation of *in vivo* tumor radiation response via gold nanoshell-mediated vascular-focused hyperthermia: characterizing an integrated antihypoxic and localized vascular disrupting targeting strategy." Nano Lett **8**(5): 1492-1500.
- Dickey, B. F., J. K. Walker, et al. (2010). "beta-Adrenoceptor inverse agonists in asthma." Curr Opin Pharmacol **10**(3): 254-259.
- Domagala-Kulawik, J. (2008). "Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity." J Physiol Pharmacol **59** Suppl 6: 19-34.
- Duncan, T. V. (2011). "The communication challenges presented by nanofoods." Nat Nanotechnol **6**(11): 683-688.
- El-Ansary, A. and S. Al-Daihan (2009). "On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview." J Toxicol **2009**, Article ID754810.

- Erjefalt, J. S., M. Korsgren, et al. (1997). "Association between inflammation and epithelial damage-restitution processes in allergic airways *in vivo*." Clin Exp Allergy **27**(11): 1344-1355.
- Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." Nat Rev Cancer **5**(3): 161-171.
- Firme, C. P., 3rd and P. R. Bandaru (2010). "Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems." Nanomedicine **6**(2): 245-256.
- Gao, X., J. Chen, et al. (2008). "Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for *in vivo* brain imaging." Bioconjug Chem **19**(11): 2189-2195.
- Geys, J., A. Nemmar, et al. (2008). "Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge." Environ Health Perspect **116**(12): 1607-1613.
- Glader, P., S. Moller, et al. (2006). "Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells." Respir Med **100**(5): 818-827.
- Gomes, S.A.O., Vieira, C.S., Almeida, D.B., Santos-Mallet, J.R., Menna-Barreto, R.F.S., Cesar, C.L. et Feder, D. (2011). "CdTe and CdSe Quantum Dots Cytotoxicity: A Comparative Study on Microorganisms." Sensors **11**: 11664-11678.
- Hagens, W. I., A. G. Oomen, et al. (2007). "What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?" Regul Toxicol Pharmacol **49**(3): 217-229.
- Haitchi, H. M., R. M. Powell, et al. (2005). "ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs." Am J Respir Crit Care Med **171**(9): 958-965.
- Hamanaka, R.B. et Chandel, N.S. (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes" Trends Biochem Sci **35**(9):505-513.
- Hanaki, K., A. Momo, et al. (2003). "Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 496-501.
- Harhaji, L., A. Isakovic, et al. (2007). "Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene." Eur J Pharmacol **568**(1-3): 89-98.
- Hardman, R. (2006). "A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors." Environ Health Perspect **114**(2): 165-172
- Hauck, T. S., R. E. Anderson, et al. (2010). "*In vivo* quantum-dot toxicity assessment." Small **6**(1): 138-144.

- Hoet, P. H., I. Bruske-Hohlfeld, et al. (2004). "Nanoparticles - known and unknown health risks." J Nanobiotechnology **2**(1): 12.
- Hogg, J. (2004). "Peripheral lung remodelling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **24**(6): 893-894.
- Holgate, S. T. (2007). "Epithelium dysfunction in asthma." J Allergy Clin Immunol **120**(6): 1233-1244; quiz 1245-1236.
- Holgate, S. T. (2008). "The Airway Epithelium is Central to the Pathogenesis of Asthma." Allergology International **57** :1-10.
- Hong, M. M., J. M. Oh, et al. (2008). "Encapsulation of flavor molecules, 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid, into layered inorganic nanoparticles for controlled release of flavor." J Nanosci Nanotechnol **8**(10): 5018-5021.
- Hoshino, A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K. et Yamamoto K. (2004). "Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification." Nano Letters **4**(11): 2163–2169.
- Hoshino, A., Hanada, S., Manabe, N., Nakayama, T. et Yamamoto, K. (2009). "Immune response induced by fluorescent nanocrystal quantum dots *in vitro* and *in vivo*" IEEE Trans Nanobioscience **8**(1) : 51-57.
- Hossain, S., H. N. Liu, et al. (2009). "Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in oligodendrocytes." Neurotoxicology **30**(4): 544-554.
- Hussain, S., Vanoirbeek, J.A.J., Luyst, K., De Vooght, V., Verbeken, E., Thomassen, L.C.J., Martens, J.A., Dinsdale, D., Boland, S., Marano, F., Nemery, B. et Hoet, P.H.M. (2011). "Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model" Eur Respir J **37**(2): 299–309.
- Iga, A. M., J. H. Robertson, et al. (2007). "Clinical potential of quantum dots." J Biomed Biotechnol **2007**(10): 76087.
- Inoue, K.-I., Koike, E., Yanagisawa, R., Hirano, S., Nishikawa, M. et Takano, H. (2009). "Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model" Toxicology and Applied Pharmacology **237**(3):306–316.
- Isakovic, A., Z. Markovic, et al. (2006). "Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene." Toxicol Sci **91**(1): 173-183.

- Jacobsen, N. R., G. Pojana, et al. (2008). "Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark Mouse lung epithelial cells." Environ Mol Mutagen **49**(6): 476-487.
- Jaiswal, J. K., H. Mattoussi, et al. (2003). "Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates." Nat Biotechnol **21**(1): 47-51.
- Jalilehvand, F., Amini, Z., Parmar, K. et Kang, E.Y. (2011). "Cadmium(II) N-acetylcysteine complex formation in aqueous solution" Dalton Trans **40**: 12771–12778.
- Jeffery, P. K. (1992). "Pathology of asthma." Br Med Bull **48**(1): 23-39.
- Jeffery, P. K. (2001). "Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 2): S28-38.
- Johnston, H. J., G. R. Hutchison, et al. (2009). "Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics." Part Fibre Toxicol **6**: 33.
- Jungkyun, I., Kaustabh, K.M., Wanil, K., Kyong-Tai, K. et Sung-Kee, C. (2011). "Cellular Uptake Properties of the Complex Derived from Quantum Dots and G8 Molecular Transporter." Bull Korean Chem Soc **32**(4): 1282-1292.
- Kirchner, C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A. M., Gaub, H. E., Stölzle S., Fertig N. et Parak W. J. (2005). "Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles." Nano Letters **5**(2): 331-338.
- Kondoh, M., S. Araragi, et al. (2002). "Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells." Toxicology **170**(1-2): 111-117.
- Kroll, A., M. H. Pillukat, et al. (2009). "Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges." Eur J Pharm Biopharm **72**(2): 370-377.
- Kindt, T.J., Osborne, B.A. et Goldsby, R.A. (2007). "Kuby Immunology." 6th Edition, Freeman, W.H. & Company. ISBN-13: 978-1429202114.
- Larson, D. R., W. R. Zipfel, et al. (2003). "Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*." Science **300**(5624): 1434-1436.
- Lewinski, N., V. Colvin, et al. (2008). "Cytotoxicity of nanoparticles." Small **4**(1): 26-49.

- Li, J. G., W. X. Li, et al. (2007). "Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation." Environ Toxicol **22**(4): 415-421.
- Liang, F. and B. Chen (2010). "A review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes." Curr Med Chem **17**(1): 10-24.
- Long, T. C., N. Saleh, et al. (2006). "Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity." Environ Sci Technol **40**(14): 4346-4352.
- Lopez, E., S. Figueroa, et al. (2003). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture." Br J Pharmacol **138**(5): 901-911.
- Lovric, J., H. S. Bazzi, et al. (2005a). "Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots." J Mol Med (Berl) **83**(5): 377-385.
- Lovric, J., S. J. Cho, et al. (2005b). "Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death." Chem Biol **12**(11): 1227-1234.
- Luczak, M.W. et Zhitkovich, A. (2013) "Role of direct reactivity with metals in chemoprotection by N-acetylcysteine against chromium(VI), cadmium(II), and cobalt(II)" Free Radical Biology and Medicine **65**:262–269.
- Maunder, H., S. Patwardhan, et al. (2007). "Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke *in vitro*." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(5): L1248-1256.
- McNeil, S. E. (2005). "Nanotechnology for the biologist." J Leuk Biol, **78**: 585-594.
- Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R. et Mattoussi, H. (2005). "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing." Nat Mater **4**(6):435-46.
- Mehta, H., K. Nazzal, et al. (2008). "Cigarette smoking and innate immunity." Inflamm Res **57**(11): 497-503.
- Moller, P., N. R. Jacobsen, et al. (2010). "Role of oxidative damage in toxicity of particulates." Free Radic Res **44**(1): 1-46.
- Monteiro-Riviere, N. A., A. O. Inman, et al. (2009). "Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line." Toxicol Appl Pharmacol **234**(2): 222-235.

- Naveenraj, S., S. Anandan, et al. (2010). "The interaction of sonochemically synthesized gold nanoparticles with serum albumins." J Pharm Biomed Anal **53**(3): 804-810.
- Nemmar, A., P. H. Hoet, et al. (2002). "Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans." Circulation **105**(4): 411-414.
- Nohynek, G. J., J. Lademann, et al. (2007). "Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety." Crit Rev Toxicol **37**(3): 251-277.
- Nguyen, K. C., V. L. Seligy, et al. (2012). "Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to *Pseudomonas aeruginosa*." Nanotoxicology. Epub ahead of print.
- Oettgen, H. C. and R. S. Geha (2001). "IgE regulation and roles in asthma pathogenesis." J Allergy Clin Immunol **107**(3): 429-440.
- Ostiguy, C., Lapointe, G., Ménard, L., Cloutier, Y., Trottier, M., Boutin, M., Antoun, M. et Normand, C. (2006). "Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures." Studies and Research Projects / Report R-470, Montréal, IRSST, 100 pages.
- Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L. et Trottier, M. (2008). "Health Effects of Nanoparticles - Second Edition." Studies and Research Projects / Report R-589, Montréal, IRSST, 114 pages.
- Pacurari, M., X. J. Yin, et al. (2008). "Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kappaB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells." Environ Health Perspect **116**(9): 1211-1217.
- Pacurari, M., V. Castranova, et al. (2010). "Single- and multi-wall carbon nanotubes versus asbestos: are the carbon nanotubes a new health risk to humans?" J Toxicol Environ Health A **73**(5): 378-395.
- Partha, R. and J. L. Conyers (2009). "Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials." Int J Nanomedicine **4**: 261-275.
- Pelley, J. L., A. S. Daar, et al. (2009). "State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots." Toxicol Sci **112**(2): 276-296.
- Prasad, B. R., N. Nikolskaya, et al. (2010). "Long-term exposure of CdTe quantum dots on PC12 cellular activity and the determination of optimum non-toxic concentrations for biological use." J Nanobiotechnology **8**: 7.

- Przybytkowski, E., M. Behrendt, et al. (2009). "Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability." FEBS J **276**(21): 6204-6217.
- Puchelle, E., J. M. Zahm, et al. (2006). "Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **3**(8): 726-733.
- Puddicombe, S. M., R. Polosa, et al. (2000). "Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma." FASEB J **14**(10): 1362-1374.
- Ramos-Barbon, D., J. F. Presley, et al. (2005). "Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma." J Clin Invest **115**(6): 1580-1589.
- Rouse, J. G., J. Yang, et al. (2007). "Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin." Nano Lett **7**(1): 155-160.
- Ryman-Rasmussen, J. P., J. E. Riviere, et al. (2006). "Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties." Toxicol Sci **91**(1): 159-165.
- Saetta, M. (1998). "[Mechanisms of bronchial obstruction in COPD and emphysema: from anatomopathology to respiratory function]." Rev Mal Respir **15** Suppl 2: S17-19.
- Scheringer, M. (2008). "Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials." Nat Nanotechnol **3**(6): 322-323.
- Schipper, M. L., N. Nakayama-Ratchford, et al. (2008). "A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice." Nat Nanotechnol **3**(4): 216-221.
- Conner, S. D. et Schmid, S. L. (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**: 37-44.
- Shvedova, A. A., E. R. Kisin, et al. (2009). "Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?" Pharmacol Ther **121**(2): 192-204.
- Simon-Deckers, A., B. Gouget, et al. (2008). "*In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes." Toxicology **253**(1-3): 137-146.
- Singh, N., Manshian B., Jenkins G. J., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J. et Doak S. H. (2009). "NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials." Biomaterials **30**(23-24): 3891-914.
- Slezakova, K., Morais, S. et Do Carmo Pereira, M. (2013). "Atmospheric Nanoparticles and Their Impacts on Public Health, Current Topics in Public Health" Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed.), ISBN: 978-953-51-1121-4, InTech, DOI: 10.5772/54775. Available from:

<http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-public-health/atmospheric-nanoparticles-and-their-impacts-on-public-health>

Sozer, N. and J. L. Kokini (2009). "Nanotechnology and its applications in the food sector." Trends Biotechnol **27**(2): 82-89.

Su, Y., He Y., Lu H., Sai L., Li Q., Li W., Wang L., Shen P., Huang Q. et Fan C. (2009). "The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase – Synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating." Biomaterials **30**(1):19-25.

Su, Y., M. Hu, et al. (2010). "The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties." Biomaterials **31**(18): 4829-4834.

Sumi, Y. and Q. Hamid (2007). "Airway remodeling in asthma." Allergol Int **56**(4): 341-348.

Tabet, L., C. Bussy, et al. (2009). "Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells." J Toxicol Environ Health A **72**(2): 60-73.

Takatsu, K. and H. Nakajima (2008). "IL-5 and eosinophilia." Curr Opin Immunol **20**(3): 288-294.

Tian, W. Q., L. V. Liu, et al. (2006). "Electronic properties and reactivity of Pt-doped carbon nanotubes." Phys Chem Chem Phys **8**(30): 3528-3539.

Tsoi, K.M., Dai, Q., Alman, B. A. et Chan, W.C.W. (2013). "Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies" Accounts of Chemical Research **46**(3):662–671.

Vougioukalakis, G. C., M. M. Roubelakis, et al. (2010). "Open-cage fullerenes: towards the construction of nanosized molecular containers." Chem Soc Rev **39**(2): 817-844.

Voura, E. B., J. K. Jaiswal, et al. (2004). "Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy." Nat Med **10**(9): 993-998.

Wang, B., W. Y. Feng, et al. (2006). "Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice." Toxicol Lett **161**(2): 115-123.

Warheit, D. B., B. R. Laurence, et al. (2004). "Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats." Toxicol Sci **77**(1): 117-125.

Watjen, W., M. Cox, et al. (2002). "Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation." Biometals **15**(1): 15-25.

Wilhelmi, V., U. Fischer, et al. (2012). "Evaluation of apoptosis induced by nanoparticles and fine particles in RAW 264.7 macrophages: facts and artefacts." Toxicol In Vitro **26**(2): 323-334.

Witschger, O. et Fabriès, J.F. (2005). "Particules ultra-fines et santé au travail 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé, INRS – Hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires – 2e trimestre." **199**: 21-35.

Worle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, et al. (2006). "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." Nano Lett **6**(6): 1261-1268.

Wu, T. et Tang, M. (2014). "Toxicity of quantum dots on respiratory system" Inhalation toxicology **26**(2):128–139.

Xia, T., M. Kovichich, et al. (2006). "Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm." Nano Lett **6**(8): 1794-1807.

Xiao, Y., S. P. Forry, et al. (2010). "Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake." J Nanobiotechnology **8**: 13.

Xu, A., Y. Chai, et al. (2009). "Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in gpt delta transgenic MEF cells." Part Fibre Toxicol **6**: 3.

Xue, L., G. Li, et al. (2011). "Ratiometric fluorescent sensor based on inhibition of resonance for detection of cadmium in aqueous solution and living cells." Inorg Chem **50**(8): 3680-3690.

Yang, W., J. I. Peters, et al. (2008). "Inhaled nanoparticles--a current review." Int J Pharm **356**(1-2): 239-247.

Yong, K.-T., Law, W.-C., Hu, R., Ye, L., Liu, L., Swiharte, M.T. et Prasad, P.N. (2013). "Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies" Chem Soc Rev **42**:1236-1250.

Yssel, H., C. Abbal, Pène, J. et Bousquet, J. (1998). "The role of IgE in asthma." Clin Exp Allergy **28** Suppl 5: 104-109; discussion 117-108.

Zhang, L., Niu, W., Yang, H. et Pan, M. (2011). "Application of quantum dots in biomedical detection" Journal of Biomedical Engineering **28**(3):636-639.

Zhang, L.W. et Monteiro-Riviere, N.A. (2009). "Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake." Toxicol Sci **110**(1):138-55.

Zhang, T., Stilwell J. L., Gerion D., Ding L., Elboudwarej O., Cooke P. A., Gray, J. W., Alivisatos A. P. et Chen F. F. (2006). "Cellular Effect of High Doses of Silica-Coated

Quantum Dot Profiled with High Throughput Gene Expression Analysis and High Content Cellomics Measurements." Nano Letters **6**(4): 800-808.