

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

## **MODULATION DES FONCTIONS DES EOSINOPHILES HUMAINS PAR LES NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC**

Par

Luis Rafael Silva Méndez

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences expérimentales de la santé

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

M. Jacques Bernier, PhD  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Nicolas Flamand, PhD  
Département de médecine  
Université Laval

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD  
INRS-Institut Armand-Frappier

## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit d'un travail intense ayant été réalisé à l'aide de nombreuses personnes, sans qui il m'aurait été impossible de réussir. Il m'apparaît essentiel de souligner leur contribution et de les en remercier. La générosité à mon égard dont vous avez fait preuve restera pour toujours gravée dans ma mémoire et dans mon cœur.

D'abord, je remercie mon directeur de maîtrise, Dr. Denis Girard. Merci de m'avoir donné la chance de faire partie de ton labo. Merci d'avoir su faire ressortir le meilleur de moi, tel un coach qui encourage ses joueurs à se dépasser à chaque instant. Il aurait été facile pour moi de perdre le nord pendant le projet et de sombrer dans le découragement. Cependant, tu as su me guider et me rassurer dans les moments de doute.

Ensuite, je remercie mes collègues de laboratoire: Claudie, David, Francis A, Francis V, Isabelle, Jean-Christophe, Kim, Maxime, Michelle, Rafael L, Rafael R, Valérie et Yannick. Vous avez été d'une grande générosité envers moi. J'ai beaucoup apprécié nos discussions et les conseils (pas toujours scientifiques) dont vous m'avez faits profiter. De plus, mes qualités de hockeyeur seraient encore inexistantes sans votre patience! Enfin, j'ai adoré notre esprit d'équipe et notre complicité. Le labo Girard c'est définitivement une famille tissée serrée.

Une autre mention particulière va à mes parents. Sans vous je n'aurais jamais atterri ici, dans tous les sens du terme. Merci pour votre appui inconditionnel. Le temps m'a permis de mieux comprendre tous les sacrifices que vous avez dû faire pour mes frères et moi. Je suis chanceux de vous avoir pour modèles de persévérance, de détermination de résilience et de bienveillance.

Finalement, un très grand merci Katherine, avec qui je partage ma vie depuis toutes ces années. Nous avons grandi ensemble depuis le début de nos études et l'aboutissement de celles-ci est à mes yeux un travail d'équipe. Merci pour toutes ces soirées à étudier ou à travailler ensemble. Merci pour tous ces mots d'encouragement lorsque ma confiance commençait à fléchir. Merci pour ton amour, ta patience et ta bonté. Tu es une femme exceptionnelle d'une détermination parfois déconcertante. Nous formons une équipe formidable et ensemble il n'y a rien qui nous est impossible.

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures et des tableaux.....	vi
Liste d'abréviations.....	vii
Résumé.....	ix
Abstract.....	x
Introduction.....	1
PREMIÈRE SECTION: <i>SYNTHÈSE</i> .....	3
Chapitre 1 : Les nanoparticules.....	4
1.1 Les NPs et leur effet sur l'environnement.....	4
1.1.1 Définition des nanoparticules et importance de la nanotoxicologie.....	4
1.1.2 Les types de nanoparticules.....	5
1.1.3 Les nanoparticules dans l'environnement.....	6
1.1.4 L'exposition humaine aux nanoparticules.....	7
1.1.5 L'exposition aux NPs : effets sur les modèles murins et sur les humains ..	10
1.2 Les NPs d'oxydes métalliques.....	13
1.2.1 Exemples d'utilisation.....	13
1.2.2 Propriétés caractéristiques.....	14
1.2.3 Caractérisation des propriétés physicochimiques.....	15
1.3 Les NPs d'oxyde de zinc.....	17
1.3.1 Le zinc et son importance dans l'organisme.....	17
1.3.2 Historique de l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de zinc.....	18
1.3.3 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de zinc.....	18
1.3.4 Effets <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des nanoparticules d'oxyde de zinc.....	20
Chapitre 2 : L'inflammation.....	28
2.1 Le système immunitaire.....	28
2.2 L'inflammation.....	29

2.2.1	L'inflammation aigue.....	29
2.2.2	L'inflammation chronique.....	30
2.2.3	Les éosinophiles : des cellules de l'inflammation.....	30
Chapitre 3 : Les éosinophiles.....		33
3.1	Que sont les éosinophiles ?.....	33
3.1.1	Devenir un éosinophile.....	33
3.1.2	Morphologie caractéristique.....	36
3.1.3	Marqueurs de surface.....	38
3.1.4	Trafic cellulaire.....	41
3.1.5	Fonctions sécrétoires.....	43
3.1.6	Production d'espèces réactives de l'oxygène.....	45
3.1.7	L'équilibre entre la survie et la mort des éosinophiles.....	47
3.2	Implications dans les pathologies humaines et la santé.....	50
3.2.1	Défense contre les vers parasites.....	51
3.2.2	Asthme hyperéosinophilique.....	52
3.2.3	Autres maladies avec implication éosinophilique.....	53
3.2.4	Autres implications éosinophiliques dans la santé humaine.....	55
3.2.5	L'hypothèse <i>LIAR</i> .....	56
3.3	L'effet des nanoparticules sur les éosinophiles; des preuves indirectes !.....	58
Question de recherche, hypothèse et objectifs.....		60
DEUXIÈME SECTION: <i>ARTICLE</i> .....		61
Chapitre 4: Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ and IL-8.....		62
4.1	Présentation de l'article.....	62
4.2	Article.....	63
4.2.1	Highlights.....	63
4.2.2	Abstract.....	64
4.2.3	Introduction.....	64
4.2.4	Materials and methods.....	66

4.2.5	Results .....	68
4.2.6	Discussion .....	77
4.2.7	Conclusion.....	79
4.2.8	Conflict of interest.....	80
4.2.9	Acknowledgement.....	80
4.2.10	References .....	80
Chapitre 5: discussion et conclusion.....		84
Références .....		91

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## Liste des figures

<b>Figure 3.1.</b> Les précurseurs des éosinophiles et facteurs de transcription impliqués dans l'éosinophilopoïèse humaine.....	35
<b>Figure 3.2.</b> Les étapes de l'extravasation des éosinophiles vers le site inflammatoire et les protéines impliquées.....	42
<b>Figure 3.3.</b> Les fonctions des éosinophiles pendant la santé et pendant les maladies : l'hypothèse LIAR.....	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1.</b> Voies d'expositions liées au milieu du travail aux NPs selon leur méthode de synthèse.....	8
<b>Tableau 1.2.</b> Voies d'exposition de la population générale ou de consommateurs pour divers types de produits.....	9
<b>Tableau 1.3.</b> Biodistribution des nanoparticules d'or selon la taille (10-250 nm).....	11
<b>Tableau 1.4.</b> Exemples de produits sur le marché contenant des nanoparticules.....	14
<b>Tableau 1.5.</b> Exemples de techniques de synthèse et morphologies des NPs associées.....	19
<b>Tableau 1.6.</b> Survol des études <i>in vivo</i> récentes traitant de l'effet de l'exposition aux NPs ZnO.....	24
<b>Tableau 1.7.</b> Survol des études <i>in vitro</i> récentes traitant de l'effet de l'exposition aux NPs ZnO.....	25

## LISTE D'ABRÉVIATIONS

ARNm acide ribonucléique messenger  
ATP adenosine triphosphate  
BCL-xL *B-cell lymphoma-extra large*  
CD(...) *cluster of differentiation*  
CD45RA récepteur alpha du CD45  
C/EBP(...) *CCAAT/enhancer-binding protein*  
Cellules NK cellules *natural killers*  
CMHII complexe majeur d'histocompatibilité de classe II  
CXCL(...) chimiokine à motif CXC ligand  
DAMPs *damage-associated molecular patterns*  
Filtre HEPA filtre à air de particules de haute efficacité  
FOG-1 *friend of GATA protein 1*  
GATA(...) *GATA-binding factor*  
ICAM(...) molécule d'adhésion intracellulaire  
IL(...) interleukine  
Ig(...) immunoglobulins  
IP3 inositol 1,4,5-triphosphate  
LPS lipopolysaccharide  
MAPK *mitogen-activated protein kinases*  
MCP-1 *monocyte chemoattractant protein 1*  
MMP(...) matrice métallopeptidase  
NF- $\kappa$ B *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NPs nanoparticules  
PAF *platelet activating factor*  
PAMPs *pathogen-associated molecular patterns*  
PEG polyéthylène glycol  
PU.1 facteur de transcription PU.1  
RCPG récepteur couplé aux protéines G  
TCR $\gamma\delta$  récepteur des cellules T de type gamma delta  
TGF- $\beta$  *transforming growth factor beta*  
TLR *toll like receptor*  
TNF $\alpha$  *tumor necrosis factor alpha*

TNFSF13 *tumor necrosis factor ligand superfamily member 13*

VCAM-1 *vascular cell adhesion protein 1*



## RÉSUMÉ

Les nanoparticules (NPs) sont des matériaux nanométriques dont l'utilisation augmente sans cesse. Celles-ci possèdent des propriétés physicochimiques intéressantes, accessibles à cause de leur grand ratio aire de surface sur volume. Or, à ce jour, la caractérisation des effets toxicologiques induits par les NPs sur l'humain est déficiente.

Des études menées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que les fonctions des granulocytes humains (des polymorphonucléaires neutrophiles) sont modulées par diverses NPs. Par ailleurs, les NPs d'oxyde de zinc (NPs ZnO) activent les neutrophiles humains, retardant leur apoptose spontanée et favorisant leur dégranulation *in vitro*. De plus, des études menées sur des modèles murins ont démontré que certaines NPs, dont les NPs ZnO, induisent une hyperéosinophilie pulmonaire. Considérant que les éosinophiles sont un autre type de granulocyte humain et qu'ils sont impliqués dans la régulation des réponses immunitaires, notre objectif a été d'évaluer si les NPs ZnO sont également en mesure de réguler les fonctions des éosinophiles humains.

Pour ce faire, nous avons étudié l'effet des NPs ZnO sur la morphologie des éosinophiles ainsi que sur cinq autres de leurs fonctions cellulaires clés soit: la production d'espèces réactives de l'oxygène, la viabilité cellulaire, la synthèse *de novo* de protéines, l'activité gélatinasiqne et la libération de cytokines. Nos résultats nous ont permis d'établir que les NPs ZnO modulent certaines fonctions cellulaires des éosinophiles similairement à ce qui avait été observé chez les neutrophiles (retard de l'apoptose spontanée, induction synthèse de protéines), mais d'autres fonctions ne sont pas modulées (morphologie, activité gélatinasiqne).

En conclusion, nous démontrons que les éosinophiles sont une cible importante des NPs ZnO. Ainsi, il faudra tenir en considération les possibles interactions NPs-éosinophiles lors de la mise au point de thérapies utilisant les NPs. Particulièrement pour des pathologies telles que l'asthme, où l'implication de ces granulocytes est bien documentée.

## ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are nanoscale materials found in a large variety of common household and workplace materials. They possess interesting physicochemical properties, mostly due to their large surface area to volume ratio. However, to date, characterization of toxic effects of NPs in humans remain deficient.

Our previous studies have shown that several NPs modulate the functions of human granulocytes (Polymorphonuclear neutrophils). For example, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) activate human neutrophils, delay their spontaneous apoptosis and increase their dégranulation *in vitro*. Furthermore, murine studies have shown that NPs such as ZnO NPs induce pulmonary hypereosinophilia. Since eosinophils are another type of human granulocytes and their involvement in immune response is documented, we investigated if ZnO NPs are also able to modulate the functions of human eosinophils.

Here, we studied the effect of ZnO NPs on human eosinophils morphology as well as on five of their key cellular functions: reactive oxygen species production, cell viability, *de novo* protein synthesis, gelatinase activity and cytokine liberation. We showed that some eosinophil cellular functions are modulated by ZnO NPs in a similar way to that has been observed in neutrophils (apoptosis delay, protein synthesis induction). However, some other functions are not modulated (morphology, gelatinase activity).

To conclude, we demonstrate that human eosinophils are a direct target of ZnO NPs. It will be important to considerate NPs-eosinophil interactions during the development of NPs-based therapeutics. Especially for well-documented eosinophil-rich diseases, such as asthma.

# INTRODUCTION

La présence de nanoparticules (NPs) dans les milieux de travail ou dans les produits domestiques est courante et ne fera qu'augmenter au cours des prochaines années. Leur popularité est surtout attribuable à leurs propriétés physicochimiques intéressantes, notamment leur petite taille et leur grand ratio aire de surface sur volume, différant de celles du matériau équivalent non nanométrique. Les NPs d'oxyde de zinc, faisant partie du groupe des NPs d'oxydes métalliques, sont parmi les types de NPs dont la production mondiale est la plus élevée. Elles sont utilisées dans des domaines divers, allant des cosmétiques à l'électronique en passant par l'industrie biomédicale. Malgré leur popularité, peu d'études se penchent sur les possibles effets toxiques associés à l'exposition humaine aux NPs. Il a été mis en évidence que le système respiratoire est une cible majeure d'expositions liées au milieu du travail ou bien totalement accidentelles aux NPs. En effet, leur petite taille leur permettrait de pénétrer et de s'accumuler au niveau des bronchioles et des alvéoles pulmonaires. Elles risqueraient alors d'y exacerber les symptômes de désordres des voies respiratoires.

Les effets pathologiques associés à l'exposition aux NPs sont généralement associés à l'induction ou à l'exacerbation de réponses inflammatoires. L'inflammation est une réponse normale du système immunitaire visant la protection de l'organisme et le retour vers l'homéostasie. Elle est indispensable à la prise en charge des agents pathogènes et pour le déclenchement adéquat des processus menant à la guérison. Or, lorsqu'elle est mal régulée, la réponse inflammatoire peut avoir des effets pathologiques. Ainsi, le psoriasis, l'asthme et la goutte sont des exemples de maladies d'origine inflammatoire.

Les éosinophiles sont un des types cellulaires participant à la modulation des réponses inflammatoires. Ceux-ci sont des cellules immunitaires appartenant à la famille des granulocytes caractérisés par leur grand nombre de granules et leur couleur rosée en microscopie optique. Les granules éosinophiliques contiennent une variété de médiateurs solubles et de protéines granulaires pouvant être rapidement libérées en réponse à des stimuli divers. Ceux-ci sont mis au profit lors de la défense de l'hôte envers les vers parasitaires. Ils participeraient aussi à des procédés non pathologiques tels que le remodelage du col de l'utérus lors de l'accouchement. Cependant, ils peuvent aussi avoir des effets pathologiques et même exacerber des dommages tissulaires lorsque l'inflammation est mal régulée.

Des recherches menées sur divers modèles animaux ont démontré que les NPs ZnO peuvent induire une éosinophilie pulmonaire et qu'elles ont un effet d'adjuvant en réponse à l'ovalbumine.

D'autre part, des études menées dans notre laboratoire ont démontré que les NPs ZnO modulent les fonctions d'un autre type de granulocyte impliqué dans la réponse inflammatoire, les polymorphonucléaires neutrophiles. Cependant, alors que chez la majorité des autres cellules inflammatoires les NPs ZnO induisent une flambée oxydative menant à la mort cellulaire, celles-ci n'influencent pas la production de médiateurs solubles par les neutrophiles et retardent plutôt leur apoptose spontanée.

À ce jour, les études concernant les effets directs des NPs ZnO sur les fonctions cellulaires des éosinophiles humains sont rares. Notre objectif a alors été de déterminer si les NPs ZnO sont en mesure de moduler directement les fonctions cellulaires des éosinophiles humains, tout comme elles l'avaient fait pour les neutrophiles. Pour ce faire, nous avons vérifié l'effet des NPs ZnO sur six principales fonctions cellulaires des éosinophiles soit : la morphologie, la production d'espèces réactives de l'oxygène, la viabilité cellulaire, la synthèse *de novo* de protéines, l'activité gélatinase et la libération de cytokines.

**PREMIÈRE SECTION: *SYNTHÈSE***

# CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES

L'industrie des nanotechnologies est en plein essor. En effet, des estimations prévoyaient qu'elles représenteraient un marché d'un billion de dollars et de deux millions d'emplois en 2015 (Ignacio *et al.*, 2014). Les nanoparticules sont utilisées dans une panoplie croissante de produits à cause de leurs propriétés physicochimiques intéressantes. Dans ce chapitre, les nanoparticules et leur effet sur l'environnement seront présentés. Ensuite, les propriétés physicochimiques des NPs d'oxydes métalliques, un des sous-groupes les plus populaires, seront abordées en plus grand détail. Enfin, il sera question des NPs de zinc, de leur utilisation et des effets toxiques qui leur sont associés.

## 1.1 Les NPs et leur effet sur l'environnement

Les NPs sont des matériaux dont la présence ne cesse d'augmenter dans milieux de travail ou dans les produits domestiques. Or, malgré leur présence grandissante dans notre environnement, leurs effets modulateurs sur ce dernier demeurent méconnus. Dans la prochaine section, une définition des NPs et leur classification seront abordées. Ensuite, leur présence dans l'environnement et le niveau d'exposition des humains seront discutés. Enfin, divers effets sur la santé associés à l'exposition aux NPs seront décrits.

### 1.1.1 Définition des nanoparticules et importance de la nanotoxicologie

Les nanoparticules sont des matériaux nanotechnologiques dont les trois dimensions sont inférieures à 100 nm. Leurs caractéristiques diffèrent de celles de leur équivalent non nanométrique de par leur faible taille, leur composition chimique, leur structure de surface, leur aire de surface, leur forme, leur solubilité et leur tendance à l'agrégation (Ignacio *et al.*, 2014). Ceci leur confère des propriétés physicochimiques particulières, telles que leurs propriétés de fluorescence et optiques, leur résistance à la température et à la pression, leur conductivité électrique et thermique, ainsi que leur réactivité chimique et biologique (A. Nel *et al.*, 2006). Les fonctionnalités propres aux NPs sont exploitées dans un nombre sans cesse croissant d'industries, telles que l'industrie des cosmétiques, des textiles, des plastiques, des électroniques même dans des applications médicales (Kołodziejczak-Radzimska *et al.*, 2014). Certains ont même prédit que des systèmes complexes de nanoparticules avec des caractéristiques semblables à celles de cellules de mammifères verront éventuellement le jour (Nel *et al.*, 2006).

La combinaison particulière de caractéristiques physicochimiques propres aux NPs, comparativement à leur équivalent non nanométrique, pourrait favoriser leur interaction avec les tissus biologiques. Ainsi, il est important d'évaluer leur potentiel toxicologique spécifique, afin de mieux comprendre comment celles-ci se comportent dans un milieu biologique (K. Donaldson *et al.*, 2004). Deux facteurs pouvant influencer largement l'effet toxicologique des NPs sont leur petite taille en plus de leur grande aire surface par unité de masse. Davantage d'atomes composant la NP se retrouvent directement à sa surface, au lieu d'être cachés à son cœur. Alors, le nombre de groupements chimiques réactionnels accessibles est grandement augmenté (Oberdorster *et al.*, 2005). Ces groupements chimiques de surface déterminent, par exemple, de quelles façons les NPs auront tendance à interagir avec les molécules environnantes telles que le dioxygène. Sachant que certains groupes réactionnels agissent comme des accepteurs d'électrons, ceux-ci pourraient favoriser la production de radicaux superoxydes et la génération d'autres produits réactifs de l'oxygène. En absence d'une quantité suffisante de produits antioxydants, cela peut induire un stress menant à la mort des cellules environnantes (André Nel, 2005, A. Nel *et al.*, 2006)

### **1.1.2 Les types de nanoparticules**

Les NPs peuvent être d'origine naturelle, accidentelle ou synthétique. En effet, des phénomènes naturels tels que les éruptions volcaniques et l'érosion produisent des nanoparticules de dimensions variables (Baan *et al.*, 2006). D'un autre côté, des NPs peuvent être générées de façon « accidentelle » après des incendies ou pendant des procédés industriels tels que le soudage et la construction. Enfin, certaines NPs sont le fruit de design rationnel développé dans des laboratoires. Même si leurs origines sont diverses, les NPs peuvent être classées dans quatre catégories principales : les dendrimères et celles à base d'ADN, celles à base de carbone, celles à base de métal et les composites (Hannah *et al.*, 2008). Les dendrimères sont des polymères assemblés à partir d'unités branchées dont les propriétés sont aisément modulables selon les applications désirées. Ils pourraient être utilisés, entre autres, pour la distribution spécifique de médicaments. Les NPs à base de carbone sont majoritairement faites de carbone et sont sous forme de fullerènes (sphériques ou ellipsoïdes) ou sous forme de nanotubes (cylindriques). Elles sont utilisées dans divers domaines, tels que les matériaux (pour améliorer les revêtements et les films photographiques) et l'électronique. Les NPs de métal comprennent les points quantiques ainsi que l'or, l'argent et les oxydes métalliques nanométriques. Ils peuvent avoir des caractéristiques optiques intéressantes. Par exemple, les propriétés optiques des points

quantiques sont dépendantes de leur taille. Enfin, les NPs composites combinent les NPs avec d'autres NPs ou avec des matériaux plus grands. Ces combinaisons permettent de générer des matériaux avec des propriétés améliorées. Par exemple, l'ajout de NPs de silice permet d'améliorer les caractéristiques mécaniques, thermiques et ignifuges de divers matériaux (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

### **1.1.3 Les nanoparticules dans l'environnement**

Tel que discuté précédemment, l'utilisation de NPs dans des produits courants est croissante. Ainsi, les chances que celles-ci se dispersent dans l'environnement à la suite d'un déversement accidentel ou en tant que résidus post-consommation sont plus élevées. Le comportement des NPs se retrouvant dans l'air est dépendant de leur taille. D'abord, les plus petites NPs (<80 nm) ont un taux de diffusion inversement proportionnel à leur taille. Elles ont toutefois tendance à s'agglomérer rapidement dans l'air pour former des microparticules, plus grandes (>2000 nm). Ces agglomérats sont ensuite sujets à la déposition gravitationnelle, proportionnelle à leur taille. Les NPs plus grandes sont celles qui ont tendance à demeurer suspendues dans l'air le plus longtemps, pouvant aller jusqu'à des semaines, avant de se déposer. Les NPs s'étant déposées n'auraient pas tendance à retourner en suspension dans l'air (RJ.; Creely Aitken, KS.; Tran, CL., 2004, EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

Dans la prochaine section, le comportement des NPs se retrouvant sur le sol puis dans l'eau sera décrit. D'abord, le comportement des NPs allant sur le sol dépend de leurs propriétés physicochimiques. Des paramètres tels que le ratio aire de surface sur volume ou leur charge de surface peuvent leur permettre d'interagir fortement avec les molécules du sol et les rendre virtuellement immobiles. Or, des revêtements spéciaux pourraient limiter leurs interactions et les faire pénétrer, leur permettant d'atteindre des couches plus profondes (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007, Lecoanet *et al.*, 2004a, Lecoanet *et al.*, 2004b, Wei-xian Zhang, 2003). Ensuite, le comportement des NPs dans l'eau dépend de divers facteurs tels que leur solubilité, leur capacité de se disperser et leur capacité d'interagir avec le sol et les sédiments. La version nanométrique des matériaux a tendance à se disperser moins rapidement dans l'eau comparativement à leur équivalent non nanométrique. Cependant, la grande aire de surface des NPs pourrait aussi leur permettre d'interagir avec des sédiments ou avec le fond aquatique et ainsi accélérer leur retrait de l'eau (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007, Moore, 2006, Oberdorster *et al.*, 2002, Wiesner *et al.*, 2006).



D'une part, le dépôt des NPs dans les sédiments peut favoriser leur dégradation par des procédés multiples tels que la photolyse, l'hydrolyse ou la réduction en conditions anaérobiques. La capacité des NPs s'étant accumulées dans l'environnement à être biodégradées (changements des propriétés de surface ou de l'intégrité physique) dépend aussi de leurs caractéristiques. La structure chimique de certaines NPs synthétiques telles que les dendrimères leur permet d'être spécifiquement dégradées. Par exemple, des microorganismes permettraient la biodégradation de certaines NPs à base de carbone. Par contre, les NPs à base de métal ne sont pas biodégradables (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007, Filley TR.; Ahn, 2005).

D'autre part, le plancton et d'autres organismes marins à la base de la chaîne alimentaire incorporent des particules de taille nanométrique. Alors, il leur serait possible de capter les NPs s'étant déposées dans les sédiments aquatiques, rendant envisageable la bioaccumulation de ces dernières à travers les maillons de la chaîne alimentaire (Biswas *et al.*, 2005). De plus, puisque la tendance à la sédimentation des NPs dépend de leurs propriétés, certaines pourraient demeurer longtemps en dispersion dans l'eau avant d'être captées par d'autres types d'organismes marins. Étant donné que multiples voies de bioaccumulation sont envisageables, des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser comment se comporte chaque type de NP (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

#### **1.1.4 L'exposition humaine aux nanoparticules**

Le potentiel d'exposition des humains aux NPs est croissant, leur utilisation étant grandissante dans de nombreuses industries. Deux types d'expositions sont principalement définis : l'exposition occupationnelle et l'exposition de la population générale. L'exposition occupationnelle est celle des ouvriers de l'industrie des nanotechnologies participant à la fabrication, à l'utilisation dans des produits finis et au recyclage ou à l'enfouissement après utilisation des NPs (Boonruksa *et al.*, 2015, Pelclova *et al.*, 2015). Deux types de mesures de prévention sont mis de l'avant pour limiter l'exposition occupationnelle aux NPs. D'un côté des systèmes de ventilation performants et des systèmes de filtration de l'air HEPA pourraient limiter à la source la volatilisation de NPs. D'un autre côté, des équipements de protection individuels tels que des masques (avec des filtres HEPA) et des gants pourraient limiter l'exposition lors de leur manipulation. Les risques d'expositions semblent être les plus élevés lors de la manipulation en vrac des NPs, lors de l'usinage de pièces en contenant et lors des opérations de nettoyage. Au contraire, la production des NPs est quant à elle habituellement effectuée dans des systèmes fermés comptant sur des systèmes de filtration de l'air de type HEPA (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007, J. H. Lee

*et al.*, 2015, Luther, 2004, Peixe *et al.*, 2015). Le tableau 1.1 présente des voies d'expositions liées au milieu de travail potentielles aux NPs selon leur méthode de synthèse.

**Tableau 1-1 Voies d'expositions liées au milieu de travail aux NPs selon leur méthode de synthèse**  
Traduit d'EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007

Méthode de synthèse	Formation de particules	Source d'exposition ou activité professionnelle	Source d'exposition primaire
<b>Phase gazeuse</b>	Dans l'air	Fuite directe du réacteur	Inhalation
		Récupération du produit des filtres des réacteurs	Inhalation/Cutanée
		Traitement et emballage de poudres sèches	Inhalation/Cutanée
		Nettoyage et maintenance des équipements	Inhalation/Cutanée
<b>Dépôt de vapeur</b>	Dans le substrat	Récupération du réacteur/Contamination sèche des lieux de travail	Inhalation
		Traitement et emballage de poudres sèches	Inhalation/Cutanée
		Nettoyage et maintenance des équipements	Inhalation/Cutanée
<b>Colloïdale ou par usure</b>	Suspension liquide	Si une suspension liquide est traitée pour en faire une poudre : exposition potentielle lors du séchage pour créer la poudre ainsi que lors du traitement et de l'emballage de la poudre sèche.	Inhalation/Cutanée
		Nettoyage et maintenance des équipements	Cutanée

L'exposition de la population générale aux NPs peut être « volontaire », après contact avec un des nombreux produits en faisant l'utilisation ou elle peut être « accidentelle », après contact avec des résidus de production ou d'utilisation. Considérant que, tel qu'il avait été mentionné précédemment, la petite taille des NPs leur permet de demeurer plus longtemps en suspension dans les airs, la voie d'exposition accidentelle la plus probable est par inhalation. Cependant, à ce jour, il existe peu d'études mesurant l'étendue des déversements industriels de NPs et leur devenir dans l'environnement. D'un autre côté, il y a une panoplie de produits contenant des NPs. Des domaines tels que l'électronique, la médecine, les cosmétiques et la chimie en profitent particulièrement. Le tableau 1.2 présente des exemples de produits contenant des NPs pouvant être des sources d'exposition pour la population générale (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007, Lioy *et al.*, 2010, R. Roy *et al.*, 2014b, Simko *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2015).

**Tableau 1.2. Voies d'exposition de la population générale ou de consommateurs pour divers types de produits**  
Traduit d'EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007

Type de produit	Source de libération ou d'exposition	Population exposée	Voie d'exposition potentielle
<b>Crème solaire contenant des matériaux nanométriques</b>	Application sur la peau par le consommateur	Consommateurs	Cutanée
	Libération par le consommateur (ex. lavage avec de l'eau et du savon) dans les eaux usées	Population générale	Ingestion
	Élimination de contenants de crème solaire (avec des résidus de crème) après l'utilisation (dans des sites d'enfouissement ou incinération)	Population générale	Inhalation ou ingestion
<b>Catalyseurs métalliques dans l'essence afin d'en réduire les émanations</b>	Libération à partir des gaz d'échappement vers l'air (puis déposition dans la surface d'eau)	Population générale	Inhalation ou ingestion
<b>Peinture et revêtements</b>	Érosion, élimination	Consommateurs, population générale	Cutanée, inhalation ou ingestion
<b>Vêtements</b>	Usure, lavage, élimination	Consommateurs, population générale	Cutanée, inhalation, ingestion à partir de la surface ou d'eaux souterraines
<b>Électroniques</b>	Libération en fin de vie ou après la fin des cycles de recyclage	Consommateurs, population générale	Cutanée, inhalation, ingestion à partir de la surface ou d'eaux souterraines
<b>Biens de sport</b>	Libération en fin de vie ou après la fin des cycles de recyclage	Consommateurs, population générale	Cutanée, inhalation, ingestion à partir de la surface ou d'eaux souterraines

Les trois types d'expositions accidentelles les plus fréquents seraient l'exposition par inhalation, suivie par l'ingestion et le contact cutané. L'exposition par inhalation pourrait être décrite selon les modèles appliqués aux aérosols. Alors, des facteurs tels que la taille des particules, leur tendance à s'agglomérer, à se déposer et à se resuspendre, ainsi que leur comportement sous l'effet des forces d'inertie, de gravité et de diffusion influencent fortement à quel point les NPs pourront pénétrer profondément dans le système respiratoire des personnes exposées (Tang *et al.*, 2015). L'exposition par ingestion semble être plutôt faible au niveau de la masse en NPs absorbées. Toutefois, elle pourrait être plus élevée pour de jeunes enfants, ayant plus tendance à ingérer de la poussière ou de la terre, car ils sont au niveau du sol plus souvent que les adultes. D'autres sources d'ingestion proviendraient de la nourriture, des agents ajoutés aux aliments, de médicaments et de suppléments alimentaires (EPA-Nanotechnology-White-Paper, 2007).

L'exposition cutanée aux NPs est en augmentation, car certaines d'entre elles sont incorporées à des produits cosmétiques communs tels que les crèmes solaires et les déodorants. Une étude a démontré qu'il existe une relation inverse entre la taille des particules et leur capacité de pénétrer la peau (Tinkle *et al.*, 2003). Par ailleurs, sur un modèle de peau porcine, plusieurs types de points quantiques ont été en mesure de traverser la couche cornée pour se retrouver dans les couches profondes de la peau (Gopee *et al.*, 2007). Ainsi, les particules nanométriques auraient davantage de chances d'être absorbées à travers la peau que les particules plus grosses. Celles-ci pourraient par la suite se disperser dans les tissus environnants ou entrer dans la circulation lymphatique (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2006). En milieu de travail, la manipulation de matériaux recouverts de NPs ou le dépôt sur la peau de NPs à base de carbone dispersées dans l'air peut aussi mener à une exposition cutanée. Par exemple, une étude a estimé les dépôts sur des gants à 0.2 à 6 mg par main (Maynard *et al.*, 2004).

### **1.1.5 L'exposition aux NPs : effets sur les modèles murins et sur les humains**

Des études toxicologiques sur des modèles murins ont vu le jour au cours des dernières années pour déterminer l'effet de l'exposition aux NPs sur la santé. Celles-ci ont permis de mettre en évidence leur capacité de s'accumuler dans divers organes et de déclencher un stress oxydatif et des effets inflammatoires. Par exemple, les nanotubes de carbone promeuvent la génération intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène, des dommages à l'ADN puis la nécrose cellulaire chez un modèle de macrophages murins (Di Giorgio *et al.*, 2011). De plus, des NPs d'or injectées de façon intrapéritonéale s'accumulent particulièrement dans le cerveau. Leur injection par intraveineuse a quant à elle mené à une accumulation préférentielle au foie avec des accumulations secondaires aux reins, aux poumons, au cerveau et à la rate. Par ailleurs, aux doses plus élevées, elles ont induit une chute de l'hématocrite et une perte de poids. Les NPs d'or recouvertes de polyéthylène glycol ont particulièrement été toxiques pour le foie et elles ont aussi induit une réponse inflammatoire aigue (Cho *et al.*, 2009). Enfin, les NPs d'oxyde d'aluminium induisent l'activation de microglies et des astrocytes de diverses zones du cerveau de rats, menant ainsi à une induction de l'inflammation (X. B. Li *et al.*, 2009).

Le modèle murin de la poche d'air est couramment utilisé par notre laboratoire afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'inflammation stérile aigue et pour évaluer les propriétés pro-inflammatoires de nombreux produits. Nous avons démontré que les NPs d'oxyde de titane induisent un recrutement rapide (3h) de neutrophiles ainsi que la libération locale de médiateurs solubles, en particulier le MIP1 $\beta$ . En comparaison, un agoniste pro-inflammatoire classique, les

lipopolysaccharides (LPS), induit plutôt un recrutement après 6 à 9 heures. Un autre type de NPs, les fullerénols, n'induisent pas de recrutement cellulaire. Par contre, elles amplifient un recrutement neutrophilique induit par le LPS après 3 heures de traitement. Celles-ci amplifient aussi la libération de médiateurs solubles induite par le LPS, en particulier l'IL-6 (Girard, 2014, Goncalves *et al.*, 2011, Goncalves *et al.*, 2013).

Des études menées sur des volontaires humains ont quant à elles mis en évidence trois caractéristiques principales de l'effet des NPs sur l'organisme. En premier lieu, leur demi-vie en circulation semble être assez longue, variant de quelques semaines à des années (Bordea *et al.*, 2009). Ainsi, avec une concentration systémique suffisante et des expositions répétées, leur accumulation dans des organes cibles est possible. En deuxième lieu, les NPs ayant pénétré dans la circulation sanguine ont tendance à s'accumuler dans le foie et dans la rate (Alexis *et al.*, 2008, Almeida *et al.*, 2011). Cependant, cette distribution pourrait être modulée par la taille des NPs tel qu'il est montré dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3. Biodistribution des nanoparticules d'or selon la taille (10-250 nm)**

Traduit avec autorisation de Gebel *et al.* 2014

Tissu/Organe	10 nm	50 nm	100 nm	250 nm
Concentration Au, µg (Au)/g (échantillon)				
<b>Sang</b>	1.5	1.4	2.2	0.97
<b>Foie</b>	2.7	1.2	3.3	3.0
<b>Rate</b>	2.2	1.4	1.8	2.0
<b>Poumons</b>	0.19	1.7	0.044	0.035
<b>Reins</b>	0.34	0.058	0.030	0.026
<b>Testicules</b>	0.055	ND	ND	0.006
<b>Thymus</b>	0.21	ND	0.006	0.035
<b>Cœur</b>	0.16	0.049	0.009	ND
<b>Cerveau</b>	0.13	ND	ND	ND

En dernier lieu, les NPs ont tendance à s'accumuler dans les cellules dont la fonction de phagocytose est la plus active, dont les phagocytes professionnels tels que les macrophages et les neutrophiles. Ainsi, la concentration pouvant être atteinte au sein de ces cellules peut être

particulièrement élevée, induisant du coup une toxicité ciblée de ces cellules du système immunitaire (Alexis *et al.*, 2008, Gebel *et al.*, 2014).

Des publications ont mis en évidence l'induction d'un procédé biologique central en aval d'une exposition à des NPs, l'inflammation. À ce jour, l'hypothèse favorisée stipule que les NPs induisent un stress oxydatif prolongé au sein des cellules, déclenchant par la suite l'inflammation. L'induction d'un stress oxydatif par plusieurs NPs chez des cellules humaines saines ou cancéreuses a été démontrée. Celles-ci comprennent, entre autres, une lignée de cellules épithéliales pulmonaires, une lignée de cellules épithéliales colorectales, une lignée de kératinocytes, des lymphocytes, des monocytes et des macrophages. Par exemple, les fullerènes (Levi *et al.*, 2006), les NPs d'argent (AshaRani *et al.*, 2009), l'oxyde de cérium, l'oxyde de zinc ou les points quantiques (Lim *et al.*, 2003) peuvent engendrer un stress oxydatif menant à la mort cellulaire soit par apoptose ou par nécrose, selon les concentrations utilisées. (Hanley *et al.*, 2009, Ivask *et al.*, 2015, W. Lin *et al.*, 2006, Lopez-Serrano *et al.*, 2014, Lovrić *et al.*, 2005, R. Roy *et al.*, 2015). Le grand ratio aire de surface sur volume des NPs semble être particulièrement impliquée dans l'induction du stress oxydatif puis de l'inflammation. En effet, les dommages cellulaires, l'activation cellulaire et l'inflammation engendrés par elles sont supérieurs à ceux induits par la même masse de produits non nanométriques (K. Donaldson *et al.*, 2000). L'inflammation est un procédé biologique bénéfique pour la défense de l'organisme contre de pathogènes envahisseurs. Cependant, lorsque l'inflammation n'est pas bien régulée ou qu'elle ne se résorbe pas adéquatement, elle peut avoir des effets néfastes sur plusieurs systèmes. Par exemple, certaines NPs favoriseraient le déclenchement de l'inflammation au niveau des poumons et du système cardiovasculaire (Ken Donaldson *et al.*, 2002). Considérant que les NPs pourraient se bioaccumuler dans des organes cibles comme le foie et la rate, tel qu'il a été décrit précédemment, celles-ci pourraient y causer un stress oxydatif, l'exacerbation de l'inflammation, la mort cellulaire et finalement engendrer la perte de fonction. Des auteurs proposent de réglementer activement les NPs pouvant amorcer, promouvoir ou aggraver les processus inflammatoires, puisqu'elles seraient plus susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'organisme (Seaton *et al.*, 2009).

Lopez-Serrano *et al.* ont souligné que pour qu'il puisse y avoir des rapprochements entre les données obtenues sur des modèles animaux, des tests *in vitro* et les effets sur les populations vulnérables, une bonne quantification des expositions doit être performée. Ainsi, la concentration de NPs présente dans l'environnement et celle s'accumulant dans les organes après des expositions répétées doit être évaluée. Cependant, à ce jour, il n'y a pas de méthode de dosage

environnemental standard de définie et il manque d'études quantifiant leur accumulation au sein des organes cibles. De plus, les différents types de NPs ont des comportements variés. Ainsi, des études seront nécessaires pour définir les meilleures méthodes de dosage et pour caractériser l'exposition à laquelle la population en général ou les travailleurs sont exposés (Lopez-Serrano *et al.*, 2014). Enfin, il sera nécessaire d'effectuer davantage d'études *in vivo* et sur des cellules humaines comparant en parallèle les effets d'une masse de matériaux NPs par rapport à la même masse de matériaux non nanométriques. Ainsi, les effets toxiques attribuables exclusivement aux propriétés intrinsèques des NPs seront mieux documentés (Gebel *et al.*, 2014).

## **1.2 Les NPs d'oxydes métalliques**

Les NPs d'oxydes métalliques sont un des quatre groupes principaux de nanoparticules, tel qu'il avait été discuté dans la section précédente. Leurs propriétés physicochimiques caractéristiques leur ont valu d'être utilisées dans une panoplie de produits courants. Dans la prochaine section, des exemples de l'utilisation des NPs d'oxydes métalliques seront présentés, leurs principales propriétés physicochimiques seront énumérées et les méthodes utilisées pour les caractériser seront décrites.

### **1.2.1 Exemples d'utilisation**

Les NPs d'oxydes métalliques sont le type de nanoparticules dont la production est la plus élevée au niveau mondial. En particulier, les masses de NPs d'oxyde de zinc, de dioxyde de titane et de dioxyde de silice sont les plus élevées. Des mélanges de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc ont été répertoriés dans des produits tels que des écrans solaires, des produits cosmétiques ou des peintures. Selon la base de données du projet en nanotechnologies émergentes, répertoriant les produits contenant des NPs sans égard de leur concentration, environ 29 % des produits contenant des NPs sont des liquides (eau, crèmes pour la peau, huiles, lubrifiants pour voitures). Les produits solides (fers pour les cheveux, textiles) contenant des NPs représentent quant à eux environ 17 % des produits répertoriés. Le pourcentage de produits utilisant des NPs d'argent ou de dioxyde de titane pour leurs propriétés antibactériennes est le plus élevé (31 % des produits). Le dioxyde de titane et le dioxyde de silice sont aussi utilisés en tant qu'agents protecteurs de surface (15 % des produits) ou en tant qu'agents pour le traitement de l'eau ou de l'air à domicile (15 % des produits). L'industrie des cosmétiques utilise aussi de façon fréquente les NPs

d'argent, d'or et de dioxyde de titane (12 % des produits). Enfin, des NPs d'argent, de calcium, d'or, de dioxyde de silice, de magnésium, entre autres, sont utilisées dans le domaine de la santé ou dans des suppléments alimentaires. (11 % des produits) (Vance *et al.*, 2015). Le tableau 1.4 énumère les principales catégories de produits utilisant les NPs et en présente quelques exemples dans le marché à l'heure actuelle.

**Tableau 1.4. Exemples de produits sur le marché contenant des nanoparticules**  
Compilation d'après le projet en nanotechnologies émergentes

Catégorie	Exemples de produits dans le marché
<b>Agent adsorbant</b>	Sérum hydratant (ZnO), agent détachant
<b>Agent anti-agglomérant</b>	Fer plat (Ag), Brosses à visage (TiO <sub>2</sub> , ZnO), Shampoing Pantène (TiO <sub>2</sub> )
<b>Agent antimicrobien</b>	Draps en coton (Ag), bas anti-odeurs (Ag), pansement à blessure (Ag)
<b>Agent hydrophobe</b>	Revêtement à tuiles (SiO <sub>2</sub> ), revêtement à bois et pierre (SiO <sub>2</sub> ), revêtement à fenêtres (TiO <sub>2</sub> )
<b>Agent lubrifiant</b>	NanoLUB (WS <sub>2</sub> ), baume à lèvres (ZnO)
<b>Catalyseur</b>	Catalyseur à essence (CeO <sub>2</sub> ), Scellant à fenêtre (TiO <sub>2</sub> ), peinture pour salle de bain
<b>Chimie verte</b>	Catalyseur pour voiture (Pd), nettoyeur commercial (TiO <sub>2</sub> )
<b>Cosmétiques</b>	Déodorant (TiO <sub>2</sub> ), crème à raser (TiO <sub>2</sub> ), shampoing anti pellicules (TiO <sub>2</sub> )
<b>Dureté et force</b>	Fer à repasser (Ag), peinture anti-graffiti (SiO <sub>2</sub> ), colle (TiO <sub>2</sub> ), skis (SiO <sub>2</sub> )
<b>Électroniques</b>	Processeurs (Si), carte mémoire (SiO <sub>2</sub> ), disque dur (Si), prothèse auditive (Si)
<b>Environnement</b>	Purificateur d'air pour voiture (TiO <sub>2</sub> ), cuisinière au gaz (TiO <sub>2</sub> )
<b>Filtration</b>	Aspirateur (Ag), purificateur d'eau (Ag)
<b>Pigments</b>	Peinture blanche (TiO <sub>2</sub> ), scellant (TiO <sub>2</sub> )
<b>Protection solaire</b>	Crème solaire (TiO <sub>2</sub> ), baume à lèvres (TiO <sub>2</sub> ), maillot de bain (Ag)
<b>Revêtements</b>	Scellant pour voiture (SiO <sub>2</sub> ), traitement anti-condensation pour visières, lits pour chiens (Ag)
<b>Santé</b>	Crème solaire (TiO <sub>2</sub> , ZnO), test de grossesse (Au)

### 1.2.2 Propriétés caractéristiques

Les NPs d'oxydes métalliques sont utilisées à grande échelle par nombreuses industries. Par exemple, elles sont des semi-conducteurs pouvant catalyser des réactions d'oxydoréduction.



Elles absorbent fortement les rayons ultraviolets, ce qui les rend particulièrement efficaces au sein de crèmes solaires ou de tissus techniques. Les propriétés de photocatalyse de NPs de dioxyde de titane ou d'oxyde de zinc les rendent utiles en tant qu'agents antiseptiques sur des textiles, dans des shampoings antipelliculaires ou dans des aliments lyophilisés (David Gonçalves, 2015, Simón-Vázquez *et al.*, 2014, Haiyuan Zhang *et al.*, 2012).

Il est prévu que nombreuses nouvelles applications seront développées dans des domaines tels que la santé. En effet, certaines NPs auraient la capacité d'agir en tant qu'adjuvants pour potentialiser la réponse immunitaire dans des vaccins. De plus, des combinaisons NP-antigène ou NP-cytokine pourraient aussi voir le jour pour moduler les réponses inflammatoires (David Gonçalves, 2015, Smith *et al.*, 2013). Des NPs de fer pourraient quant à elles être prisées pour des procédures d'imagerie médicale par résonance magnétique, car leur magnétisme peut être modulé, elles sont biocompatibles, elles sont moins toxiques que les agents de contraste normalement utilisés et elles sont faciles à détecter à des concentrations modérées (Nune *et al.*, 2009).

### **1.2.3 Caractérisation des propriétés physicochimiques**

Les NPs d'oxydes métalliques sont les nanomatériaux dont la manufacture et l'utilisation sont les plus fréquentes au niveau mondial (R. J. Aitken *et al.*, 2006). Elles sont, entre autres, utilisées avec succès en tant qu'agent antimicrobien. Cependant, la caractérisation des mécanismes impliqués dans leur toxicité envers les microorganismes et de leurs effets sur les cellules humaines est incomplète. À ce jour, il y a des évidences que plusieurs NPs d'oxydes métalliques sont cytotoxiques. Par exemple, les NPs d'oxyde de cuivre, d'oxyde de zinc, de trioxyde de diantimoine, de tétraoxyde de trimanganèse, et de tétraoxyde de tricobalt ont des effets cytotoxiques à des concentrations allant de 16,4 µg/mL à 132.3 µg/mL chez deux lignées de cellules épithéliales humaines (Ivask *et al.*, 2015). Cependant, de nombreux paramètres tels que le type cellulaire étudié, la concentration cellulaire et les caractéristiques des NPs influencent le niveau de toxicité observée. La caractérisation extensive des propriétés physicochimiques des NPs d'oxyde métallique à l'étude est nécessaire, car selon la méthode de production, la concentration utilisée, les propriétés de surface et la présence d'additifs, le même oxyde métallique nanoparticulaire pourrait induire des effets toxiques contradictoires sur un type cellulaire donné (Djurišić *et al.*, 2015).

Il a été proposé que les publications documentant les effets biologiques des NPs contiennent une évaluation des propriétés physicochimiques suivantes : la morphologie, la structure cristalline, la pureté, la taille moyenne et la distribution de tailles, la composition chimique, l'aire de surface, les propriétés de surface, le degré d'agrégation sous les conditions expérimentales, la stabilité, la réactivité de surface, la chimie de surface et la charge de surface (Krug *et al.*, 2011). La microscopie électronique à transmission est la méthode de choix pour étudier la morphologie et la taille des NPs. Celle-ci peut être complétée par la spectroscopie de diffraction des rayons X pour déterminer la structure cristalline des NPs (Djurišić *et al.*, 2015, Tseng *et al.*, 2013). Ceci est particulièrement important pour des NPs telles que celles d'oxyde de titane qui peuvent se retrouver sous forme cristalline anatase ou rutil, leur attribuant des propriétés toxicologiques distinctes (Yin *et al.*, 2012).

La composition chimique des NPs peut être caractérisée par spectroscopie photo-électronique à rayons X. Celle-ci est particulièrement intéressante, car elle peut donner des indices sur l'état d'oxydation des composantes de la NP et elle peut détecter de faibles niveaux d'impuretés (inférieurs à 0.1 %) (Tseng *et al.*, 2013).

La mesure du potentiel zêta donne une idée de la charge de surface de la NP et peut être mesurée par électrophorèse de type vélocimétrie laser. Elle peut être influencée par la concentration de NP, la température, le pH et la force ionique de la solution de dispersion, ainsi que par la présence de revêtements ou l'interaction avec des protéines (Clogston *et al.*, 2011).

L'analyse de Brunauer-Emmett-Teller peut être utilisée pour mesurer l'aire de surface maximale des NPs. Cependant, puisque cette méthode nécessite leur chauffage sous vide, il ne permet pas l'analyse des NPs en milieu aqueux (Xiaoyong *et al.*, 2009).

L'analyse de la diffraction dynamique de la lumière permet pour sa part de mesurer la taille des NPs individuelles et les agrégats pouvant se former dans les milieux aqueux, tels que les milieux biologiques (Xiaoyong *et al.*, 2009). Celle-ci est toutefois sensible à la concentration de l'échantillon, car une trop haute concentration favorise fortement la formation d'agrégats, alors qu'à une concentration trop faible le bruit de fond provenant des autres particules en solution dans le diluant sera trop élevé. Il est important d'effectuer les mesures aux concentrations de NPs et dans les milieux de culture utilisés lors des tests biologiques, afin d'avoir une idée plus concise de leur état lors de leur mise en contact avec les cellules. La prise en considération de l'index de polydispersité après chaque mesure est importante pour s'assurer de la qualité des données recueillies. En effet, un haut indice de polydispersité est souvent un signe d'une concentration d'analyte trop faible. Enfin, l'échantillon analysé par diffraction dynamique de la lumière doit se

dispenser de façon stable en solution pour ne pas précipiter en cours de mesure, puisque celles-ci peuvent nécessiter plusieurs minutes (Djurišić *et al.*, 2015).

Finalement, plusieurs propriétés des NPs sont fortement dépendantes du solvant. Alors, il est important que le milieu de dispersion utilisé soit le plus près possible du milieu biologique lors de leur caractérisation pour, par exemple, des tests de toxicité sur des cellules humaines. De ce fait, il sera possible pour l'expérimentateur de mieux connaître l'état des particules à l'étude pour pouvoir ainsi effectuer des rapprochements entre leurs caractéristiques physicochimiques et leurs effets en milieu biologique (Djurišić *et al.*, 2015).

### **1.3 Les NPs d'oxyde de zinc**

Les NPs d'oxyde de zinc sont, avec les NPs de SiO<sub>2</sub> et de TiO<sub>2</sub>, les NPs dont la production est la plus élevée au niveau mondial. Elles font partie du groupe des NPs d'oxydes métalliques et sont particulièrement utilisées pour leurs propriétés antiseptiques ou dans l'industrie des cosmétiques, car elles absorbent les rayons ultraviolets. Elles sont aussi des candidats de choix pour des applications dans le domaine de l'électronique et dans le domaine biomédical. Dans la prochaine section, il sera d'abord question des propriétés du zinc et de son importance dans l'organisme. De plus, il y aura un survol de l'historique de l'utilisation des NPs d'oxyde de zinc. Ensuite, la synthèse des NPs d'oxyde de zinc sera décrite. Enfin, leurs effets dans des modèles *in vitro* et *in vivo* seront présentés.

#### **1.3.1 Le zinc et son importance dans l'organisme**

Le zinc est un élément essentiel chez de nombreuses espèces animales, dont les humains. En effet, 2 à 3 grammes de zinc sont stockés chez un adulte de 70 kg, desquels 2 à 3 milligrammes sont utilisés par jour (Sandstead *et al.*, 1996, Wastney *et al.*, 1986). Il a une demi-vie d'environ 280 jours dans l'organisme. Le zinc est nécessaire pour la croissance et le développement. Par exemple, dans des pays en voie de développement, la supplémentation en zinc favorise la croissance des enfants (Shrimpton *et al.*, 2005).

Le zinc est présent dans une panoplie de domaines protéiques et est essentiel pour l'activité de certaines d'enzymes et de facteurs de transcription. Des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose sont dépendantes de cet élément. Ainsi, en absence de cet élément, les fonctions de systèmes biologiques tels que le système immunitaire peuvent être perturbées (Maret *et al.*, 2006). En carence de zinc, il y a une atrophie du thymus, une

lymphopénie et une déficience de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Lorsque la carence devient chronique, le système immunitaire commence une reprogrammation : activation du stress cellulaire, production de glucocorticoïdes favorisant l'apoptose des prélymphocytes B et T (Fraker *et al.*, 2004). Par ailleurs, le ratio de lymphocytes CD4/CD8 a été proposé en tant que test immunologique robuste pour déceler des déficiences en zinc (Maret *et al.*, 2006).

### **1.3.2 Historique de l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de zinc**

L'utilisation des NPs remonte aux années 1980, date où les premiers brevets pour les formes nanométriques du dioxyde de titane et d'oxyde de zinc ont été déposés. Auparavant, l'oxyde de zinc sous forme pigment était déjà utilisé dans certaines crèmes solaires à cause de leur capacité d'absorber les rayons ultraviolets. Cependant, ses propriétés de diffraction de la lumière visible faisaient en sorte qu'il laissait une blancheur opaque après son utilisation. La forme pigment de l'oxyde de zinc contenait une certaine proportion du matériau sous forme nanoparticulaire. L'utilisation commerciale à grande échelle des NPs d'oxyde de zinc a commencé vers la fin des années 1990. Ceci a été rendu possible par le développement de méthodes d'isolation et de production contrôlée de particules dont la taille était inférieure à 100 nm. Ces NPs avaient l'avantage de maintenir les propriétés d'absorption des rayons ultraviolets tout en diminuant la diffraction de la lumière visible. Ainsi, des crèmes solaires contenant des concentrations de NPs d'oxyde de zinc suffisantes pour protéger de façon efficace, sans pour autant laisser de blancheur opaque après leur utilisation, ont vu le jour (Schilling *et al.*, 2010). Depuis, tel qu'il a été décrit précédemment, une panoplie d'industries ont adopté les NPs ZnO. Par ailleurs, leur niveau de production mondiale est le troisième plus élevé (550 tonnes par année), derrière seulement le dioxyde de silicium (5 500 tonnes par année) et le dioxyde de titane (3 000 tonnes par année) (Piccinno *et al.*, 2012).

### **1.3.3 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de zinc**

L'oxyde de zinc peut être présent sous trois formes cristallines, soit la forme wurtzite, la forme blende de zinc et la forme moins commune sel gemme. La forme wurtzite possède une forme hexagonale et est thermodynamiquement stable à température ambiante. La forme blende de zinc quant à elle est métastable, mais elle peut être stabilisée par certaines techniques lors de la synthèse. Par ailleurs, l'optimisation des paramètres de synthèse, tels que le type de précurseurs et de solvant, la température ou le pH, il est possible de produire des NPs de taille et de forme

différentes. En plus des nanosphères, nanotubes, nanofils, nanoaiguilles et des nanoanneaux, des formes plus exotiques telles que des cages, peignes, hélices, polyèdres, disques, fleurs, étoiles ou des assiettes peuvent ont pu être manufacturées. Chaque forme de NP a des propriétés structurales, optiques, électriques et physicochimiques distinctes. Les conditions de synthèse des NPs d'oxyde de zinc peuvent donc être optimisées pour obtenir la forme de NP avec les caractéristiques les plus adaptées à l'utilisation désirée (Sirelkhatim *et al.*, 2015). Le tableau 1.5 énumère des techniques de synthèse courantes et les morphologies de NPs d'oxyde de zinc pouvant être obtenues.

**Tableau 1.5. Exemples de techniques de synthèse et morphologies des NPs associées**  
Traduit avec autorisation de Sirelkharim *et al.* 2015

Technique	Morphologie des NPs
Décomposition par microondes	Sphère
Voie chimique en conditions humides simples	Fleurs, riz, flocons, anneaux, forme d'haltère
Procédé de précipitation simple	Flocons
Procédé de déposition	Forme d'haltère, bâtonnets
Synthèse hydrothermale	Bâtonnets en prisme hexagonal
Méthode solvothermale	Fleurs, bâtonnets, sphères
Méthode hydrothermale par microondes	En forme de mûre
Technique hydrothermale	Bâtonnets

L'oxyde de zinc est presque insoluble dans l'eau. Les NPs ont ainsi tendance à s'agglomérer rapidement pendant la synthèse. Puisque l'agglomération, la précipitation ou la non-dissolution des NPs générées peut interférer soit avec la poursuite de leur synthèse ou avec leur activité antimicrobienne, il est désormais commun d'ajouter des additifs stabilisateurs tels que l'alcool polyvinylique, le polyvinylpyrrolidone ou le polyacide  $\alpha$ ,  $\gamma$ , L-glutamique ou des agents dispersants tels que le polyéthylène glycol. Des agents de recouvrement tels que le silicate ou le carbonate de sodium ont aussi été utilisés avec succès (Sirelkhatim *et al.*, 2015). Dans l'industrie des cosmétiques et des crèmes solaires, la plupart des NPs d'oxyde de zinc synthétisées ont une taille initiale d'environ 10 à 20 nm. Cependant à cause de leur très forte tendance à l'agrégation, elles se retrouvent plutôt en tant qu'agrégat de 30 à 150 nm dans le produit fini (Schilling *et al.*, 2010).

Enfin, il est aussi commun d'incorporer d'autres métaux aux NPs pour améliorer leurs propriétés. Ce procédé, dénommé dopage, a été effectué avec succès en ajoutant de l'étain aux NPs d'oxyde de zinc pour augmenter leur activité bactéricide de contre le *S. aureus* (Jan *et al.*, 2013). Étant donné que les propriétés physicochimiques et l'activité biologique des NPs ZnO peuvent varier selon leur composition, il est important de bien les caractériser avant d'en étudier les capacités antiseptiques ou leur toxicité. Ainsi, il serait possible de corréliser leurs effets biologiques à leur activité biologique puis de comprendre comment leur composition et leur forme peuvent influencer leurs interactions avec les membranes biologiques (Sirelkhathim *et al.*, 2015).

#### **1.3.4 Effets *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules d'oxyde de zinc**

Tel qu'il a été discuté précédemment, les NPs présentes dans l'environnement peuvent pénétrer l'organisme par des voies variées, telles que l'exposition par inhalation, par ingestion ou par contact. Les NPs d'oxyde de zinc entrent dans la circulation pour ensuite s'accumuler dans des organes cibles tels que le foie, la rate, les reins, le thymus, les poumons, le cœur et le cerveau. Par ailleurs, la petite taille et le grand ratio aire de surface sur volume d'un matériau semblent avoir une grande influence sur sa distribution et son accumulation dans les organes. En effet, l'oxyde de zinc sous forme non nanométrique s'accumule de façon bien moins efficace dans l'organisme, comparativement à sa forme nanométrique (C. H. Li *et al.*, 2012). Aussi, les effets toxiques induits par l'oxyde de zinc nanoparticulaire chez une lignée humaine de cellules épithéliales pulmonaires (A549) sont plus importants que ceux induits par les formes plus grossières du matériau (R. Roy *et al.*, 2011). En plus de la taille, la forme des NPs d'oxyde de zinc peut aussi influencer l'étendue de leur potentiel cytotoxique. Par exemple, l'EC50 des NPs (à ratio aire de surface sur volume équivalent) sous forme de bâtonnets chez les cellules A549 est 8.5 µg/mL, alors que celui de celles de forme sphérique est de 12.1 µg/mL (Hsiao *et al.*, 2011, R. Roy *et al.*, 2015).

L'inhalation est une des voies d'exposition des NPs d'oxyde de zinc les plus favorisées. Étant donné que celles-ci ont tendance de s'accumuler plus profondément dans les voies respiratoires que leur équivalent non nanométrique, elles peuvent y interagir avec les cellules de l'épithélium alvéolaire ou avec les macrophages alvéolaires. Les NPs accumulées profondément dans les poumons pourraient par la suite y déclencher des processus inflammatoires. Une étude *in vitro* a démontré que les NPs d'oxyde de zinc induisent un stress oxydatif et des effets toxiques chez des cellules épithéliales alvéolaires de type II cultivées en suspension à l'interface air-liquide (Xie *et al.*, 2012). Également, après culture avec des concentrations croissantes de NPs de ZnO, des

cellules épithéliales alvéolaires humaines exhibaient une mort cellulaire augmentée accompagnée de l'augmentation de l'expression de trois marqueurs inflammatoires, L'IL-8, MCP-1 et l'ICAM-1 (Gojova *et al.*, 2007). D'autres signes de la toxicité induite par ces NPs sur l'épithélium pulmonaire sont la perte de l'intégrité membranaire des cellules, la perte des jonctions serrées, la dysfonction mitochondriale et l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires (R. Roy *et al.*, 2015).

Des études sur des modèles animaux ont démontré que l'inhalation de NPs d'oxyde de zinc peut déclencher des processus inflammatoires. Par exemple, celles-ci ont induit le recrutement de cellules immunitaires et le déversement de médiateurs solubles pro-inflammatoires dans les poumons lors d'un modèle d'instillation pulmonaire de rats (Sayes *et al.*, 2007). Quelques études ont aussi été menées sur des volontaires humains, cependant les résultats obtenus sont parfois contradictoires. D'une part, un rapport démontre que la fumée d'oxyde de zinc induit un recrutement pulmonaire de neutrophiles et une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et facteur de nécrose tumorale (TNF) chez des volontaires humains sains (Kuschner *et al.*, 1995). D'autre part, un rapport plus récent étudiant l'effet de l'inhalation d'oxyde de zinc sous forme microparticulaire et sous forme nanoparticulaire chez des volontaires humains sains conclut que l'exposition à 500 microgrammes de NPs par mètre cube pendant deux heures est sous le seuil nécessaire pour déclencher des effets systémiques aigus. Il est cependant difficile de quantifier à combien cela correspond au niveau sanguin (Beckett *et al.*, 2005).

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'induction subséquente de stress oxydatif cellulaire ainsi que l'induction de l'inflammation par la libération de médiateurs solubles sont les procédés par lesquels les NPs d'oxydes métalliques, dont l'oxyde de zinc, altèrent l'homéostasie cellulaire pour induire l'apoptose ou la nécrose (Ignacio *et al.*, 2014). Par ailleurs, chez une lignée rénale humaine (HK-2), les cellules exposées aux NPs d'oxyde de zinc ont une augmentation de la translocation du NF- $\kappa$ B est observée (Pujalte *et al.*, 2011). Ainsi, la cellule tente de neutraliser l'augmentation du stress oxydatif cellulaire par l'augmentation de la translocation de NF- $\kappa$ B, favorisant la transcription de l'ARNm de protéines aux propriétés antioxydantes. Néanmoins, à des concentrations de NPs trop élevées, ce mécanisme pourrait ne pas suffire pour permettre le retour à l'homéostasie et détourner à la mort cellulaire (R. Roy *et al.*, 2015). Parallèlement, la cellule augmente la réponse anti-oxydante dépendante du facteur de transcription NRF-2. Celui-ci induit des enzymes participant à l'inactivation et à l'élimination des ROS dont l'hème oxygénase-1 (Nguyen *et al.*, 2009). Les NPs de TiO<sub>2</sub> activent l'activité du facteur

de transcription NRF-2 chez des modèles d'exposition murins (Hu *et al.*, 2010, J. Wang *et al.*, 2011, Ze *et al.*, 2013).

Il a été proposé que l'induction de la toxicité des NPs d'oxyde de zinc sur les cellules passe par deux mécanismes complémentaires. D'un côté, à cause de leur petite taille, les NPs peuvent lier avec plus ou moins d'affinité diverses protéines ayant des rôles clés telles que les immunoglobulines, des lipoprotéines, l'albumine, et la transferrine, entre autres. Ceci peut être médié par des interactions électrostatiques ou par des liens chimiques entre les molécules de surface de la NP et les protéines cibles. Par ailleurs, les NPs en solution dans le milieu biologique ont tendance à agglomérer davantage que celles dans l'eau. Ces agglomérats ont pour leur part tendance à lier davantage de protéines, et ce en plus grand nombre (Deng *et al.*, 2009). Cette liaison entre les NPs et les protéines pourrait induire par la suite l'oxydation ou la modification structurelle de ces dernières et finalement causer leur perte de fonction (Niemeyer, 2001). L'inactivation de protéines avec des fonctions cellulaires importantes peut perturber l'homéostasie et amener la cellule à un état de stress. Lorsque celui-ci n'est pas résolu de façon efficace, cela déclenche les processus de mort cellulaire.

D'un autre côté, les NPs d'oxydes métalliques peuvent se dissoudre, ce qui ferait augmenter la concentration d'ions métalliques dans les milieux biologiques. Les NPs peuvent libérer davantage d'ions en milieu acide en présence de protéines. Ainsi, celles ayant atteint le système sanguin ou celles ayant été internalisées dans les cellules peuvent induire des effets toxiques associés à l'augmentation d'ions métalliques du milieu. Celle-ci est normalement strictement régulée au sein des cellules et demeure faible. Par exemple, les ions  $Zn^{2+}$  intracellulaires sont surtout liés à des protéines telles que les métallothionéines ou ils sont maintenus dans les mitochondries ou les lysosomes. Toutefois, l'augmentation de leur concentration intracellulaire peut induire un stress cellulaire et déclencher des processus inflammatoires (R. Roy *et al.*, 2015). En effet, une étude menée sur diverses lignées cellulaires (A549, cellules épithéliales colorectales humaines (Caco2) et des fibroblastes murins (Balb/c 3T3)) a démontré que les effets toxiques induits par les NPs d'oxyde de zinc étaient attribuables à l'effet des ions  $Zn^{2+}$  (Ivask *et al.*, 2015). Une étude menée sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines incubées avec du milieu de culture ayant ou non été conditionné par des NPs d'oxyde de zinc (celles-ci sont retirées du milieu par centrifugation) a quant à elle démontré que ce sont les NPs et non leurs ions qui sont responsables de l'induction de la libération de médiateurs solubles pro-inflammatoires (Gojova *et al.*, 2007). Une autre étude stipule que les NPs d'oxyde de zinc instillées sont en mesure d'induire une inflammation éosinophilique et neutrophilique aux poumons de rats, alors que leurs ions



n'induisent qu'un faible recrutement réversible de neutrophiles (Cho *et al.*, 2012). Davantage d'études seront nécessaires pour bien comprendre l'implication des ions métalliques dans le mécanisme de toxicité des NPs, car à ce jour la littérature sur le sujet demeure plutôt déficiente (R. Roy *et al.*, 2015).

Les cellules du système immunitaire sont parmi les premières à entrer en contact avec les NPs. En effet, les macrophages comptent parmi les premiers détecteurs de l'inflammation induite par les NPs dans les poumons à la suite d'une exposition par inhalation et les neutrophiles sont une des premières cellules y étant recrutées. Les NPs ayant traversé la barrière endothéliale intègrent la circulation sanguine, ainsi d'autres leucocytes pourraient aussi entrer en contact avec celles-ci. Les macrophages et les lymphocytes sont sensibles à l'exposition aux NPs d'oxyde de zinc (R. Roy *et al.*, 2015). Celles-ci ont aussi des effets toxiques sur la viabilité de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris (BMDC) et de la lignée de macrophages murins RAW 264.7 (Palomaki *et al.*, 2010). Cette toxicité est par ailleurs inversement proportionnelle à la taille des particules présentes. Chez les macrophages murins, les NPs d'oxyde de zinc sont internalisées par les macrophages par endocytose médiée par les cavéoles et déclenchent l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire et conduisant à un stress oxydatif menant à la mort cellulaire. Les études menées sur les macrophages murins, les BMDC et les RAW 264.7 ont démontré que les NPs d'oxyde de zinc induisent la libération des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et interleukines 1 $\beta$ , 6, 10 et 17, ainsi que des chimioattractants CXCL-5, CXCL-9 et CXCL-10. Ces NPs favorisent la maturation de la lignée de macrophages murins (augmentation CD11c). De plus, elles augmentent l'expression des protéines impliquées dans la présentation antigénique (CMH II, CD1d) ainsi que celle des protéines impliquées dans la co-stimulation des lymphocytes (CD40 et CD86) chez les RAW 264.7 et les BMDC. Ces NPs semblent donc augmenter la capacité de ces cellules « sentinelles » à promouvoir l'inflammation en activant les lymphocytes. La libération de médiateurs solubles induite par les NPs d'oxyde de zinc chez les macrophages murins semble nécessiter leur internalisation dans la cellule. En fait, cette dernière est abolie en présence d'inhibiteurs de l'endocytose médiée par les cavéoles. (Palomaki *et al.*, 2010, R. Roy *et al.*, 2014d). En somme, les NPs d'oxyde de zinc promeuvent la production de signaux pro-inflammatoires favorisant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires.

Contrairement à ce qui a été décrit précédemment pour la majorité des leucocytes, les NPs d'oxyde de zinc n'induisent ni la mort cellulaire des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) ni leur production de réactifs oxygénés. Cependant, ces NPs peuvent tout de même en activer

les cascades de signalisation (augmentation des phosphoprotéines), augmenter leur synthèse protéique *de novo* et favoriser leurs processus de dégranulation et de phagocytose (Babin *et al.*, 2013, Babin *et al.*, 2015, Goncalves *et al.*, 2014). La régulation du recrutement, de la fonction, de l'entrée en apoptose et de l'efferoctose des PMNs par les macrophages lors des processus inflammatoires est stricte. Les neutrophiles sous-activés ne peuvent pas prendre en charge l'élimination des pathogènes de façon adéquate, ce qui rend l'organisme susceptible aux infections. Au contraire, leur suractivation peut empêcher la résolution de l'inflammation et favoriser l'apparition de pathologies associées à l'inflammation chronique telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la goutte (Sibilia, 2007). Ainsi, le retard de l'apoptose spontanée des PMNs induite par les NPs d'oxyde de zinc pourrait alors être considéré comme un mécanisme indirect de cytotoxicité (Saptarshi *et al.*, 2015).

La recherche sur l'effet des NPs d'oxyde de zinc sur les cellules immunitaires prend de l'importance, toutefois celle-ci demeure insuffisante. Les tableaux 1.6 et 1.7 résument les principales études menées au cours des dernières années. Tel qu'il a été présenté ci-dessus, les NPs ZnO n'affectent pas toutes les cellules de la même façon. Il sera donc important de faire davantage d'études pour déterminer si elles modulent les fonctions et la viabilité d'autres types de cellules du système immunitaire. Des études subséquentes permettront ensuite d'élucider les mécanismes cellulaires impliqués puis d'en établir l'effet du point de vue systémique.

**Tableau 1.6. Survol des études *in vivo* récentes traitant de l'effet de l'exposition aux NPs ZnO**  
Traduit avec autorisation de Saptarshi *et al.* 2015

Voie d'exposition	Animal	Traitement et durée	Observations
<b>Instillation intratrachéale/ inhalation</b>	Souris	80 µg de ZnO NPs dans 30 µL d'eau distillée mesurée après 48h/ 0.86 mg/m <sup>3</sup> ZnO NPs aérosolisées, 5h/jour, évaluation après 5 jours	Les ions Zn <sup>2+</sup> des NPs ZnO ou d'un sel de zinc ont des mécanismes d'induction de toxicité pulmonaire différents
<b>Instillation intratrachéale</b>	Souris	Dose unique de 80 µg/µL Évaluation 2, 7, 14 and 28 jours après instillation	L'exposition à une dose unique de NPs ZnO produit une inflammation pulmonaire de courte durée, par un mécanisme impliquant les TLR dépendant de MyD88. De plus, l'inflammation induite par les NPs ZnO est distincte de celle induite par les ions.
<b>Gastro-intestinale, intrapéritonéale</b>	Souris	ZnO NPs à 1, 10 et 100 mg/kg (poids corporel) quotidiennement. Évaluation après 14 jours.	La voie d'exposition intrapéritonéale est plus toxique que la voie gastro-intestinale. Présence de dysfonction hépatique.
<b>Orale</b>	Rat  Souris	ZnO NPs (500, 1000, 2000 mg/kg) trois fois par gavage à 0, 24 et 45h.  ZnO NPs 10 mL/kg, deux fois, à un intervalle de 24h.	Les NPs ZnO avec des modifications de surface n'induisent pas de génotoxicité <i>in vivo</i> chez le rat ni chez la souris.

<b>Orale</b>	Rat	ZnO NPs administrées à 333.33 mg/kg par jour. Évaluation après 5 jours.	ZnO NPs causent des blessures hépatiques, de la toxicité rénale et de l'inflammation pulmonaire.
<b>Orale</b>	Rat	300 mg/kg ou 50 mg/kg ZnO NPs pendant 14 jours. Évaluation après les 14 jours.	Exposition orale subaiguë aux NPs ZnO NPs. Induit des dommages à l'ADN médiés par les ROS et l'apoptose dans le foie.
<b>Orale</b>	Rat	Dose unique de NPs ZnO : 500 mg/kg pendant 21 jours consécutifs. Évaluation au dernier jour.	NPs ZnO ont augmenté les niveaux de ROS et ont altéré l'activité des enzymes antioxydants dans les érythrocytes, le foie et le cerveau. Le potentiel neurotoxique a été évalué.
<b>Oral</b>	Rat	Dose unique de ZnO NPs : 50, 300 ou 2000 mg/kg. Évaluation : des échantillons sanguins ont été recueillis après 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48, 72 et 96 heures. Des échantillons de tissu ont été recueillis après 1 et 6 heures et aux jours 1, 2, 3 et 7. De l'urine et des fèces ont été récoltées après 4 et 10 heures et aux jours 10 et 14 après le traitement.	Le ZnO sous forme ionique est absorbé. Le foie, les poumons et les reins sont des organes cibles potentiels pour l'accumulation. La toxicité des NPs ZnO a été indépendante de la taille des particules ou du genre. Les NPs ZnO sont excrétées à travers les fèces.
<b>Instillation intratrachéale inhalation</b>	Rat	10 mg/mL jusqu'à 72h 5 mg/mL jusqu'à 24h (1.1 et 4.9 mg/m <sup>3</sup> ) (5 heures/jour, 5 jours/semaine pour 30 jours)	Les NPs ZnO pourraient causer de l'insuffisance cardiaque.
<b>Inhalation</b>	Souris	3.5 mg/m <sup>3</sup> , 4 heures/jour. Évaluation après 2 ou 13 jours.	Les NPs ZnO ont une toxicité subchronique faible.
<b>Injection intrapéritonéale</b>	Souris	500 µL (0.25, 0.5, 1 et 3 mg) ZnO avec ou sans ovalbumine. Évaluation 30 jours après l'exposition.	Effet d'adjuvant pour l'allergène lors de réponses immunitaires de type Th2 induites par l'ovalbumine.
<b>Instillation intratrachéale</b>	Rat	NPs ZnO 0.2 mg/0.4 mL ou ZnCl <sub>2</sub> en dose unique. Évaluation : 1, 24, 72 heures et une semaine après l'exposition.	Les NPs ZnO induisent un stress oxydatif dans le poumon lors de la phase aiguë.
<b>Inhalation</b>	Rat	6 heures un jour : 2.1x10 <sup>6</sup> particules/cm <sup>3</sup> ; NPs ZnO de 38 nm.	Une voie de translocation des NPs ZnO volatiles entre le bulbe olfactif et le cerveau a été étudiée, incluant une translocation interneurones par endocytose.
<b>Inhalation</b>	Rat	Rats exposés à des NPs ZnO de 35.6 nm à une concentration de 1x10 <sup>5</sup> mm <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> . Pendant 6 heures. Évaluation après 24 heures d'exposition.	Les NPs ZnO augmentent l'expression de protéines impliquées dans le cancer et induisent une toxicité pulmonaire dans le liquide de lavages broncho-alvéolaires de rats.

**Tableau 1.7. Survol des études *in vitro* récentes traitant de l'effet de l'exposition aux NPs ZnO**  
Traduit avec autorisation de Saptarshi *et al.* 2015

Taille des NPs ZnO et dose	Type cellulaire	Espèce	Observations
Tampon citrate, 20 nm 10 µg/mL	Kératonocytes HaCaT	Humain	Les NPs ZnO induisent une réponse inflammatoire par la voie ROS-ERK-Egr-1.

28 nm, 12.5 µg/mL	Calu-3	Humain	Les NPs ZnO se déplacent de façon transcellulaire sans perturber les jonctions cellulaires.
Environ 4 nm, 5-50 µg/mL	Fibroblastes NIH/3T3	Souris	Cytotoxicité dépendante de la présence de phosphates dans le milieu et du degré d'agglomération.
50-70 nm, < 1 µm 5-80 µg/mL	A549	Humain	Les effets du sérum sur la cytotoxicité ont été explorés.
Z-COTE (44 nm x 73 nm) Nanosun 25 nm HP1 (28 nm x 96 nm) Max (36x95 nm) 25 µg/mL	Cellules de la muqueuse olfactive dérivées de la neurosphère	Humain	La toxicité des NPs ZnO est médiée par l'inflammation et l'apoptose, mais indépendante des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Modification de la surface diminue la toxicité des NPs ZnO.
<50 nm et <100 nm	Monocytes THP1	Humain	Cytotoxicité et inflammation dépendante de la taille
25 nm 6 µg/m <sup>3</sup> à l'interface air/liquide et 45 µg/mL en immersion	Cellules épithéliales alvéolaires sub-cultivées à l'interface air/liquide	Souris	Des niveaux faibles et critiques d'ions Zn <sup>2+</sup> intracellulaire, concentrés dans les endosomes et les lysosomes, sont essentiels pour la toxicité.
Intactes ou dispersées à l'aide d'un surfactant. 30, 80 et 200 nm. 10, 50 et 100 µg/mL	Monocytes THP-1	Humain	Dissolution intracellulaire des NPs ZnO est requise pour la cytotoxicité
Intactes ou dispersées à l'aide d'un surfactant. 30, 80 et 200 nm. 10, 50 et 100 µg/mL	A549	Humain	La présence des NPs ZnO avec faible solubilité dans le microenvironnement cellulaire contribue au déclenchement de puissantes réponses antioxydantes et pro-inflammatoires.
NPs ZnO 60 nm et NPs ZnO dopées à l'Al 50 nm. 50 mg/mL	A549	Humain	La contribution des ions Zn <sup>2+</sup> envers la cytotoxicité totale est de 10%.
8, 10, 18.3 et 28 nm. 5-100 µg/mL	Jurkat	Humain	La dissolution extracellulaire des NPs ZnO induit de la cytotoxicité. Induction de l'apoptose par la voie alternative indépendante des caspases.
ZnO APTES et ZnO PEG 39 nm. 10, 50, 100 µg/mL	Monocytes THP1	Humain	La meilleure option pour limiter la cytotoxicité des NPs ZnO est d'en diminuer l'absorption en modifiant leur surface.
Hexagonal 15.5 nm. 20 µg/mL	Cellules MCF-7 de carcinome du sein	Humain	Cytotoxicité : les NPs ZnO inhiberaient l'enzyme antioxydant MGST1.
70 nm non-modifié, cationique, anionique, non-ionique. 0-300 µg/10 <sup>6</sup> cellules	Monocytes THP-1	Humain	Des concentrations sub-toxiques de NPs ZnO n'ont pas induit l'expression de HLA DR ou de CD14 ni la libération de TNF-α. Or, de faibles niveaux de la molécule d'adhésion CD11b ont été observés.
Sans revêtement 30 nm. 0-4 µg-cm <sup>3</sup>	BEAS-2B	Humain	Les NPs ZnO induisent l'expression du gène IL-8 via l'activation de la transcription et la stabilisation de l'ARNm. Celle-ci dépend de l'endocytose des NPs.
71 nm 25 µM	MLE12 et RAW264.7	Souris	La protéine adaptatrice MyD88 est impliquée dans l'inflammation dépendante des NPs ZnO.
<50nm 2.5 µg/mL	Macrophages	Souris	Inflammation dépendante de la signalisation des MAPK induite par le TLR6.

<b>Revêtement carboxyle</b> <b>&lt;20 nm</b> <b>0.02-100 µg/mL</b>	Neutrophiles de sang veineux	Humain	Les NPs ZnO activent les neutrophiles, retardent l'apoptose par un mécanisme dépendant de la synthèse <i>de novo</i> de protéines et indépendant des ROS.
<b>30 nm</b> <b>0.8, 2, 8, 14-20 µg/mL</b>	Hep-G2	Humain	ROS, apoptose indépendante de la voie JNK.
<b>Aminopolysiloxane</b> <b>Limitée à 60 nm</b> <b>0-10 µg/mL</b>	Cellules des ganglions rétinien RGC-5	Souris	Surproduction ROS, stress du réticulum endoplasmique, apoptose/nécrose, surproduction de caspase 12.
<b>20 nm</b> <b>1, 5, 10, 40, 80 µg/cm<sup>2</sup></b>	Macrophages RAW234.7	Souris	Cytotoxicité induite de façon indépendante de p47phox et de Nrf2.
<b>45 nm</b> <b>4, 8, 12 µg/mL</b>	Astrocytes primaires	Souris	ROS, apoptose induite par la voie JNK
<b>Bâtonnets</b> <b>Largeur 15.38 nm, longueur 82.34 nm.</b> <b>10 µg/mL</b>	Cellules de l'épiderme JB6 Cl 41-5a	Souris	NPs ZnO induisent l'autophagie et les ROS.
<b>Avec revêtement 70 à &gt;100 nm. Sans revêtement 58-93 nm</b> <b>0.5-256 µg/mL</b>	Cellules de l'épithélium rénal HK-2	Humain	Augmentation d'IL-8, IL-6, ROS, dommages à l'ADN. Aucune modulation de la libération de TNF-α et de MCP-1.
<b>≤35 nm</b> <b>10-1000 µg/mL</b>	Cellules embryonnaires rénales (HEK293) Fibroblastes embryonnaires (NIH/3T3)	Humain Souris	La co-exposition des ZnO NPs avec les UV-B induit des dommages génotoxiques antagonistes.
<b>Intactes ou dispersées à l'aide d'un surfactant 30, 80 et 200 nm.</b> <b>10,50, 100 µg/mL</b>	Cellules de l'épithélium pulmonaire (L-132)	Humain	Toxicité médiée par les ROS et par l'apoptose
<b>&lt;50 nm</b> <b>2.5 µg/mL</b>	Macrophages	Souris	La voie des cavéoles permet l'internalisation des NPs ZnO. La cascade signalétique des MAPKs médiée par la PI3K est impliquée dans les réponses inflammatoires.
<b>5.6-560 nm</b> <b>5-80 ppm</b>	Triple co-culture des cellules des voies respiratoires	Humain	Il existe des différences dans l'exposition aux NPs ZnO sous forme d'aérosol ou en suspension.

## CHAPITRE 2 : L'INFLAMMATION

L'inflammation est une réponse normale du système immunitaire envers les pathogènes ou des dommages tissulaires, contribuant au retour à l'homéostasie tissulaire. Celle-ci est indispensable à la fois pour retirer l'agent nocif et pour mettre en branle le processus de guérison de façon adéquate. Cependant, même si l'inflammation est désirable, elle peut avoir des conséquences néfastes si elle est mal régulée. Par exemple, des maladies telles que le psoriasis, l'asthme et la goutte sont associées à une réponse inflammatoire chronique. La prochaine section fera d'abord un survol sur le système immunitaire, permettant de mettre en contexte l'utilité de l'inflammation lors des réponses immunitaires. Par la suite, l'inflammation de type aigu ou de type chronique sera décrite et de l'implication des éosinophiles en tant que cellules effectrices sera abordée.

### 2.1 Le système immunitaire

Au cours de l'évolution, un système immunitaire ayant la capacité de différencier le soi du non-soi a été développé. Celui-ci permet de détecter, de neutraliser et d'éliminer les microorganismes pathogènes ainsi que les toxines leur étant associées afin de maintenir l'intégrité et l'homéostasie de l'hôte. La réponse du système immunitaire repose sur deux mécanismes fondamentaux complémentaires, soit la réponse innée et la réponse adaptative (Beutler, 2004).

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense, non spécifique, de l'organisme envers les infections. Elle inclut des défenses physiques (épithéliums, mucus, etc.), des protéines solubles (protéines du complément, cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques, etc.) ainsi que des protéines non solubles (ex. récepteurs des motifs moléculaires associés aux microorganismes) (Aderem *et al.*, 2000, Akira *et al.*, 2006). Son activation est rapide, étant donné que ses composantes sont exprimées de façon constitutive ou qu'elles sont facilement activées à la suite de l'interaction avec le pathogène. Elle permet ainsi le recrutement rapide de neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK. Cette infiltration cellulaire perdure jusqu'à ce que le pathogène soit éliminé et se résout sous l'action de cytokines anti-inflammatoires (Chaplin, 2010, Turvey *et al.*, 2010)

La réponse immunitaire adaptative repose principalement sur les récepteurs antigène-spécifiques présents sur les lymphocytes B et T. Ceux-ci sont formés par des procédés de recombinaison somatique et sont contrôlés sévèrement par des mécanismes d'induction de la tolérance du soi afin d'assurer l'innocuité de la réponse immunitaire envers l'hôte (Pasare *et al.*, 2004). Après la

résolution de l'inflammation, une portion des lymphocytes demeurent dans l'organisme pour générer une mémoire immunologique permettant de développer des réponses immunitaires contre le même pathogène plus rapidement et limiter ainsi l'apparition ou la durée de symptômes (Chaplin, 2010).

Même si les deux composantes de la réponse immunitaire sont fondamentalement différentes, leur effet est complémentaire. Par exemple, la réponse innée ralentit l'invasion pathogénique le temps de monter la réponse adaptative. Par la suite, des composantes de la réponse innée participent à l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Celles-ci peuvent aussi à leur tour déclencher d'autres mécanismes effecteurs innés pour compléter la prise en charge des pathogènes (Chaplin, 2010, Medzhitov *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 2007).

## **2.2 L'inflammation**

Le système immunitaire réussit normalement à se débarrasser des pathogènes efficacement sans trop causer de dommages aux tissus environnants afin de prévenir une inflammation soutenue. Cependant, un certain degré d'inflammation est nécessaire, car elle permet de mobiliser un grand nombre d'éléments clés de la réponse immunitaire. Dans la prochaine partie, l'inflammation aigue et bénigne sera décrite. Par la suite, il sera question des effets associés au maintien chronique de l'inflammation. Enfin, les rôles des éosinophiles au cours de l'inflammation seront abordés.

### **2.2.1 L'inflammation aigue**

L'inflammation est un processus normal de la réponse de l'organisme envers des pathogènes ou des dommages tissulaires et contribue au retour à l'homéostasie tissulaire. Elle est caractérisée par cinq symptômes principaux soit la chaleur, la rougeur, la tuméfaction, la douleur et, dans certains cas, la perte de fonction. Ces symptômes sont principalement associés à la vasodilatation permettant l'apport de leucocytes et de médiateurs solubles dans les régions enflammées (Medzhitov, 2010). L'inflammation aigue est un processus qui se déclenche rapidement. Elle est suivie d'étapes d'amplification et de résolution mettant fin au processus tout aussi rapidement. Par exemple, l'infiltration cellulaire induite par des agonistes tels que le LPS, l'IL-4, l'IL-15 et l'IL-21 dans le modèle murin de la poche d'air est maximale après 6 à 9 heures et est entièrement résolue après 24 heures (D. M. Gonçalves *et al.*, 2011, Moisan *et al.*, 2007, Pelletier *et al.*, 2004, Ratthé *et al.*, 2009). L'inflammation est initiée lorsque les macrophages résidents sont activés par des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou aux

motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) tels que le LPS ou l'adénosine triphosphate (ATP). Ceux-ci sécrètent alors des cytokines et des chimiokines permettant le recrutement d'une première vague de neutrophiles. Pendant l'étape d'amplification, les neutrophiles et les macrophages activés sécrètent des médiateurs solubles favorisant la vasodilatation ainsi que le recrutement de davantage de neutrophiles. Ces derniers éliminent les pathogènes en les phagocytant, en relâchant des enzymes protéolytiques et en générant des espèces réactives de l'oxygène. Ils libèrent également des médiateurs solubles permettant de recruter des monocytes, d'autres cellules participant efficacement à la prise en charge du pathogène. Pendant l'étape de résolution, il y a un retrait des signaux chimioattractants, l'efferocytose des neutrophiles restants par les macrophages ou leur retour à la circulation sanguine et la libération de médiateurs solubles anti-inflammatoires favorisant le retour à l'homéostasie (Chovatiya *et al.*, 2014, Lawrence *et al.*, 2002, Liddiard *et al.*, 2011, Mantovani *et al.*, 2011).

### **2.2.2 L'inflammation chronique**

L'inflammation chronique est le fruit d'une mauvaise régulation de l'étape de résolution de l'inflammation aiguë. Elle mène à la persistance de l'infiltration de cellules telles que les lymphocytes et les macrophages dans les tissus affectés. Elle peut notamment mener à des lésions tissulaires importantes, la perte de fonction et aller jusqu'à la destruction du tissu (Chovatiya *et al.*, 2014, David Gonçalves, 2015, Lawrence *et al.*, 2002). L'inflammation chronique est à la source de pathologies diverses telles que des maladies auto-immunes (lupus, arthrite rhumatoïde, sclérose en plaques, maladies inflammatoires de l'intestin), des maladies cardiovasculaires et même certains types de cancers. L'inflammation chronique des voies respiratoires à la suite d'expositions répétées à des allergènes volatiles peut mener à l'établissement de maladies telles que l'asthme (Manabe, 2011, Tabas *et al.*, 2013, White *et al.*, 2013).

### **2.2.3 Les éosinophiles : des cellules de l'inflammation**

Les éosinophiles sont des cellules de l'immunité innée ne représentant qu'environ 5 % des leucocytes sanguins. Or, leur nombre dans le sang ou dans les tissus périphériques augmente couramment lors des infections parasitaires, lors du syndrome de Churg-Strauss, lors de certains désordres gastro-intestinaux ou métaboliques et lors des réactions allergiques. Leur recrutement



aux sites inflammatoires est principalement dépendant des éotaxines-1,2,3 (Fulkerson *et al.*, 2013, Ohnmacht *et al.*, 2007). Les éosinophiles contiennent une panoplie de médiateurs solubles, pouvant être rapidement libérés lorsqu'ils sont activés. Ces médiateurs comprennent des cytokines, des chimiokines, des médiateurs lipidiques et des protéines granulaires cytotoxiques pouvant amorcer, amplifier et soutenir des réponses inflammatoires. La libération de ces protéines par les éosinophiles contribue à la prise en charge des parasites pathogènes. Cependant, si sa régulation est déficiente, elle peut induire des dommages sur les tissus environnants (Jacobsen *et al.*, 2007). L'implication des éosinophiles dans la pathogenèse de l'asthme est bien documentée, avec une contribution particulièrement marquée de l'éotaxine-3. Ceux-ci promeuvent l'inflammation en contribuant à l'hyperréactivité et au remodelage des voies respiratoires ainsi que dans l'augmentation de la production de mucus (Larose *et al.*, 2015, Possa *et al.*, 2013).

Le dépôt de protéines granulaires sur les organes est un des signes souvent observés lors des pathologies associées à l'infiltration éosinophilique. La protéine basique majeure (MBP), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et la peroxydase éosinophilique (EPO) sont les quatre protéines cristallines, à forte charge positive, se retrouvant au cœur des granules (Fulkerson *et al.*, 2013). La MBP et l'EPO ont des effets toxiques sur plusieurs types de cellules, telles que celles de l'épithélium des voies respiratoires (Brottman *et al.*, 1996) et celles du muscle cardiaque (Tai *et al.*, 1982). Ainsi, leur déposition sur les organes peut contribuer à l'apparition de dommages tissulaires et à la perte de fonction des organes chez les patients atteints d'asthme ou du syndrome hyperéosinophilique. De leur côté, l'ECP et l'EDN sont associées à la défense contre les virus, à cause de leur activité ARNase, et elles participeraient au remodelage des tissus ayant lieu pendant l'asthme ou pendant l'œsophagite éosinophilique (Bystrom *et al.*, 2011, Rosenberg, 2008).

Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'infiltration cellulaire ayant lieu au site de l'inflammation est dépendante du recrutement des cellules, mais aussi du ralentissement de leur apoptose spontanée (Simon *et al.*, 1997). Alors, par exemple, un facteur retardant l'apoptose spontanée des granulocytes neutrophiles, tel que les NPs d'oxyde de zinc (Goncalves *et al.*, 2014), peut augmenter l'infiltration neutrophilique lors de l'inflammation. Or, la persistance des neutrophiles au site de l'inflammation et l'activation de leur dégranulation pourraient leur permettre de libérer plus de médiateurs solubles pendant une plus longue durée de temps. Cela favoriserait ainsi l'induction de dommages sur des tissus sains, au lieu de se limiter aux cellules infectées (Geering *et al.*, 2013). Contrairement aux neutrophiles humains, il n'y a pas d'études évaluant l'effet des

NPs d'oxyde de zinc sur les fonctions des éosinophiles humains à ce jour. De ce fait, une meilleure compréhension de l'effet de ces nouveaux nanomatériaux sur les éosinophiles humains sera nécessaire pour deux raisons principales. D'abord, ces cellules contiennent une variété de médiateurs importants lors de la réponse immunitaire, mais potentiellement dangereux pour les tissus sains si leur libération est dérégulée. Enfin, leur implication dans certaines pathologies d'origine inflammatoire est bien documentée.

## CHAPITRE 3 : LES ÉOSINOPHILES

Les éosinophiles sont des cellules immunitaires de la lignée myéloïde appartenant à la famille des granulocytes. Ils sont caractérisés par leur grand nombre de granules basiques, leur donnant une couleur rosée en microscopie optique après coloration avec l'éosine. Ils sont notamment connus pour leur rôle dans la défense du corps envers les vers parasites. Cependant, leur rôle dans la modulation des réponses inflammatoires a été mis de l'avant au cours des dernières années. En effet, ceux-ci agissent aussi en tant que source d'un grand nombre de médiateurs solubles, dont des cytokines exacerbant les réponses inflammatoires. Dans ce chapitre, un survol présentant les caractéristiques principales des éosinophiles sera d'abord présenté. Ensuite, leur implication dans la santé humaine sera décrite. Enfin, les études mettant en évidence un lien entre les nanoparticules et les fonctions des éosinophiles seront énumérées.

### 3.1 Que sont les éosinophiles ?

Les éosinophiles sont des cellules peu fréquentes dans la circulation sanguine, ne représentant que d'un à trois pour cent des lymphocytes totaux chez les humains sains. Leur petit nombre a souvent eu l'effet d'un frein sur l'intensité de leur étude. Ainsi, ils ont longtemps été simplement caractérisés en tant que producteurs de granules cytotoxiques combattant les infections par des vers parasites. Par contre, au cours des dernières années, des méthodes moléculaires et des modèles murins ont été développés, permettant de mieux connaître les fonctions des éosinophiles. Dans la prochaine section, la vie de l'éosinophile sera présentée, de sa genèse au sein de la moelle osseuse, jusqu'à sa mort par apoptose.

#### 3.1.1 Devenir un éosinophile

Les éosinophiles sont des cellules immunitaires de la lignée myéloïde, appartenant à la famille des granulocytes. Chez l'humain, leur développement a majoritairement lieu au niveau de la moelle osseuse. Des cellules souches hématopoïétiques exprimant le marqueur de surface CD34 sont transformées en éosinophiles matures sous l'influence d'interactions avec des cellules résidentes telles que les cellules stromales, les monocytes, les lymphocytes T et de leurs médiateurs solubles (Civin *et al.*, 1984, Sergejeva *et al.*, 2004). Une faible proportion du développement des éosinophiles peut aussi avoir lieu dans les organes lymphoïdes secondaires

tels que la rate, le thymus, et les nœuds lymphatiques (Uhm *et al.*, 2012). Une sous-population de cellules progénitrices commises à la différenciation en éosinophiles est formée à partir de cellules souches hématopoïétiques sous l'effet des facteurs de transcription GATA-1, GATA-2, des faibles niveaux de PU.1 et des niveaux élevés de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\epsilon$  (Iwasaki *et al.*, 2006, McNagny *et al.*, 2002). Ces progéniteurs des éosinophiles expriment les récepteurs à l'IL-3, à l'IL-5 et au GM-CSF (IL-3RA<sup>+</sup>, IL-5RA<sup>+</sup>, GM-CSF-R- $\alpha$ <sup>+</sup>,  $\beta$ c<sup>+</sup>), CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>; ont de faibles niveaux du facteur de transcription FOG-1 et n'expriment pas le récepteur CD45RA (J. J. Lee *et al.*, 2012). Les progéniteurs des éosinophiles sont en aval des progéniteurs myéloïdes communs (cellules négatives pour le récepteur à IL-5) et sont indépendants des progéniteurs des granulocytes/macrophages et des progéniteurs des mégacaryocytes/érythrocytes. Les progéniteurs des éosinophiles ne se différencient pas en neutrophiles, ni en monocytes, ni en érythrocytes. De même, les progéniteurs des granulocytes/macrophages ou des mégacaryocytes/érythrocytes ne peuvent pas se différencier en éosinophiles (Mori *et al.*, 2009).

La décision des de se commettre dans dépend principalement de

L'équilibre de l'activité des facteurs de transcription GATA-1 et FOG-1 dirige si les progéniteurs myéloïdes communs vont se commettre vers la lignée des progéniteurs des éosinophiles, des granulocytes/macrophages ou des mégacaryocytes/érythrocytes (McNagny *et al.*, 2002). En effet, GATA-1 est nécessaire pour la lignée des éosinophiles, alors que son absence est nécessaire pour les deux autres (Yamaguchi *et al.*, 1999). Lors d'études *ex vivo*, il a été démontré que l'induction de l'expression de GATA-1 ou de GATA-2 chez les cellules hématopoïétiques par un vecteur rétroviral favorise exclusivement le développement et la maturation d'éosinophiles au détriment des autres lignées myéloïdes, malgré la présence d'autres cytokines lignées-spécifiques pendant la culture (Iwasaki *et al.*, 2006). Par ailleurs, GATA-2 permet de rescaper l'éosinophilopoïèse en absence de GATA-1 (Fujiwara *et al.*, 2004, Hirasawa *et al.*, 2002). D'un autre côté, l'activité de FOG-1 est régulée à la baisse chez la lignée éosinophilique par C/EBP $\alpha$ , car il y agit en tant que corépresseur de GATA-1 (Querfurth *et al.*, 2000, Tsang *et al.*, 1997). La figure 3.1 résume les relations entre les diverses lignées issues des progéniteurs myéloïdes communs ainsi que les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'éosinophilopoïèse.

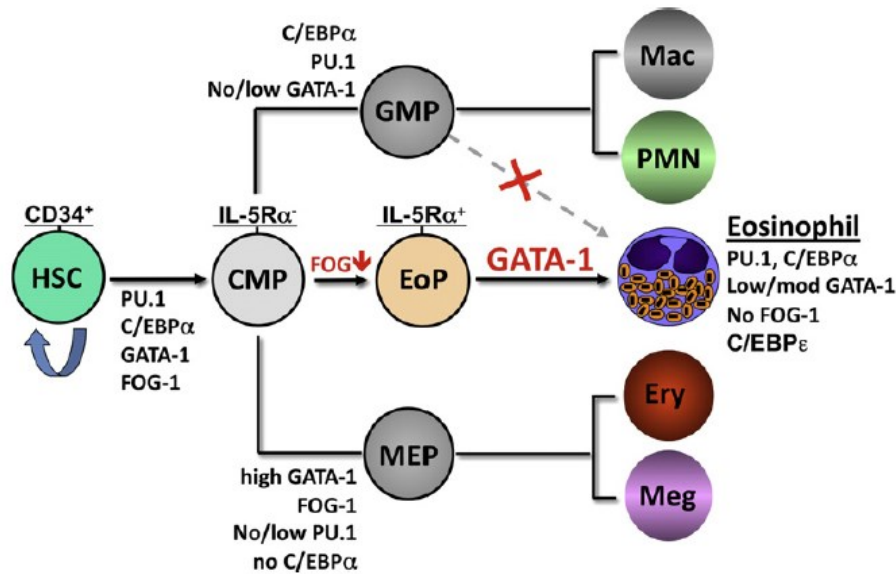


Figure 3.1. Les précurseurs des éosinophiles et facteurs de transcription impliqués dans l'éosinophilopoïèse humaine. Tiré avec autorisation de (Acherman *et al.*, 2013)

Les progéniteurs des éosinophiles n'ont pas encore acquis la morphologie caractéristique des éosinophiles matures, cependant, ils expriment déjà des ARN messagers codant pour des protéines clés des cellules différenciées, telles que l'EPO ou la MBP-1. Les cytokines IL-3, IL-5 et GM-CSF régulent la prolifération des progéniteurs des éosinophiles ainsi que leur différenciation finale dans la moelle osseuse (Lopez *et al.*, 1986, Rothenberg *et al.*, 1988, Takatsu *et al.*, 1994). Celles-ci demeureront fondamentales pour la modulation du recrutement, de l'activation et de la survie des éosinophiles matures. L'IL-5, provenant des lymphocytes T auxiliaires de type 2 et des mastocytes, est la cytokine majeure pour la lignée éosinophilique (Sanderson, 1992, Stone *et al.*, 2010, Takatsu *et al.*, 1988), alors que l'IL-3 et le GM-CSF ont des effets sur d'autres lignées de cellules hématopoïétiques (Lantz *et al.*, 1998, Y. Shi *et al.*, 2006). L'IL-5 est essentielle pour l'expansion et le recrutement d'éosinophiles de la moelle osseuse en réponse à l'exposition à un antigène. Elle contribue aussi à la régulation à la hausse de leur expression du récepteur à l'éotaxine, une chimiokine clé lors de leur recrutement (Kouro *et al.*, 2009). La surexpression de l'IL-5 chez la souris induit l'hyperéosinophilie et son expression est nécessaire et suffisante au développement d'une inflammation éosinophilique pour répondre, par exemple, à une infection parasitaire (L. A. Dent *et al.*, 1999, Lindsay A Dent *et al.*, 1990). De même, son inactivation chez la souris empêche cette même inflammation éosinophilique en réponse aux parasites. Cependant, l'expression de l'IL-5 n'est pas nécessaire au maintien d'un nombre normal d'éosinophiles dans la moelle osseuse en état homéostatique (Maizels *et al.*, 2004).

Les cellules progénitrices commises vers la différenciation en éosinophiles passent par trois intermédiaires morphologiques avant d'acquérir leur forme finale. Ainsi, les myélocytes éosinophiliques deviennent des métamyélocytes éosinophiliques, puis des cellules à bande éosinophiliques et deviennent finalement des éosinophiles à noyau segmenté. Cette dernière morphologie caractéristique correspond à celle des éosinophiles matures, tels qu'observables par microscopie dans le sang et dans les organes humains (Bell, 1957, Uhm *et al.*, 2012).

### **3.1.2 Morphologie caractéristique**

Les éosinophiles sont des cellules faciles à distinguer par simple observation microscopique après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Ils ont une grande quantité de granules basiques secondaires interagissant fortement avec l'éosine, un colorant acide, leur donnant une couleur rose. De plus, elles ont un noyau polylobé formé de chromatine condensée, un système vésiculaire développé, des gouttelettes lipidiques et un faible nombre de granules primaires, contenant des cristaux de la protéine de Charcot-Leyden (Dvorak *et al.*, 2000).

La composition des granules éosinophiliques est caractéristique. Elles ont un noyau central cristallin entouré par une membrane trilaminaire (Muniz *et al.*, 2012). Les granules contiennent et sécrètent un grand nombre de protéines préformées, principalement l'ECP, l'EPO, l'EDN ou la MBP-1 et 2 ainsi divers médiateurs solubles. Alors que la MBP-2 et l'EPO sont seulement exprimées chez les éosinophiles, l'ECP et l'EDN sont faiblement exprimées chez d'autres cellules immunitaires (Acharya *et al.*, 2014). Les granules contiennent des compartiments vésiculo-tubulaires, dont les contenus peuvent se réarranger et se ségréguer afin de permettre une libération contrôlée spécifique de médiateurs en réponse aux stimuli. De plus, ce ne sont pas toutes les granules qui libèrent leur contenu en même temps, contribuant ainsi au relâchement de la bonne protéine en réponse aux signaux fournis par l'environnement (Gervais *et al.*, 2001, R. C. Melo *et al.*, 2009).

Lorsque les éosinophiles sont en repos, leurs granules sont pleines et elles maintiennent une forme ronde. L'activation des cellules par d'agonistes classiques tels que l'éotaxine ou le PAF met en branle la dégranulation fragmentée. Celle-ci est dépendante du système vésiculaire et est caractérisée par une libération graduelle de leur contenu (Dyer *et al.*, 2010, Erjefält *et al.*, 2001). Une étude menée sur des volontaires avec des allergies saisonnières a démontré qu'après exposition au pollen, le pourcentage d'éosinophiles portant des signes de dégranulation passe de 37 % à 87 % (Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004). Les protéines entreposées dans les

granules peuvent aussi se retrouver dans le milieu extracellulaire à la suite de la cytolysse des éosinophiles. Celle-ci est surtout caractérisée par la présence de granules intacts toujours liées à de la membrane d'éosinophiles nécrotiques. Ces granules intacts peuvent agir en tant qu'organelles sécrétoires indépendantes capables de répondre à divers stimuli via des récepteurs membranaires à leur surface (Neves *et al.*, 2008). La libération de protéines granulaires peut aussi être effectuée par exocytose. Celle-ci a lieu lorsque les granules fusionnent avec la membrane cellulaire pour ensuite libérer leur contenu. Elle est plutôt rare dans des contextes inflammatoires, mais elle serait possible lorsque les éosinophiles interagissent avec des cibles plus grandes, telles que des vers parasites (Bandeira-Melo *et al.*, 2005).

Les granules éosinophiliques comptent sur un système vésiculaire fortement développé. Cela permet leur libération efficace lors de divers processus immunitaires. Ce système est fondamental pour le transport des protéines d'origine granulaires vers la membrane cellulaire lors de la dégranulation (Bandeira-Melo *et al.*, 2005). Le système vésiculaire éosinophilique a une morphologie unique, où des petites vésicules rondes classiques (diamètre de 50 nm) sont complétées par de grandes vésicules tubulaires dénommées les vésicules sombrero éosinophiliques (VSE). Ces grandes structures, ayant un diamètre de 150 à 300 nanomètres, ressemblent à des chapeaux mexicains lorsqu'observées sous microscopie électronique, puisqu'elles ont un centre composé de cytoplasme et un rebord composé de membrane vésiculaire (R. C. Melo *et al.*, 2005). Elles sont fréquemment observées près de ou attachées à des granules sécrétoires et par ailleurs le nombre de VSE attachées aux granules augmente considérablement après stimulation avec l'éotaxine. De plus, leur nombre par cellule augmente chez les éosinophiles activés, tels que ceux des patients atteints du syndrome hyperéosinophilique (R. C. Melo *et al.*, 2008). Ces vésicules particulières seraient des sources extragranulaires de MBP-1, permettant une libération rapide de petites quantités de cette protéine en réponse à des stimuli ponctuels sans pour autant mettre en branle tout le processus de dégranulation (R. C. Melo *et al.*, 2009). De plus, leur ratio surface/volume leur permet de transporter les protéines associées aux membranes de façon plus efficace (R. C. Melo *et al.*, 2008, Spencer *et al.*, 2014).

Le cytoplasme des éosinophiles contient des gouttelettes lipidiques de forme ronde et très dense en électrons sous microscopie électronique. Celles-ci ont tendance à s'associer avec le réticulum endoplasmique et aux ribosomes des cellules. Ces structures sont composées d'un noyau lipidique neutre, entouré d'une monocouche de phospholipides ainsi qu'un système membranaire (R. C. N. Melo *et al.*, 2014). Les gouttelettes lipidiques sont formées lorsque la cellule est activée

et sont importantes pour la synthèse de médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes ou les prostaglandines (Wan *et al.*, 2007). Par ailleurs, leur taille augmente après activation avec d'agonistes classiques ou *in vivo* en réponse à des allergènes (Bozza *et al.*, 1997). Diverses enzymes impliqués dans la synthèse des médiateurs lipidiques et d'autres protéines se retrouvent associés à l'assemblage de phospholipides ou au système membranaire des gouttelettes lipidiques (Bozza *et al.*, 2007). Par ailleurs, il est proposé qu'il y existe même un niveau de synthèse protéique compartimentée (Bozza *et al.*, 1996).

### 3.1.3 Marqueurs de surface

Les éosinophiles expriment une panoplie de molécules à leur surface participant aux fonctions effectrices de la cellule. Celles-ci comptent des récepteurs de cytokines/chimiokines, des molécules d'adhésion, des senseurs de l'immunité innée, des récepteurs Fc et des protéines impliquées dans la présentation antigénique. Ces protéines permettent aux éosinophiles de capter les signaux présents dans son environnement et de répondre adéquatement en conséquence. Les récepteurs de cytokines sont nécessaires tout au long de la vie de la cellule. Ils interviennent lors de leur prolifération, leur différenciation, leur maturation, leur transit et leur activation.

D'abord, les éosinophiles expriment évidemment les récepteurs pour l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF, étant donné que celles-ci leur sont essentielles. Ils expriment aussi les récepteurs pour l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), le TNF- $\alpha$ , l'IL-17, l'IL-21, le CD124, CD132 et le CD129 (Cheung *et al.*, 2008, Hogan *et al.*, 2008). L'activation des éosinophiles par l'IL-5 régule à la hausse l'expression des récepteurs de chemokines CCR5, CCR6, CCR8, CXCR3 et CXCR4. Ceux-ci permettent de recevoir des signaux chimiotactiques donnés par des molécules telles que les éotaxines 1, 2 ou 3 (Hogan *et al.*, 2008). Enfin, les éosinophiles possèdent aussi les récepteurs pour le leucotriène B4 (BLT<sub>1</sub> receptor), le cystéinyl-leucotriène (CysLT<sub>1,2</sub>) et pour la prostaglandine D2 (DP<sub>2</sub> receptor). À ce jour, leur rôle chez les éosinophiles n'a pas encore été totalement élucidé. Cependant, il a été démontré chez d'autres cellules que ces médiateurs lipidiques modulent la chimiotaxie. De plus, il a été observé que l'utilisation d'un antagoniste du cystéinyl-leucotriène récepteur 1 réduit l'éosinophilie sanguine et pulmonaire (Becler *et al.*, 2002). Ceci a également été observé chez des souris dont le récepteur pour le leucotriène B4 a été inactivé (Tager *et al.*, 2000).



Les éosinophiles activés nécessitent l'expression de diverses molécules d'adhésion lors de leur périple qui les mène de la moelle osseuse vers le site d'infections ou d'inflammation. Par exemple, pour traverser l'endothélium vasculaire ils accomplissent des étapes de roulement et attachement faible, d'attachement ferme, et d'extravasation. Pour ce faire, ils expriment à leur surface les CD15s, CD62L et CD162, impliqués dans l'attachement faible à l'endothélium vasculaire. Ils expriment aussi les intégrines CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, CD11d/CD18 et CD49d/ITGB7 (sous-unité  $\beta$ 7). Celles-ci permettent l'adhésion des éosinophiles à l'endothélium via des interactions avec les CD50, CD54, CD62P, CD102 et CD106 ou la molécule d'adhésion cellulaire adressine des muqueuses vasculaires-1 (MAdCAM-1). Les éosinophiles portent également le CD31, le CD50 et le CD54 (Hogan *et al.*, 2008).

Étant donnée leur implication dans la réponse de première ligne, il est attendu que les éosinophiles humains expriment une panoplie de senseurs de l'immunité innée. Ceux-ci agissent en majorité en tant que récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, permettant aux cellules d'être activées directement par des PAMPs ou DAMPs (Kvarnhammar *et al.*, 2012). Les récepteurs activés par des protéinases, tels que PAR-2, permettent l'activation des éosinophiles en réponse à des allergènes, dont le pollen ou des acariens (Miike *et al.*, 2001).

Les récepteurs de type Toll (TLR) permettent l'activation des éosinophiles, l'augmentation de l'expression de certaines protéines membranaires, la libération d'espèces réactives de l'oxygène, de cytokines, de chimiokines ou de protéines membranaires de façon spécifique selon le type de ligand rencontré. Il a été démontré que les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7/8 sont exprimés par les éosinophiles (C. K. Wong *et al.*, 2007). Parmi ceux-ci, les TLR 3, 4 et 8 semblent avoir les activités les plus élevées. Pour leur part, l'activité des TLR 2 et 4 semble être inductible. Par exemple, l'activation des éosinophiles médiée par le TLR 2 est nécessaire à la production d'espèces réactives de l'oxygène en plus de la libération d'EPO et d' $\alpha$ -défensine en réponse à l'activation par le lipomannan, une composante de la membrane des mycobactéries. La sécrétion de ces médiateurs solubles a par ailleurs contribué à la diminution de la croissance des mycobactéries (Driss *et al.*, 2009).

Certains DAMPs, tels que le «high mobility group protein B1» HMGB1, les cristaux d'acide urique ou la galectine-3 attirent et activent les éosinophiles (Kobayashi *et al.*, 2010). Ceux-ci sont principalement libérés par des cellules nécrotiques ou par des tissus endommagés (Lotfi *et al.*, 2009). La galectine-3 est reconnue par le récepteur CD66b, exprimée en grande quantité sur la surface des éosinophiles et contribue à la régulation de leur adhésion et de leur activation (Yoon *et al.*, 2007).

Un dernier type de récepteur impliqué dans la reconnaissance de motifs moléculaires des éosinophiles est le complexe TCR $\gamma\delta$ /CD3. Celui-ci est similaire à celui des lymphocytes T $\gamma\delta$ , mais il est exprimé à de plus faibles proportions et il possède un répertoire de recombinaisons plus limité. Son expression est très hétérogène, mais il serait tout de même important à la défense contre les mycobactéries et les tumeurs médiée par les éosinophiles (Gatault *et al.*, 2012, Legrand *et al.*, 2009).

Des récepteurs pour des immunoglobulines sont fréquents à la surface des éosinophiles humains. Ils possèdent les récepteurs pour les IgA (CD89), les IgE (Fc $\epsilon$ RI), les IgG (CD32), ainsi que des récepteurs inductibles par des agents chimiotactiques pour les IgG (CD16 et CD64) (Kaneko *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 1999, Tanaka *et al.*, 1995, Van Dijk *et al.*, 1996). La liaison d'IgA et d'IgG sur leur récepteur induit leur dégranulation et leur production d'ions superoxydes (Muraki *et al.*, 2011). Des récepteurs de haute affinité envers les IgE sont exprimés chez les éosinophiles de patients hyperéosinophiliques. Ceux-ci induisent leur dégranulation et participent à leur cytotoxicité envers le parasite *S. mansoni* (Gounni *et al.*, 1994). De plus, le niveau d'expression des ARNm codant pour ces récepteurs d'IgE de haute affinité est augmenté chez les éosinophiles de lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques, comparativement à celui de volontaires sains (Rajakulasingam *et al.*, 1998).

Il y a dans la littérature des évidences croissantes de l'implication des éosinophiles en tant que cellules présentatrices d'antigènes. De ce fait, ils expriment les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe deux (CMHII) ainsi que les protéines costimulatrices CD80, CD86 et CD40, nécessaires à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T (Padigel *et al.*, 2006, Pozo *et al.*, 1992, H. Z. Shi, 2004). Par ailleurs, l'expression du CMHII peut être régulée à la hausse après stimulation avec l'agoniste classique GM-CSF. Des éosinophiles chargés avec l'antigène ovalbumine ont été en mesure d'induire des marqueurs d'activation (augmentation de CD69), la prolifération et la libération d'IL-4 par les lymphocytes T dans une étude menée chez la souris (H. B. Wang *et al.*, 2007). La capacité des éosinophiles d'agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes pouvant initier et amplifier les réponses inflammatoires en réponse à des antigènes inhalés serait un indice de leur implication en tant que cellules régulatrices des réponses immunitaires de type Th2.

Les récepteurs de la famille CD244 sont surtout fréquents chez les cellules NK et sont principalement impliqués dans la régulation de leur activité cytotoxique (Mathew *et al.*, 2009). Cependant, leur expression et leur activité chez les éosinophiles ont aussi été mises en évidence. L'engagement de ce récepteur chez les éosinophiles par des ligands tels que le CD48 induisent

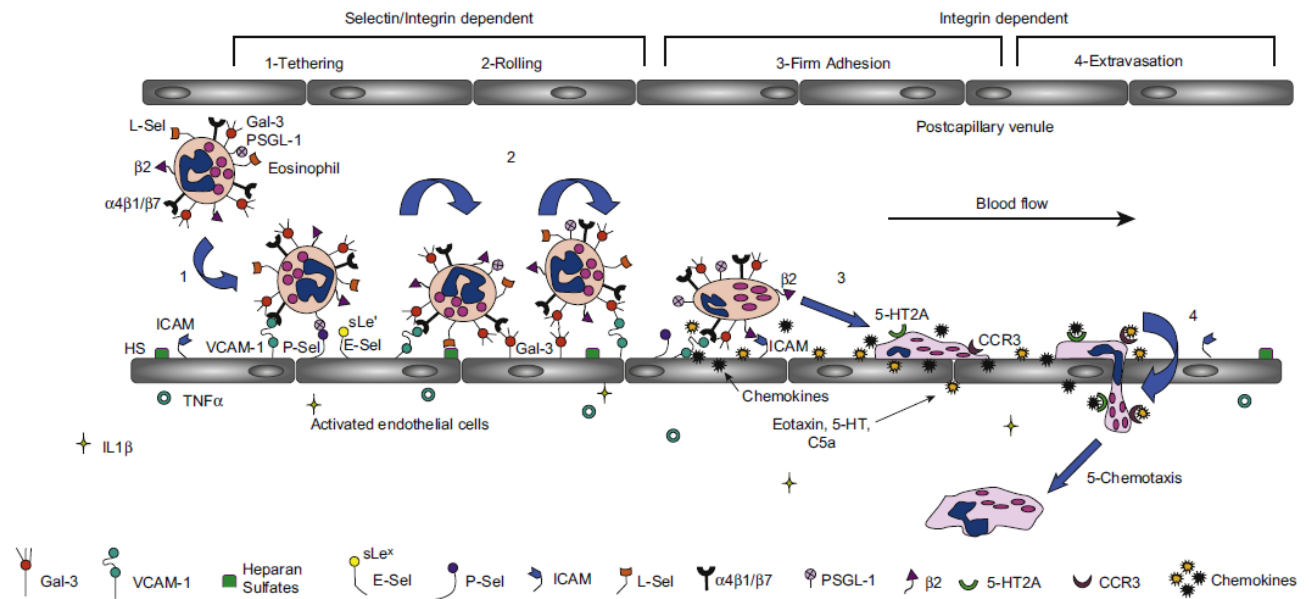
la libération d'IL-4, IFN- $\gamma$  et la dégranulation d'EPO. Étant donné que l'expression du CD48 est élevée chez les éosinophiles de patients asthmatiques et qu'elle peut être régulée à la hausse par l'IL-3, ces cellules pourraient s'activer entre elles pour induire la sécrétion de médiateurs solubles (Munitz *et al.*, 2006a). Les éosinophiles dont le CD244 est engagé sont aussi en mesure d'effectuer de la lyse tumorale. En effet, ils ont des effets cytotoxiques sur des cellules d'une lignée de lymphome aux cellules B positive pour le virus Epstein-Barr, dont l'expression du CD48 est élevée (Munitz *et al.*, 2005).

Les récepteurs présents à la surface des éosinophiles ne participent pas qu'à leur activation par des médiateurs solubles. Il existe aussi des récepteurs pouvant inhiber leurs fonctions cellulaires. Deux classes de récepteurs inhibiteurs ont été définies chez les éosinophiles. D'un côté, certains inhibent leur différenciation, leur prolifération et leur survie. Le récepteur Siglec-8 fait partie de cette première classe. Son activation induit l'apoptose des éosinophiles en favorisant la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que l'induction des caspases. Cette induction de l'apoptose est assez forte, car elle a lieu même en présence d'activateurs de la survie des éosinophiles tels que le GM-CSF et l'IL-5 (Nutku *et al.*, 2003). Un autre récepteur de la même classe est le CD300a. Celui-ci diminue la survie des éosinophiles en inhibant les signaux du GM-CSF et de l'IL-5 (Munitz *et al.*, 2006b). D'un autre côté, certains récepteurs inhibent leur migration. Le récepteur couplé aux protéines G (RCPG) CCR3 appartient à cette deuxième classe de récepteurs. Celui-ci agit en tant que récepteur de l'éotaxine et est normalement associé à l'induction de la chimiotaxie des éosinophiles. Cependant, lorsqu'il est engagé par la chimiokine CXCL9, il induit des cascades inhibitrices et entrave plutôt la chimiotaxie (Fulkerson *et al.*, 2004)

#### **3.1.4 Trafic cellulaire**

Tel qu'il a été décrit précédemment, l'éosinophilopoïèse a lieu au niveau de la moelle osseuse. Les éosinophiles matures sont par la suite recrutés dans des organes divers, tels que l'intestin, la rate et les organes lymphoïdes. Ils peuvent aussi être recrutés dans d'autres organes, tels que les poumons et l'œsophage, en présence de conditions inflammatoires (Ohnmacht *et al.*, 2007). Cela met en évidence l'importance de la régulation de leur fonction chimiotactique. Cette régulation est dépendante de la combinaison des chimiokines présentes dans l'environnement, des molécules d'adhésion responsables de l'adhésion des éosinophiles sur l'endothélium vasculaire et des récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion présents à la surface des éosinophiles.

L'adhésion des éosinophiles sur l'endothélium vasculaire débute par l'étape de roulement et attachement faible. Celle-ci est médiée par l'interaction de leur PSGL-1 avec la P-sélectine des cellules endothéliales ou de leur intégrine  $\alpha4\beta1$  avec la VCAM-1 sous l'activation de chimiokines telles que l'éotaxine (Johansson *et al.*, 2011, Symon *et al.*, 1996). Par la suite, des cytokines telles que l'IL-5 augmentent l'affinité des intégrines de la famille  $\beta2$ , leur permettant de se lier à l'ICAM-1 des cellules endothéliales et d'établir un attachement fort sur l'endothélium vasculaire (Seminario *et al.*, 1997). Lorsque l'attachement fort est établi, les intégrines  $\alpha4\beta1$  se détachent de la VCAM-1, permettant la continuation de la transmigration éosinophilique. Effectivement, l'inhibition du détachement des intégrines de la famille  $\beta1$  empêche l'extravasation des éosinophiles (Myo *et al.*, 2004). L'adhésion de forte affinité sur les cellules endothéliales y déclenche des cascades signalétiques ayant pour effet de générer des espaces intercellulaires étroits, par lesquelles les éosinophiles peuvent traverser vers l'espace extravasculaire. L'extravasation transcellulaire (à travers une cellule endothéliale) est aussi possible lorsque les concentrations de médiateurs solubles sont très élevées (Kita, 2011). Les nombreuses interactions cellule-cellule ayant lieu pendant l'attachement des éosinophiles sur l'endothélium vasculaire induisent l'activation de ces granulocytes. Ainsi, ils effectuent une flambée oxydative et ils produisent davantage de leucotriène  $C_4$ , d'EPO et d'EDN (Munoz *et al.*, 1999). Les étapes de l'extravasation des éosinophiles et les protéines impliquées sont illustrées en plus grand détail dans la figure 3.2



**Figure 3.2. Les étapes de l'extravasation des éosinophiles vers le site inflammatoire et les protéines impliquées. Tiré avec autorisation de (Rao et Sriramarao 2013).**

Lors des processus inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales peut être modulée en réponse à divers stimuli provenant du tissu enflammé. Ceux-ci comprennent des cytokines (IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ ), des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène élevés, un flux sanguin perturbé ou l'induction de TLRs. De plus, les cellules du tissu enflammé et de l'épithélium vasculaire libèrent des chimiokines (RANTES, éotaxine, MCP-1,4) augmentant l'affinité des molécules d'adhésion des éosinophiles et dirigeant leur migration (Inomata *et al.*, 2009, Patel, 1998). Ces chimioattractants signalent généralement via des RCPG de la famille G $\alpha_i$ . Lorsqu'elles sont activées, les protéines de la famille G $\alpha_i$  activent des kinases de la famille Src telles que les tyrosine-protéine kinases kinase des cellules hématopoïétiques (HCK) et proto-oncogène félin Gardner-Rasheed (FGR). Celles-ci participeraient au remaniement rapide du cytosquelette nécessaire à la chimiotaxie. De leur côté, les sous-unités G $\beta\gamma$  activent la phospholipase C bêta et favorisent la production d'inositol triphosphate (IP3) ainsi que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Celle-ci favorise à son tour la polymérisation de l'actine nécessaire à la chimiotaxie (Kampen *et al.*, 2000). La phosphorylation et l'activation des kinases de la famille MAPK en réponse aux ligands du CCR3 a aussi été documentée. La chimiotaxie induite par l'éotaxine est par ailleurs dépendante de leur activation (El-Shazly *et al.*, 1999).

### 3.1.5 Fonctions sécrétoires

La capacité des éosinophiles de libérer des médiateurs solubles dans leur environnement en réponse à des stimuli spécifiques est bien documentée (Davoine *et al.*, 2014). Les médiateurs solubles en question sont soit synthétisés *de novo*, soit entreposés dans des vésicules ou des granules à partir desquels ils seront libérés (Levi-Schaffer *et al.*, 1995). D'abord, la synthèse constitutive ou inductible d'ARNm codant pour des cytokines telles que le GM-CSF, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 ou le TGF- $\beta$  a été mise en évidence (Elovic *et al.*, 1994, Esnault *et al.*, 2012, Esnault *et al.*, 2002, Yousefi *et al.*, 1995). La stabilisation de ces ARNm par diverses protéines a également été étudiée. Par exemple, la protéine Pin1 favorise la stabilité de l'ARNm codant pour le TGF- $\beta$  et régule sa production par des éosinophiles humains *in vivo* et *in vitro*. L'activité de la protéine Pin1 est à son tour régulée par la protéine kinase C alpha et par la protéine phosphatase 2A (Shen *et al.*, 2008). Il n'a pas encore été élucidé si la synthèse *de novo* d'ARNm a pour but de les maintenir à un niveau intracellulaire stable, de contribuer à la production de nouvelles cytokines à libérer ou de produire des cytokines pour refaire les stocks ayant été entamés à la suite d'une dégranulation fragmentée, donc des études complémentaires seront nécessaires.

La majorité de la synthèse des médiateurs solubles éosinophiliques a lieu pendant leur différenciation dans la moelle osseuse. Les protéines produites sont par la suite emmagasinées dans des granules ou des vésicules sécrétoires. Ainsi, étant donné que les cellules matures ont déjà effectué les étapes de transcription et de traduction protéique, elles peuvent libérer leur contenu à l'intérieur de quelques minutes en réponse à des stimuli spécifiques. Ceux-ci comprennent des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  ou la chimiokine éotaxine. Il a été démontré que des concentrations d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10, d'IL-12, d'IL-13, d'IFN- $\gamma$  ou de TNF- $\alpha$  plutôt stables à travers les donneurs étaient présentes dans les granules des éosinophiles. De plus, les vésicules sécrétoires contiennent aussi de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4, en plus de la MBP1, du RANTES, du TGF- $\beta$  (Spencer *et al.*, 2009).

Il y a trois mécanismes par lesquels les éosinophiles procèdent à la dégranulation. Ils comprennent la dégranulation fragmentée, l'exocytose classique et la cytolysse. La dégranulation fragmentée est le type de dégranulation le plus fréquemment observé chez les éosinophiles sur les coupes histologiques. Celle-ci est caractérisée par la libération directe de petites quantités de protéines d'origine granulaire vers l'extérieur de la cellule. Ce type de dégranulation se fait via les vésicules sécrétoires typiques de type EoSV (R. C. Melo *et al.*, 2008). De plus, sous microscopie électronique, plusieurs interactions vésicules-granules sont visibles. Les éosinophiles demeurent viables au cours de la dégranulation fragmentée. Ainsi, ils peuvent répondre rapidement et de façon adéquate selon les stimuli présents dans leur environnement (Crivellato *et al.*, 2003).

L'exocytose classique est caractérisée par la fusion des granules entières sur la membrane cellulaire, ainsi la totalité du contenu granulaire est libérée dans le milieu extracellulaire en même temps (McLaren *et al.*, 1977). Les exemples d'exocytose classique observés *in vivo* sous des conditions physiologiques sont limités. Or, il a été possible d'observer des évidences de fusion granule-granule et granule-membrane cellulaire lors des interventions directes des éosinophiles pour tuer certains vers parasitaires. Les fusions entre granules et le déversement de leur contenu entier permettraient de concentrer localement les protéines dans le but d'accentuer leurs effets cytotoxiques envers les parasites (Hafez *et al.*, 2003).

La cytolysse est un dernier type de dégranulation, au cours de laquelle tout le contenu cellulaire est déversé et déposé sur les tissus environnants. Celle-ci entraîne inévitablement la mort de l'éosinophile. Étant donné que les granules se retrouvent intactes dans le milieu extracellulaire, celles-ci conservent leur membrane granulaire. Elles retiennent ainsi une capacité de fonctionner extracellulairement. En effet, elles peuvent procéder à la sécrétion de protéines cationiques et de cytokines en réponse à des stimuli spécifiques (Neves *et al.*, 2008, Persson *et al.*, 2013).

Les éosinophiles traversant l'épithélium vasculaire lors d'une réponse allergique sont activés. Le niveau en cytokines nécessaire à induire leur dégranulation s'en retrouve diminué. Ainsi, ils ont des capacités sécrétoires augmentées, comparativement aux éosinophiles sanguins (Dallaire *et al.*, 2003). De plus, il y a des concentrations élevées d'IL-5, de GM-CSF et de TNF- $\alpha$  dans les voies respiratoires lors des réactions allergiques (Ferreira, 2003). Par conséquent, un effet synergique entre les signaux activant les éosinophiles et les signaux induisant leur dégranulation est possible. Alors, les éosinophiles ayant atteint les voies respiratoires lors des réactions allergiques pourraient exhiber une dégranulation augmentée. Par exemple, la libération d'IL-4 induite par l'éotaxine et stimulée par l'IL-5 est détectée à partir de 5 minutes post-stimulation (Bandeira-Melo *et al.*, 2005, R. C. Melo *et al.*, 2005).

### **3.1.6 Production d'espèces réactives de l'oxygène**

Alors que la plupart de molécules possèdent des paires d'électrons dont les spins sont opposés sur leurs couches électroniques, les radicaux libres sont des espèces viables ayant au moins un électron non apparié. Celles-ci sont très réactives, car leurs électrons non appariés tentent d'interagir avec d'autres molécules afin de stabiliser l'espèce radicale en s'appariant. L'oxygène moléculaire, ses métabolites (peroxyde d'hydrogène) et les radicaux libres dérivés (anion superoxyde, radical hydroxyle) sont fréquents dans les systèmes biologiques. Ceux-ci sont importants dans des fonctions biologiques comprenant la défense contre les pathogènes (Apel *et al.*, 2004). En effet, l'activité bactéricide des neutrophiles envers les pathogènes phagocytés repose en partie sur leur système d'oxydase NADPH-dépendante membranaire produisant des radicaux superoxydes de façon efficace (Closa *et al.*, 2004).

Les cellules comptent sur des sources variées de ROS. Par exemple, de 1 à 5 % des molécules d'oxygène participant à la phosphorylation oxydative deviennent des intermédiaires toxiques au lieu d'être réduites en eau (Turrens *et al.*, 1991). De plus, une forme de l'oxydase xanthine oxydoréductase utilise l'oxygène plutôt que le NAD<sup>+</sup> en tant qu'accepteur d'électrons lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ou de l'oxydation de la xanthine en acide urique, générant ainsi des radicaux superoxydes (C. E. Berry *et al.*, 2004). Lorsque des espèces telles que le radical hydroxyle interagissent avec des composantes cellulaires, ils induisent la formation de radicaux secondaires puis tertiaires, déclenchant ainsi une cascade oxydative. Celle-ci induit des dommages cellulaires tels que des brisures d'ADN, la peroxydation de lipides membranaires ou la perturbation de la fonction de protéines (Aldridge, 2002, Closa *et al.*, 2004, Hybertson *et al.*, 2011).

La cellule compte sur certains mécanismes pour piéger les ROS et se protéger des dommages qu'elles génèrent. Ces mécanismes incluent les enzymes à activité antioxydante telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathionne peroxydase. D'autres antioxydants tels que l'acide ascorbique, l' $\alpha$ -tocophérol et le glutathionne contribuent également à la protection envers les dommages oxydatifs (Irshad *et al.*, 2002). Enfin, les éléments métalliques ayant un potentiel redox actif sont maintenus liés à des protéines (ex. le fer sur la transferrine) (Aust *et al.*, 1985). Toutefois, lorsque les ROS sont trop abondantes, elles dépassent la capacité des systèmes de protection de la cellule et induisent un état de stress oxydatif cellulaire. La cellule tente alors de réparer les dommages ayant été induits sur ses protéines ou ses structures. Or, si ceux-ci s'avèrent trop importants, la cellule entre en apoptose (Finkel, 2003).

La flambée oxydative, caractérisée par la production de ROS telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'anion hydroxyle, est une fonction importante lors des processus immunitaires. Il permet de tuer les pathogènes ayant été captés par les phagocytes professionnels tels que les neutrophiles ou les macrophages. Il est largement dépendant de l'activation de l'oxydase NADPH-dépendante chez la majorité des cellules immunitaires. Chez les éosinophiles, la sous-unité cytochrome  $b_{558}$  (composé des  $p22^{phox}$  et  $gp91^{phox}$ ) activée de l'enzyme gagne la membrane cellulaire et s'associe avec Rac ainsi qu'avec  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$  phosphorylées (DeLeo *et al.*, 1996, Lacy *et al.*, 2003). La localisation membranaire de l'oxydase NADPH-dépendante chez les éosinophiles leur permet de produire des anions superoxydes extracellulaires de façon très efficace. Elle en produirait jusqu'à dix fois plus que chez les neutrophiles; des cellules au sein desquelles l'enzyme demeure granulaire ou cytosolique et dont l'anion superoxyde produit demeure majoritairement intracellulaire (Kobayashi *et al.*, 1998). Il est à noter que la quantité de ROS totales générées par l'enzyme demeure semblable chez ces deux granulocytes (DeChatelet *et al.*, 1978). La production préférentielle de ROS extracellulaires par les éosinophiles serait compatible avec leur rôle de défense contre les vers parasites dont la taille est plus grande. De plus, même s'ils peuvent phagocyter des bactéries, leur capacité cytotoxique est déficiente. Au contraire, les neutrophiles phagocytent et tuent les microorganismes pathogènes très efficacement, en accord avec leur production préférentielle de ROS intracellulaires (Someya *et al.*, 1997).

Des études *in vitro* ont démontré que la libération de ROS par les éosinophiles pourrait être induite par des chimiokines telles que l'éotaxine et qu'elle serait potentialisée par des cytokines telles que l'IL-5, deux médiateurs solubles dont la présence est augmentée dans les voies respiratoires de patients avec des allergies respiratoires ou asthmatiques (Sannohe *et al.*, 2003). Des études



menées sur ces types de patients ont démontré que leurs éosinophiles libèrent des quantités de ROS extracellulaires supérieures à celles libérées par les cellules des volontaires sains (Lavinskiene *et al.*, 2015). D'autres études auraient aussi démontré que les ROS agiraient en tant que messagers cellulaires. En effet, ils seraient en mesure de moduler l'activation de facteurs de transcription tels que le NFκB ou l'activateur de l'apoptotéine 1. Ainsi, ils réguleraient l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, ou le TNF-α et des molécules d'adhésion impliquées dans la réponse inflammatoire, telles que le CD11b et le CD18 (Law *et al.*, 2013). Considérant que les patients allergiques ou asthmatiques ont souvent un nombre d'éosinophiles pulmonaires élevés, que leurs éosinophiles produisent davantage de ROS et que les ceux-ci sont en mesure de réguler à la hausse l'expression de médiateurs solubles pro-inflammatoires, les éosinophiles seraient des puissants agents pro-inflammatoires. Alors, les agents thérapeutiques ciblant ces cellules représentent alors des stratégies logiques pour le traitement de ces maladies d'origine inflammatoire (Barnes, 1990, Teresa Ramírez-Prieto *et al.*, 2006)

### **3.1.7 L'équilibre entre la survie et la mort des éosinophiles**

Le renouvellement des éosinophiles chez les individus sains est rapide; environ 33 % sont remplacés quotidiennement. Après leur sortie de la moelle osseuse, ils migrent vers la rate ou le foie où ils vivent pour quelques jours sous l'effet de cytokines favorisant leur survie, telles que l'IL-5 ou le GM-CSF (Fulkerson *et al.*, 2013). Lors de l'inflammation des voies respiratoires, ayant lieu chez les patients allergiques aux particules volatiles ou chez les asthmatiques, les éosinophiles sont recrutés et activés en grand nombre. Cette activation augmente leur survie jusqu'à quelques semaines et leur permet de déverser des médiateurs solubles, des protéines granulaires et des ROS, ayant tous des effets potentiellement délétères sur les fonctions respiratoires des patients (Shen *et al.*, 2015). Étant donné que la survie des éosinophiles du sputum de ces types de patients est augmentée et que les effets pro-inflammatoires néfastes sont bien documentés, des stratégies thérapeutiques cherchant à diminuer leurs signaux pro-survie et d'augmenter leur apoptose ont été développées et utilisées avec succès (Akdis, 2012, Park *et al.*, 2010). Ceci met en évidence l'importance de la régulation stricte de l'apoptose des éosinophiles pour le maintien de l'homéostasie. Les signaux pro-survie doivent être favorisés sous conditions inflammatoires, afin de prendre en charge les agents pathogènes, dont les vers parasitaires. Ensuite, les signaux proapoptotiques doivent être régulés à la hausse, pour ainsi favoriser la résolution de l'inflammation et le retour à l'état homéostatique (Simon, 2009).

La survie des éosinophiles est favorisée par les cytokines classiques IL-3, IL-5 et GM-CSF. Celles-ci sont produites par les cellules épithéliales et par les cellules immunitaires au site de l'inflammation. Elles peuvent aussi être produites de façon autocrine par les éosinophiles. D'autres cytokines dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-33 et l'IFN- $\gamma$ , des ligands des TLR 7, 8 et 9 dont l'ARN et l'ADN bactériens ou viraux et des hormones telles que la leptine régulent aussi à la hausse la survie des éosinophiles (Shen *et al.*, 2015). La liaison de ces agonistes sur leurs récepteurs active les voies de signalisation des MAPK, de JAK-STAT et de la PI3K. Ces kinases induisent par la suite l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Temkin *et al.*, 2001), l'augmentation de l'expression protéique de membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (principalement Bcl-xL), la diminution de l'expression protéique de membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 (principalement Bax) et une diminution du clivage de la protéine Bid (Simon, 2009).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée à faible potentiel inflammatoire. Elle est notamment impliquée dans le développement des organismes et dans la défense contre les pathogènes, pour favoriser l'élimination des cellules endommagées ou infectées sans induire de dommages collatéraux au niveau des tissus environnants. Elle est caractérisée en microscopie par la diminution du volume cellulaire, la condensation nucléaire et la création de corps apoptotiques. Ceux-ci sont des petits assemblages d'organelles et de fragments de chromatine entourés par des membranes intactes. Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par des macrophages et digérés dans leurs phagolysosomes (Elmore, 2007). Ainsi, l'apoptose empêche le déversement du contenu cellulaire vers le milieu extracellulaire. Ceci est particulièrement important pour des cellules immunitaires telles que les neutrophiles ou les éosinophiles, considérant qu'ils possèdent un large éventail de protéines au potentiel cytotoxique et pro-inflammatoire au sein de leurs granules et de leurs vésicules sécrétoires (Simon, 2009).

Deux voies canoniques d'induction de l'apoptose ont été définies, soit la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Or, des protéines impliquées dans la voie extrinsèque peuvent aussi activer la voie intrinsèque. La voie extrinsèque de l'apoptose dépend de récepteurs de mort à la surface des cellules, des membres de la superfamille du TNF- $\alpha$  (Elmore, 2007). Fas est un des récepteurs de mort exprimés à la surface des éosinophiles. Ces derniers expriment en plus le ligand de Fas. La liaison du ligand de Fas induit la dimérisation de son récepteur, entraînant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de la procaspase-8 (Shen *et al.*, 2015). Ceci engendre la formation du complexe DISC (*death-inducing signaling complex*), permettant l'autoactivation par clivage de la procaspase-8. L'activation de la caspase-8 lui permet de cliver et d'activer les caspases exécutrices (caspase-3, 6 et 7) (Fulda *et al.*, 2006). Les caspases sont des protéases

cystéine-dépendantes dirigées vers les résidus aspartates des protéines. Lorsque l'étape d'activation des caspases est franchie, l'entrée en apoptose enclenchée serait irréversible. De plus, toute caspase activée peut en cliver d'autres pour les activer, menant à une cascade amplifiant le signal apoptotique (Boatright *et al.*, 2003). L'activité protéolytique des caspases leur permet d'activer des endonucléases (dégradant la chromatine) et de dégrader des protéines nucléaires et des protéines du cytosquelette (occasionnant une réorganisation du cytosquelette). Ainsi, elles sont à la source des changements morphologiques caractéristiques des cellules apoptotiques, tels que la contraction cytoplasmique ainsi que la condensation et la fragmentation nucléaires (Crawford *et al.*, 2011). Il est à noter que les mécanismes pro-survie engendrés par l'IL-5 chez les éosinophiles sont suffisamment puissants pour éviter l'induction de l'apoptose via le récepteur de mort FAS (Shen *et al.*, 2015).

La voie intrinsèque de l'apoptose n'est pas directement dépendante de la liaison d'un ligand à un récepteur sur la surface des cellules. Elle est plutôt occasionnée lorsque l'équilibre des protéines de la famille Bcl-2 intracellulaires passe de favorable à la survie à favorable à l'apoptose (Elmore, 2007). Comme mentionné ci-dessus, chez les éosinophiles, l'IL-5 et le GM-CSF favorisent l'expression du Bcl-xL, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 tout en diminuant l'expression de Bax, un membre proapoptotique de la même famille (Dibbert *et al.*, 1998). Lorsque l'équilibre est favorable à la survie cellulaire, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 lient et empêchent l'activation des membres proapoptotiques de la famille. Cependant, en présence de dommages excessifs à l'ADN, de stress du réticulum endoplasmique, de stress oxydatif ou en absence de facteurs de croissance, l'équilibre devient favorable aux membres proapoptotiques de la famille Bcl-2, permettant leur activation (Fulda *et al.*, 2006). Celle-ci permet aux protéines BAX et BAK de transloquer vers la membrane mitochondriale, de s'y homo-oligomériser, puis d'y induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. La perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale permet la translocation de protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme, particulièrement le Cytochrome c, indispensable à l'assemblage de l'apoptosome (Tait *et al.*, 2010). Celui-ci est formé d'oligomères de protéine APAF1, de Cytochrome c et de pro-caspase-9. Cette caspase, initiatrice, est activée à la suite de l'assemblage de l'apoptosome. Elle procède alors au clivage et à l'activation de caspases exécutrices, telles que les caspases-3 et 7, entraînant la cascade protéolytique irréversible caractéristique à l'apoptose et menant à la mort cellulaire (Simon, 2001). Une autre protéine libérée vers le cytoplasme à la suite de la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe est la protéine SMAC. Celle-ci régule à la baisse l'activité de l'inhibiteur

des caspases XIAP, favorisant, de surcroît, l'établissement de leur cascade protéolytique et ultimement l'apoptose (Dewson *et al.*, 2001).

Il a été mentionné précédemment que la voie intrinsèque de l'apoptose peut être activée par des protéines effectrices de la voie extrinsèque. Le lien entre ces deux voies se fait au niveau de la caspase-8 et de la protéine BID. En effet, cette dernière est une cible de la caspase initiatrice de la voie extrinsèque. Le produit de clivage de BID, tBID, agit en tant qu'activateur des protéines BAX et BAK. Ainsi, la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie peut être induite à la suite de l'induction du récepteur de mort FAS par son ligand (Fulda *et al.*, 2006).

L'utilisation des glucocorticoïdes lors du traitement des patients asthmatiques ou des patients allergiques aux prises avec de l'inflammation au niveau des voies respiratoires est courante (Spahn *et al.*, 2007). Même s'il est connu que ces agents induisent directement l'apoptose des éosinophiles, leur mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé. Néanmoins, ils demeurent une thérapie efficace, car les patients asthmatiques ayant reçu ce traitement ont une diminution des symptômes accompagnée par une augmentation, dans leurs sécrétions, de la proportion d'éosinophiles apoptotiques (Druilhe *et al.*, 2003). Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose médiée par les glucocorticoïdes sera importante afin de comprendre pourquoi ce traitement échoue chez quelques patients. Il sera alors possible de développer des stratégies de traitement complémentaires rendant le traitement efficace pour un plus grand nombre de personnes (M. Berry *et al.*, 2007).

### **3.2 Implications dans les pathologies humaines et la santé**

Les éosinophiles contiennent une grande quantité de granules, au sein desquelles ils stockent diverses protéines granulaires et d'autres médiateurs solubles pouvant être libérés promptement en réponse à des stimuli divers. Cet arsenal de molécules effectrices est mis au profit en réponse à certaines pathologies, telles que lors de la défense envers les helminthes ou lors des maladies inflammatoires de l'intestin. Cependant, celles-ci seraient aussi importantes lors de processus indépendants des maladies, tels que le remodelage des tissus du col de l'utérus lors de l'accouchement. Dans la prochaine section, l'implication des éosinophiles dans la défense contre les parasites, l'asthme éosinophilique et de nouvelles maladies à éosinophiles sera décrite. Ensuite, des exemples d'implications dans la santé seront énumérés. Enfin, l'hypothèse *LIAR* sera présentée.

### 3.2.1 Défense contre les vers parasites

La réponse immunitaire contre les vers parasites est la fonction biologique classiquement attribuée aux éosinophiles *in vivo*. Celle-ci serait particulièrement importante, considérant qu'un tiers de la population mondiale serait infectée par des helminthes, principalement des individus à faible revenu ou des individus dont le système immunitaire est compromis (Hotez *et al.*, 2008). Les réponses immunitaires impliquées dans la protection contre les vers parasites sont de type  $T_H2$ , caractérisées par des niveaux élevés d'IgE, d'IL-4, IL-5 et d'IL-13 ainsi que par le recrutement d'éosinophiles, de cellules T régulatrices, de mastocytes et de basophiles (McSorley *et al.*, 2012). En effet, les éosinophiles sont directement recrutés en grands nombres dans les heures suivant l'infiltration de parasites dans les tissus (Jacobsen *et al.*, 2012). Même si les mécanismes moléculaires fonctionnels impliqués dans la réponse éosinophilique contre les vers parasites ne sont pas encore entièrement élucidés, il y a tout de même des évidences démontrant leur capacité de tuer des parasites tels que le *S. stercoralis*, *T. spiralis* et *N. brasiliensis* dans des modèles murins ou le *T. trichuris* dans un modèle humain. Les effets cytotoxiques des éosinophiles sur les parasites seraient médiés par la libération de ROS et de protéines granulaires, dont la MBP (McCormick *et al.*, 1996, O'Connell *et al.*, 2011). De plus, même si ces granulocytes ne semblent pas être directement impliqués dans le processus d'expulsion des parasites, ils y contribueraient tout de même via leurs produits sécrétoires. En effet, l'IL-4 et l'IL-13 libérés, entre autres, par les éosinophiles participent à l'hyperplasie des cellules de gobelet et à l'augmentation du renouvellement des cellules de l'épithélium intestinal, facilitant ainsi l'expulsion des parasites (Shinkai *et al.*, 2002)

Certaines études ont démontré que les souris IL-5 transgéniques, exhibant une éosinophilie dans les organes périphériques, diminuent la charge parasitaire plus rapidement que les souris sauvages. Dans le même sens, les souris IL-5<sup>-/-</sup>, exhibant une éosinopénie dans les organes périphériques, éliminent le parasite plus lentement que les souris sauvages (Herbert *et al.*, 2000). D'un autre côté, d'autres études utilisant d'autres modèles de souris dépourvues d'éosinophiles ( $\Delta$ dbpGATA-1 et *PHIL*) démontreraient plutôt que l'absence des éosinophiles n'a pas d'incidence sur le fardeau parasitaire (Jacobsen *et al.*, 2012, Swartz *et al.*, 2006). Cela en évidence la présence de mécanismes redondants de contrôle des parasites avec des cellules telles que les neutrophiles ou les macrophages participant à leur prise en charge. De plus, il a été démontré que dans certains cas les éosinophiles ne tuent pas les parasites. Ils favorisent plutôt leur survie tout en diminuant les conséquences pathologiques envers l'hôte afin de préserver l'homéostasie (Fabre *et al.*, 2009). En effet, les éosinophiles recrutés au site d'infection parasitaire procèdent à

la libération de cytokines de type  $T_H2$ , dont l'IL-4 et l'IL-13, favorisant l'activation alternative des macrophages y étant recrutés (Shin *et al.*, 2009). Les macrophages de type M2 sont associés à la prise en charge de parasites et à la régulation de la réponse inflammatoire (Martinez *et al.*, 2014). Lorsque les helminthes *T. spiralis* infectent un tissu, ils transforment une cellule musculaire en cellule nourrisse pour le parasite en développement. Cependant, en absence d'éosinophiles et des cytokines de type  $T_H2$  qu'ils libèrent, moins de cellules nourries sont transformées et moins de lymphocytes  $T_H2$  ainsi que davantage de macrophages de type M1 inflammatoires sont recrutés. Alors, la réponse immunitaire résultante est excessive et cause la destruction par nécrose de tissus sains adjacents simultanément à la mort du parasite. Par contre, lorsque des éosinophiles sont réintroduits dans la souris par transfert adoptif, la transformation de cellules musculaires en cellules nourries pour les parasites redevient normale (Fabre *et al.*, 2009). Ainsi, si les éosinophiles promeuvent la survie de certains parasites, c'est pour préserver l'homéostasie générale de l'hôte en prévenant l'exacerbation de l'inflammation (Gebreselassie *et al.*, 2012)

### 3.2.2 Asthme hyperéosinophilique

L'asthme et en particulier l'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique souvent caractérisée par une infiltration éosinophilique des voies respiratoires. Certains des signes cliniques y étant associés sont la présence de dommages et la destruction de l'épithélium pulmonaire, l'hypersécrétion de mucus, ainsi que l'hypersensibilité et le remodelage des voies respiratoires (développement de fibrose et déposition de collagène) (Brightling, 2011, Kato *et al.*, 2006). Lors de l'asthme éosinophilique, l'épithélium vasculaire réagit à la présence d'un antigène, menant à la libération de cytokines de type  $T_H2$  par des lymphocytes T. Les médiateurs solubles libérés comprennent l'IL-5, l'éotaxine et le GM-CSF (Possa *et al.*, 2013). Ceux-ci favorisent le recrutement éosinophilique au niveau des voies respiratoires en régulant, entre autres, l'expression des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à leur surface (Jacobsen *et al.*, 2011).

L'extravasation vers le site d'inflammation et les cytokines y étant présentes activent les éosinophiles, retardant leur apoptose spontanée et induisant leur dégranulation. Il s'en suit alors une libération de protéines granulaires et de médiateurs solubles, ayant pour effet d'y promouvoir la réaction allergique inflammatoire, de contribuer au remodelage des voies respiratoires et potentiellement d'induire des dommages tissulaires (Possa *et al.*, 2013). Ainsi, les éosinophiles induisent la libération de cytokines de type  $T_H2$  par les lymphocytes T, au détriment de la libération de cytokines de type  $T_H1$  ou  $T_H17$ , via la présentation antigénique dépendante de leur CMH-II

(Jacobsen *et al.*, 2008, Jacobsen *et al.*, 2011, H. Z. Shi *et al.*, 2000). De plus, la protéine granulaire MBP, libérée par les éosinophiles, contribuerait à l'hypersensibilité des voies respiratoires en inhibant le fonctionnement du récepteur neuronal muscarinique M2 dans les nerfs parasympathiques des poumons (Costello *et al.*, 1998). En effet, le traitement avec un anticorps dirigé contre la MBP était suffisant pour prévenir l'hypersensibilité pulmonaire chez les cochons d'Inde (Lefort *et al.*, 1996). Enfin, des observations cliniques établissent un lien entre la quantité d'éosinophiles au niveau des voies respiratoires et dans le sputum des patients avec l'intensité de leur hypersensibilité des voies respiratoires (Hara *et al.*, 2008, Yoo *et al.*, 2004)

L'inhalation de corticostéroïdes et l'utilisation anticorps ciblant l'IL-5 sont deux stratégies couramment utilisées en clinique pour traiter les patients aux prises avec de l'asthme allergique éosinophilique sévère (Haldar *et al.*, 2009, Nair *et al.*, 2009). Celles-ci ont pour objectif de favoriser l'apoptose des éosinophiles afin d'en diminuer le nombre au sein des voies respiratoires. Ces stratégies permettraient ainsi de diminuer les dommages tissulaires directement induits par les médiateurs solubles libérés par les éosinophiles et de réguler à la baisse leur capacité d'exacerber les réponses pro-inflammatoires (Possa *et al.*, 2013). Bien qu'efficaces, ces thérapies ne sont toutefois pas suffisantes pour contrôler les symptômes d'asthme de tous les patients. Ainsi, davantage de recherches seront nécessaires pour élucider la complexité des liens existant entre le recrutement d'éosinophiles et l'exacerbation des symptômes des patients asthmatiques (Jacobsen *et al.*, 2012).

### **3.2.3 Autres maladies avec implication éosinophilique**

Le recrutement éosinophilique est un signe clinique nouvellement documenté dans plusieurs maladies. Souvent, leur implication dans le processus pathologique est confirmée par une diminution des symptômes à la suite de leur déplétion avec des glucocorticoïdes. Cependant, les divers mécanismes par lesquels l'inflammation éosinophilique contribue au développement de ces maladies ne sont pas encore totalement élucidés (Jacobsen *et al.*, 2012). Une première maladie associée aux éosinophiles est l'œsophagite éosinophilique. Celle-ci est caractérisée par un recrutement éosinophilique au niveau des couches musculaires successives constituant l'œsophage. Des modèles murins de la maladie et des patients atteints possèdent des niveaux élevés de médiateurs solubles, dont l'IL-5 et l'éotaxine, pouvant recruter les éosinophiles au niveau de l'œsophage. Lorsqu'elle n'est pas traitée, l'œsophagite éosinophilique peut induire un remodelage graduel de l'œsophage ainsi qu'au développement d'une fibrosténose (Miehlke, 2015). L'application topique de corticostéroïdes est une thérapie permettant de contrôler les

symptômes chez les patients. Cependant, l'adoption d'une diète restrictive éliminant des aliments au fort potentiel immunogène tels que les œufs, le lait et le miel demeure une des meilleures options de traitement. L'utilisation systémique d'agents bloquant les cytokines impliquées dans la pathogenèse est une autre option de traitement dont l'efficacité est présentement à l'étude (Sodikoff *et al.*, 2015).

Le syndrome métabolique est une condition caractérisée par l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires, d'accidents vasculaires cérébraux et de diabète de type deux. Il a été démontré *in vivo* que les éosinophiles résidents des tissus adipeux participent largement à la différenciation des macrophages résidents vers le phénotype M2, nécessaires à la régulation de l'homéostasie du glucose et permettant une sensibilité normale à l'insuline, via la libération d'IL-4. Le nombre d'éosinophiles présents dans le tissu adipeux serait aussi inversement proportionnel avec la déposition de graisses (Jacobsen *et al.*, 2012, Kaur, 2014). Ainsi, un mauvais recrutement des éosinophiles au sein des tissus adipeux augmenterait la susceptibilité de développer un diabète de type deux, car plus de graisses seraient déposées dans les tissus adipeux, tout en compromettant la sensibilité à l'insuline. Il est intéressant de noter que l'éosinophilie induite par l'infection avec des vers parasites a permis de récupérer une tolérance au glucose normale chez un modèle de souris nourries avec une diète riche en gras (Wu *et al.*, 2011).

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des pathologies du système digestif. Celles-ci sont caractérisées par de l'inflammation chronique induisant un remodelage tissulaire. Les signes cliniques classiques sont la présence de diarrhée, la constipation et la perte de poids. Les deux types de maladies inflammatoires de l'intestin les plus courantes sont la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Alors que dans la colite ulcéreuse l'inflammation se limite majoritairement au colon, dans la maladie de Crohn l'inflammation peut s'étendre sur l'entièreté du tube digestif (Kaser *et al.*, 2010). Considérant leur rôle dans la défense du corps contre les vers parasites, une forte présence éosinophilique au niveau de l'estomac et des intestins est courante. Cependant, en présence de maladies inflammatoires de l'intestin actives, la dégranulation des éosinophiles est augmentée dramatiquement. Cela pourrait ainsi contribuer au remodelage tissulaire caractéristiquement observé au cours de ces maladies (Masterson *et al.*, 2011). De plus, lors de modèles murins de maladies inflammatoires de l'intestin, l'absence d'éosinophiles est associée à une diminution du nombre, du niveau d'activation et du potentiel d'activation des lymphocytes T<sub>H</sub>2 CD4<sup>+</sup> résidents des ganglions (Lampinen *et al.*, 2008). Elle est aussi associée à un ralentissement de la progression de la maladie et permet même d'empêcher l'induction chimique de la maladie par des agents classiques tels que le dodécylsulfate de sodium (Vieira *et*



*al.*, 2009). Ainsi, la présence éosinophilique est nécessaire à la protection de l'hôte envers les parasites intestinaux. Or, leur trop forte activation exacerberait des symptômes des maladies inflammatoires de l'intestin (Jacobsen *et al.*, 2012).

Le rejet de greffes d'organes solides est un processus impliquant les réponses immunitaires innée et adaptative. Celui-ci est caractérisé par l'activation des lymphocytes T de l'hôte à la suite de la reconnaissance des antigènes du greffon en tant que molécules du « non-soi ». L'activation des lymphocytes T permet l'induction de leur expansion clonale et leur différenciation en cellules effectrices, favorisant ainsi la destruction du greffon. Le rejet de greffe est associé à une augmentation de la mortalité et de la morbidité de l'hôte (Ingulli, 2010). La présence d'éosinophiles dans les organes greffés ayant été rejetés est fréquente et elle est même employée en tant que marqueur d'un rejet de greffe de type aigu (Cromvik *et al.*, 2014). Par ailleurs, certaines études menées sur des modèles murins indiquent que les éosinophiles seraient directement impliqués dans l'induction du rejet de greffe (Goldman *et al.*, 2001, Jacobsen *et al.*, 2012). Ainsi, dans un modèle d'allogreffe avec des CMH incompatibles, il y aurait moins d'inductions de rejets en absence d'éosinophiles (Le Moine *et al.*, 1999). Ces granulocytes participent aussi à l'induction de fibrose associée à la maladie du greffon contre l'hôte. En effet, ils libèrent de la MBP, pouvant activer la libération de tryptase par les mastocytes, et du TGF- $\beta$ , participant au remodelage de la matrice extracellulaire (Jacobsen *et al.*, 2012). De plus, dans un modèle de la maladie du greffon contre l'hôte chronique à la suite d'une transplantation cardiaque, il y aurait moins de signes de fibrose (moins de dépôts de collagène et d'élastine) en absence d'éosinophiles (Chen *et al.*, 2011). En somme, les éosinophiles activés jouent un rôle relativement mineur mais actif dans le rejet de greffe aigu ou chronique, car ils contribueraient au remodelage tissulaire et au développement de fibrose, menant à la destruction du greffon.

### **3.2.4 Autres implications éosinophiliques dans la santé humaine**

La réponse immunitaire adaptative permet normalement le développement de cellules mémoires. Celles-ci persistent en circulation après la résolution de l'infection et permettent de construire une réponse immunitaire adaptative plus rapidement lors d'une infection subséquente par le même pathogène (Tokoyoda *et al.*, 2010). Les mécanismes impliqués dans le maintien de la survie des plasmocytes sont donc importants pour la mémoire immunologique. Les éosinophiles sont situés près des plasmocytes dans la moelle osseuse. Ils contribueraient à la mémoire humorale en favorisant la survie des plasmocytes de la moelle osseuse via, possiblement, la libération paracrine de médiateurs solubles tels que le TNFSF13 et l'IL-6. De plus, lorsqu'ils sont absents

(souris *PHIL* ou  $\Delta$ dblGATA1 dépourvues d'éosinophiles) ou qu'ils sont éliminés (avec anticorps induisant l'apoptose dépendante de SiglecF), la survie des plasmocytes est diminuée (Chu *et al.*, 2011). Les éosinophiles influencent également la prolifération des lymphocytes B. En effet, les médiateurs solubles libérés par les éosinophiles seraient en mesure d'augmenter la survie des lymphocytes B ainsi que leur production d'immunoglobulines *in vitro*. De plus, les souris surexprimant l'IL-5 sont hyperéosinophiliques et exhibent une lymphocytose réversible par la déplétion des éosinophiles (Macias *et al.*, 2001). Enfin, il existe une corrélation entre le nombre d'éosinophiles et le nombre de lymphocytes B chez l'humain (T. W. Wong *et al.*, 2014). À la lumière de ces observations, il a été proposé que les éosinophiles seraient un amplificateur de la réponse humorale en réaction à de pathogènes spécifiques (Jacobsen *et al.*, 2012).

Il existe une forte infiltration éosinophilique au niveau de l'utérus lors des menstruations et du placenta (Jeziorska *et al.*, 1995). Alors que les menstruations sont un processus inflammatoire aigu, le maintien de l'inflammation chronique mène au développement de l'endométriose. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de tissu fibreux et est une cause fréquente d'infertilité féminine (Macer *et al.*, 2012). Il a été observé que l'infiltration et la dégranulation des éosinophiles dans le tissu endométriotique fibreux est élevée. Ainsi, ils seraient possiblement impliqués dans le remodelage et dans la fibrose associés à cette maladie (Blumenthal *et al.*, 2000). De plus, chez les femmes enceintes, il existe des évidences de dégranulation éosinophilique au niveau du col de l'utérus. Alors, il a été proposé que les éosinophiles seraient aussi impliqués dans la dilatation du col de l'utérus en préparation de l'accouchement puis du remodelage de tissus subséquent (Knudsen *et al.*, 1997). Cette infiltration éosinophilique serait corrélée de façon spatio-temporelle avec celle de macrophages activés. Ainsi, les éosinophiles participeraient également au remodelage de tissus via l'activation de macrophages résidents (Timmons *et al.*, 2009).

### **3.2.5 L'hypothèse LIAR**

Une nouvelle hypothèse concernant le rôle des éosinophiles pendant la santé et pendant les maladies a été proposée par le laboratoire Lee en 2010. Leur hypothèse, dénommée *LIAR* pour *Local Immunity and/or Remodeling/Repair*, stipule que les éosinophiles ne sont pas que des cellules effectrices en stade terminal ayant des effets pro-inflammatoires sur les tissus. Ils considèrent plutôt que les effets des éosinophiles sur les tissus sont dépendants de la polarisation inflammatoire du microenvironnement (J. J. Lee *et al.*, 2010). D'abord, les éosinophiles sont recrutés à la suite de la libération de médiateurs solubles de l'inflammation tels que les DAMPs ayant pour source des foyers locaux de mort cellulaire. En présence de facteurs de survie

éosinophiles tels que l'IL-5 ou le GM-CSF, les granulocytes s'accumulent pour former une population stable lors de l'état basal. Par la suite, la polarisation inflammatoire du microenvironnement détermine comment les fonctions effectrices des éosinophiles auront un effet sur les tissus. Dans le cas d'un microenvironnement polarisé vers une réponse de type Th<sub>2</sub>, comme observé lors de pathologies telles que l'asthme, les allergies, l'endométriose ou les infections parasitaires, les éosinophiles contribueront à exacerber la réponse immunitaire locale. Au contraire, lorsque la polarisation du microenvironnement est de type Th<sub>1</sub>, tel qu'il est observé pendant les transplantations d'organes, les maladies inflammatoires de l'intestin ou certaines infections parasitaires, les éosinophiles contribueront plutôt à la régulation à la baisse de la réponse immunitaire locale. Enfin, si le microenvironnement est à l'état basal (immunoneutre), il n'y a pas de modulation majeure de la réponse inflammatoire locale effectuée par les éosinophiles (Furuta *et al.*, 2014). Cette même réponse immunitaire, ayant possiblement été modulée par les éosinophiles, a à son tour un effet sur les fonctions effectrices de ces granulocytes. Ainsi, une réponse inflammatoire de type Th<sub>2</sub>, ayant pu être régulée à la hausse par les éosinophiles, favorise leur libération soutenue de médiateurs solubles et de protéines granulaires, ayant à leur tour un effet considérable sur le remodelage ou la réparation tissulaire locale. En somme, l'hypothèse *LIAR* propose que le microenvironnement immunologique présent lors du recrutement éosinophilique donne un signal situationnel déterminant quelle sera la prépondérance de leurs fonctions effectrices. D'un côté, elles pourraient exacerber une réponse inflammatoire et contribuer à la détérioration tissulaire. D'un autre côté, elles contribueraient plutôt à la résolution de l'inflammation et à la réparation des dommages tissulaires (J. J. Lee *et al.*, 2010). La figure 3.3 résume l'hypothèse *LIAR*, décrivant les effets des éosinophiles pendant la santé et pendant les maladies.

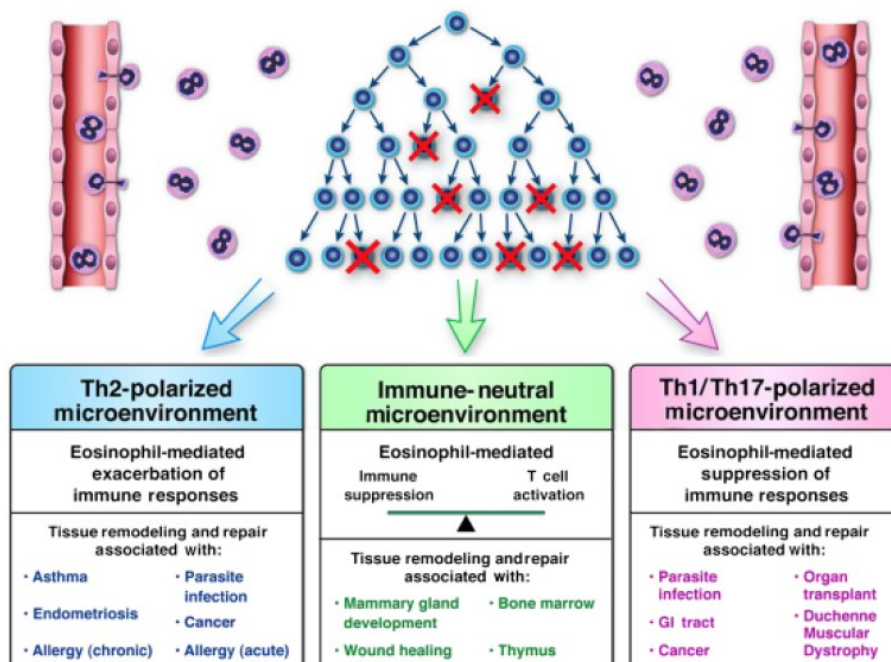


Figure 3.3. Les fonctions des éosinophiles pendant la santé et pendant les maladies : l'hypothèse LIAR. Tiré avec autorisation de (Lee *et al.*, 2010).

### 3.3 L'effet des nanoparticules sur les éosinophiles; des preuves indirectes !

Les NPs ZnO influencent les fonctions des cellules immunitaires de différentes façons selon le type cellulaire. Par exemple, même si celles-ci régulent à la hausse la phagocytose des neutrophiles et des macrophages *in vitro*, elles diminuent la capacité des macrophages *in vivo* de résoudre des infections bactériennes (Babin *et al.*, 2015, C. D. Lin *et al.*, 2014). Cependant, contrairement aux monocytes/macrophages, aux neutrophiles et aux lymphocytes, il n'y a pas à ce jour d'études sur l'effet direct des NPs ZnO sur les fonctions des éosinophiles humains. Chez les monocytes/macrophages, les cellules NK, les lymphocytes et des lignées de cellules de l'épithélium pulmonaire, les NPs ZnO induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène et la mort cellulaire (Hanley *et al.*, 2009, Wilhelmi *et al.*, 2013). La susceptibilité des cellules à la mort cellulaire serait dépendante de leur capacité à incorporer les NPs et à produire des espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, ces espèces oxydantes sont fortement impliquées dans l'induction de la mort cellulaire, car l'utilisation d'un agent antioxydant permettrait parviendrait à amoindrir les effets des NPs ZnO sur la viabilité cellulaire (Chuan-Chin Huang *et al.*, 2010). Aussi, chez les PBMC, les NPs ZnO induisent la libération de médiateurs solubles tels que l'IFN $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-12 (Ruchi Roy *et al.*, 2014c). Chez les neutrophiles humains, les NPs ZnO promeuvent la synthèse de protéines *de novo* et la dégranulation de gélatinases. Par contre,

contrairement à ce qui est observé chez les autres types cellulaires, les NPs ZnO n'induisent pas la production d'espèces réactives de l'oxygène et favorisent un retard de l'apoptose spontanée chez les PMNs (Babin *et al.*, 2013, Goncalves *et al.*, 2014). Considérant que les éosinophiles peuvent effectuer une flambée oxydative, il sera intéressant de déterminer si celle-ci peut être induite par les NPs ZnO et si celle-ci peut induire la mort cellulaire.

Certaines études ont démontré indirectement que les NPs ZnO affectent la biologie des éosinophiles humains. Il a été mis en évidence, sur des modèles animaux tels que les souris, les rats et même des agneaux, que les NPs ZnO pourraient recruter les éosinophiles au niveau des poumons et des reins (Najafzadeh *et al.*, 2013, Nounou *et al.*, 2013). Alors que certains groupes proposent que ce recrutement serait dépendant des ions métalliques issus de la dissolution des NPs dans les milieux biologiques, un groupe aurait démontré que les NPs ZnO entières en sont plutôt les responsables (Cho *et al.*, 2012, Ivask *et al.*, 2015). Leurs résultats indiquent que l'instillation pulmonaire d'ions  $Zn^{2+}$  n'induit pas d'éosinophilie pulmonaire, alors que les nanoparticules entières en induisent une. Un autre groupe a quant à lui démontré que les NPs ZnO auraient un effet d'adjuvant envers l'ovalbumine, via un mécanisme polarisant le microenvironnement vers une réponse immunitaire de type  $T_H2$ . Ainsi, des souris ayant été immunisées avec de l'ovalbumine et traitées avec diverses doses de NPs ZnO de façon intrapéritonéale produiraient davantage d'anticorps (R. Roy *et al.*, 2014a). De plus, leurs splénocytes produiraient des niveaux plus élevés d'IL-2, IL-4, IL-6 et IL-17 ainsi que moins d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  (Kuo-Liang Huang *et al.*, 2015).

# QUESTION DE RECHERCHE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

## **Problématique et question de recherche**

Certaines NPs induisent une hyperéosinophilie pulmonaire dans des modèles animaux d'asthme. Les NPs ZnO influencent directement les fonctions des granulocytes polymorphonucléaires neutrophiles. Les éosinophiles sont un autre type de granulocytes, impliqués dans la régulation des réponses immunitaires. Or, la compréhension de l'effet des NPs sur les éosinophiles est déficiente à ce jour. À la lumière de ces observations, nous nous sommes demandé si les NPs ZnO étaient également en mesure de moduler directement les fonctions cellulaires des éosinophiles humains.

## **Hypothèse**

Nous avons posé l'hypothèse que tout comme pour les neutrophiles, des fonctions cellulaires des éosinophiles humains seraient modulées par l'interaction avec les NPs ZnO.

## **Objectifs**

Déterminer l'effet des NPs ZnO sur la morphologie des éosinophiles ainsi que sur cinq de leurs principales fonctions cellulaires soit : la production d'espèces réactives de l'oxygène, la viabilité cellulaire, la synthèse *de novo* de protéines, l'activité gélatinase et la libération de cytokines.

**DEUXIÈME SECTION: *ARTICLE***

# CHAPITRE 4: HUMAN EOSINOPHILS ARE DIRECT TARGETS TO NANOPARTICLES: ZINC OXIDE NANOPARTICLES (ZNO) DELAY APOPTOSIS AND INCREASE THE PRODUCTION OF THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IL-1B AND IL-8

## 4.1 Présentation de l'article

### Titre en français

Les éosinophiles humains sont des cibles directes des nanoparticules: les nanoparticules d'oxyde de zinc (znO) retardent l'apoptose et augmentent la production des cytokines pro-inflammatoires il-1 $\beta$  et il-8

### Auteurs

**Luis Rafael Silva:** Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Contribution: Planification des expériences, exécution des expériences, analyse des résultats, production des figures, contribution à la rédaction des sections Introduction, Materials and methods et Results.

**Denis Girard:** Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Contribution: Planification des expériences, analyse des résultats, rédaction du manuscrit, réponses aux révisions.

### Journal de publication

Toxicology letters, soumis le 30 mars 2016, accepté le 18 juillet 2016, publié en ligne le 21 juillet 2016.



## Résumé en français

Les nanoparticules d'oxyde de zinc (NPs ZnO) ont été récemment proposées en tant que candidats novateurs pour le traitement de maladies inflammatoires allergiques. Toutefois, des données récentes ont suggéré que les NPs ZnO induiraient une inflammation éosinophilique au niveau des voies respiratoires chez des rongeurs. Malgré ces observations, les interactions directes entre une NP spécifique et les éosinophiles humains n'ont pas, à ce jour, été investiguées. Dans cette étude, des éosinophiles humains fraîchement isolés ont été incubés avec des NPs ZnO puis certaines de leurs fonctions cellulaires ont été étudiées. Nous avons démontré que les NPs ZnO retardent l'apoptose des éosinophiles, partiellement via l'inhibition de caspases, ainsi qu'en empêchant la dégradation de la caspase-4 et de Bcl-xL. Les NPs ZnO ne déclenchent pas la production d'espèces réactives de l'oxygène, mais elles induisent la synthèse *de novo* de protéines. De plus, les NPs ZnO favorisent la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-8. Nous avons démontré à l'aide d'une approche pharmacologique que l'inhibition de la caspase-1 abolit la capacité des NPs ZnO à induire la production d'IL-1 $\beta$  et IL-8, alors que l'inhibition de la caspase-4 n'a d'effet que sur la production d'IL-8. Nos résultats mettent en évidence le besoin d'entreprendre des études pour déterminer la possibilité d'utiliser des NPs en tant que «nanothérapies», particulièrement pour des maladies impliquant une hyperéosinophilie. En conclusion, nous démontrons que les éosinophiles humains sont une cible directe des NPs, en particulier des NPs ZnO.

## 4.2 Article

### 4.2.1 Highlights

Nanoparticles can alter the biology of human eosinophils. Zinc oxide nanoparticles delay human eosinophil apoptosis. Zinc oxide nanoparticles increase the production of pro-inflammatory cytokines.

#### 4.2.2 Abstract

Zinc oxide NPs (ZnO) have been recently proposed as novel candidates for the treatment of allergic inflammatory diseases. Paradoxically, recent data suggested that ZnO could cause eosinophilic airway inflammation in rodents. Despite the above observations, there are currently no studies reporting direct interaction between a given NP and human eosinophils themselves. In this study, freshly isolated human eosinophils were incubated with ZnO and several cellular functions were studied. We found that ZnO delay human eosinophil apoptosis, partially by inhibiting caspases and by preventing caspase-4 and Bcl-xL degradation. ZnO do not induce production of reactive oxygen species but increase de novo protein synthesis. In addition, ZnO were found to increase the production of the proinflammatory IL-1b and IL-8 cytokines. Using a pharmacological approach, we demonstrated that inhibition of caspase-1 reversed the ability of ZnO to induce IL-1b and IL-8 production, whereas inhibition of caspase-4 only reversed that of IL-8. Our results indicate the necessity of conducting studies to determine the potential of using NP as nanotherapies, particularly in diseases in which eosinophils may be involved. We conclude that, indeed, human eosinophils represent potential new direct targets to NPs, ZnO in the present case.

#### 4.2.3 Introduction

Eosinophil granulocytes are best known for their role in the host defense against parasitic pathogens and to play a pivotal role in the pathogenesis of asthma and allergic diseases (Shamri et al., 2011). However, increasing evidences revealed additional roles for eosinophils in regulating inflammation, especially by their ability to secrete different mediators, including a variety of cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-8 (Braun et al., 1993; Shamri et al., 2011). Although eosinophils only account for ~3% of blood leukocytes in humans, they can accumulate in tissues and airways under certain pathological conditions. Eosinophils are known to undergo spontaneous apoptosis and subsequent elimination by professional phagocytes is thought to be crucial for the resolution of airway inflammation, which occurs in asthma. Several agents are known to prolong eosinophil survival, including the three antiapoptotic cytokines GM-CSF, IL-3 and IL-5 (Ilmarinen and Kankaanranta, 2014; Ilmarinen et al., 2014; Tai et al., 1991). Interestingly, these cytokines are present in the lungs of asthmatic patients (Ilmarinen and Kankaanranta, 2014; Ilmarinen et al., 2014). In contrast, other agents can induce eosinophil apoptosis, including the plant lectin *Viscum album* agglutinin-1 (Lavastre et al., 2005) and glucocorticoids (Druilhe et al., 2003), these latter

being very effective anti-inflammatory drugs used in the treatment of eosinophilic disorders such as asthma (Barnes, 1996). Therefore, identification of new agents that can modulate eosinophil apoptosis represents an important step for the development or improvement of therapeutic strategies that target eosinophils.

A tremendous interest to use nanomaterials for medical diagnosis and therapeutic purposes has increased in the past few years. Although a lot of investigations focus on the use of NPs for drug delivery in cancer therapies, there are several studies promoting the use of NPs as carriers to detect allergies or to alleviate inflammatory symptoms (Szelenyi, 2012). However, even this represents a very interesting interest and a potential avenue to use nanodrug systems, there are some potential toxic risks since, cytotoxicity, oxidative stress, genotoxicity, and inflammation have been reported, both in *in vitro* and *in vivo* models (Onoue et al., 2014). Among nanoparticles, zinc oxide NPs (Zhang et al., 2013) (hereafter denoted as ZnO) are good prospects to be used in nanomedicine. Indeed, ZnO were recently proposed as novel candidates for the treatment of allergic inflammatory diseases (Kim et al., 2014). However, ZnO were found to possess pro-inflammatory activities both *in vitro* and *in vivo* (Babin et al., 2013; Goncalves and Girard, 2014; Roy et al., 2013). For example, based on the fact that exposure to ZnO in environmental and occupational setting causes acute pulmonary responses via induction of pro-inflammatory mediators, including interleukin-8 (IL-8), Wu et al. (2010) demonstrated that ZnO induce IL-8 production by human bronchial epithelial cells via NF- $\kappa$ B activation. *In vivo*, although topically applied ZnO were found to suppress allergen-induced skin inflammation, these NP also induces vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model. In addition, it was recently shown that ZnO induce eosinophilic airway inflammation in mice (Huang et al., 2015).

Despite the fact that an increased number of neutrophils and/or eosinophils are observed in different *in vivo* models of inflammation and that most of the *in vitro* studies performed do not use primary human cells, the role of NPs on human granulocyte biology needs to be better documented. To the best of our knowledge, there are no studies reporting a direct interaction with a given NP and human eosinophils. Here, we show that ZnO NPs can alter the biology of human eosinophils by suppressing apoptosis and by inducing the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-8.

#### **4.2.4 Materials and methods**

##### **Nanoparticles**

Zinc oxide nanoparticles used in this study have been described previously (Babin et al., 2013).

##### **DLS analysis**

The size distribution, surface charge (zeta potential) and the polydispersion index (PDI) of the NPs were determined by dynamic light scattering using a Malvern Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600 from Malvern Instruments Inc., Westborough, MA). Measurements were performed at 37 °C with NPs in suspension in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), the medium in which NPs were suspended and incubated with eosinophils throughout this study or in HBSS alone, the medium used for the detection of intracellular ROS as described under.

##### **Eosinophil isolation**

Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Granulocytes were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), to obtain neutrophils and eosinophils as previously described (Lavastre et al., 2005). Experiments were performed when cell purity was >95% as verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ). Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was always >98%. When >5% of eosinophils were detected in granulocyte enriched preparations, eosinophils were separated from neutrophils by negative immunomagnetic selection using anti-human CD16-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Purity and viability after eosinophil isolation were routinely >95% as assessed as above.

##### **Cell viability and cell shape changes**

Freshly isolated human eosinophils ( $5 \times 10^5$  cells/ml in RPMI-1640 HEPES-P/S, supplemented with 10% heat-inactivated FBS) were treated for 0–48 h with or without the indicated concentrations of ZnO. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion morphological cell shape changes were observed under light microscopy (100X), and photomicrographs were taken using a Nikon Eclipse TS100 camera.

### **Evaluation of cell size and inner complexity by flow cytometry**

Eosinophils ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were treated with or without 100 mg/ml ZnO for 30 min, 3 h, 24 h and 48 h and data for cell size (FSC-H) and inner complexity (SSC-H) were acquired by flow cytometry using a FACScan (BD Biosciences) as previously published (Poirier et al., 2014).

### **Assessment of eosinophil apoptosis**

Apoptosis was evaluated by cytology, as previously published (Lavastre et al., 2005; Poirier et al., 2014). Eosinophils ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in 48-well plates for 24 h in the presence of buffer (Ctrl), the pro-apoptotic plant lectin VAA-I (0.5 mg/ml) or the indicated concentrations of ZnO. Cells were cytocentrifuged on microscope slides and colored with the Hema 3 staining kit. Apoptosis evaluation was based on the nucleus morphology. The results were expressed as the percentage of eosinophils in apoptosis. In some experiments, annexin-V binding was used to determine the eosinophil apoptotic rate after 24 h. Cells were suspended at concentrations of  $5 \times 10^6$  cells/mL, washed and then resuspended at  $1 \times 10^5$  cells/mL and incubated with 2 mL of FITC-annexin-V for 30 min at 4°C (light protected) prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. In some experiments the pancaspase inhibitor (Z-VAD-FMK), the specific caspase-1 (Z-YVAD-FMK) or caspase-4 (Z-LEVD-FMK) inhibitors were added 1 h (all at 50 mM) prior the addition of ZnO for a total of 24 h before determining the apoptotic rate.

### **Western blot analysis**

Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl), rhIL-5 (30 ng/ml) or ZnO (50 mg/ml) for 24 h and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 500 000 cells were loaded and subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred from the gel to PVDF or nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% milk in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20). After washing, a dilution of 1:1000 was used for BCL-xL antibodies (Santa Cruz) or caspase-4 (Cell Signaling) in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween, and incubated for 1 h at room temperature with HRP-labeled goat anti-mouse IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:25,000) followed by several washes. Protein expression was revealed using Clarity™ western ECL (Bio-Rad). Membranes were stripped with ReBlot Plus Strong (Millipore) and reprobated with an anti-GAPDH antibody (Santa Cruz, 1:2000) to confirm equal loading of proteins. Chemiluminescence was revealed with a chemiDoc™ MP Imaging system from Bio-Rad.

### **Detection of intracellular ROS**

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were suspended in HBSS containing 10 mM CM-H2DCFDA for 15 min at 37°C as previously published (Simard et al., 2011). Cells were then washed twice before being incubated in the presence of buffer or 100 mg/ml ZnO for 5, 15, 30, 60 and 90 min. PMA ( $10^{-7}$  M) was used as a positive control. Fluorescence was recorded using a FACScan. ROS production was expressed as MFI.

### **Metabolic labeling and de novo protein synthesis assay**

Cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were metabolically labeled with 4.625 MBq of the EXPRESS [35S]-protein labeling mix EasyTag™ (PerkinElmer, Waltham, MA) in the presence or absence of 100 µg/ml ZnO or the indicated concentrations of cycloheximide (CHX) for 24 h as previously described (Poirier et al., 2014).

### **Measurements of IL-1β and IL-8 by ELISA**

The measurement of IL-1β and IL-8 production in the extracellular milieu was determined using commercially available ELISA kits (Invitrogen Canada Inc., ONT) as per the manufacturer's recommendation. In some experiments the pancaspase inhibitor (Z-VAD-FMK), the specific caspase-1 (Z-YVAD-FMK) or caspase-4 (Z-LEVD-FMK) inhibitors were added 1 h (all at 50 mM) prior the addition of 100 mg/ml ZnO for a total of 24 h before quantification of the cytokines.

### **Statistical analysis**

The data are reported as mean ± SEM and were analyzed by one-way ANOVA. Differences between tested groups and control were assessed using the Dunnett's Multiple Comparison Test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was established at \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; and \*\*\*  $p \leq 0.005$  vs control or appropriate diluent, and each experiment was performed and validated at least 3 times using different blood donors.

## **4.2.5 Results**

### **Characterization of ZnO nanoparticles**

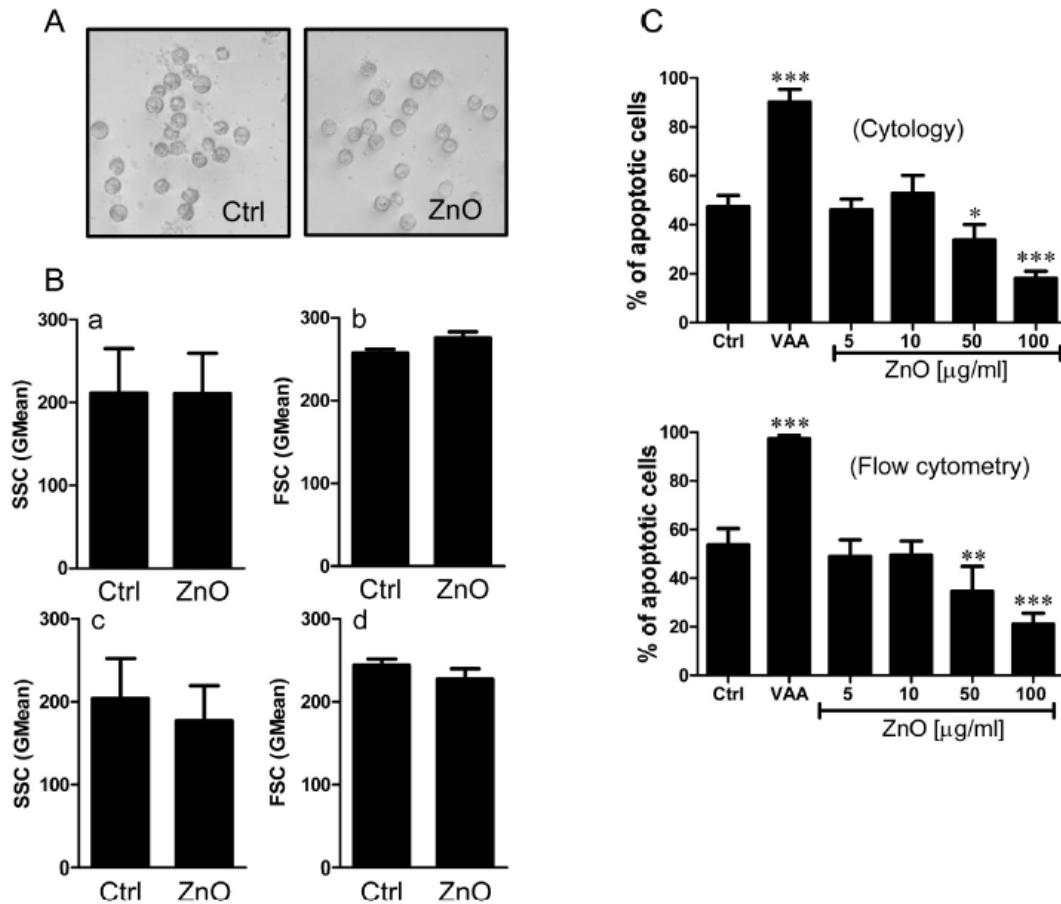
As determined by DLS, the size distribution of ZnO in RPMI medium + 10% FBS was trimodal with a size of 61.9 nm (58.8%), 11.6 nm (37.2%) and large aggregates of ~3900 nm (4%). The values for the zeta potential and PDI are  $-8.7 \pm 0.8$  mV and  $0.5 \pm 0.04$ . However, different values were observed when the NP were suspended in HBSS alone. Indeed, a unimodal size distribution

of ZnO of 2.9 nm (100%) was observed. Also, a different zeta potential value of  $-8.3 \pm 0.8$  mV was observed with a PDI of  $1 \pm 0$ .

### **Eosinophil cell viability, cell shape changes and apoptotic rate in response to ZnO treatment**

After 24 h, ZnO did not significantly alter the basal level of cell viability which was  $>92\%$  at concentrations ranging from 5 to 100 mg/ml (data not shown). However, after 48 h  $\sim 50\%$  of eosinophils were viable in absence of NPs but, in the presence of 50 or 100 mg/ml of ZnO, cell viability increased to at least 70% (data not shown). Based on these results, and from those obtained previously when studying the interaction between different NPs and human neutrophils (Babin et al., 2013; Goncalves et al., 2010; Poirier et al., 2014), we used a concentration of 100 mg/ml ZnO throughout this study, otherwise specified. Next, cell shape changes were monitored by cytology from 0 to 48 h after NP treatment. As illustrated in Fig. 1A, the cell shape of ZnO-induced eosinophils was not altered and remained round or spherical. For clarity, only the 48 h time point is shown, since the cell shape did not change throughout the experiments. Because cellular uptake of NPs in mammalian cells can be determined by flow cytometric light scatter analysis (Suzuki et al., 2007) following a treatment within few min to few hours, we next evaluated whether or not human eosinophils were able to internalize ZnO in vitro. As illustrated in Fig. 1B, treatment with ZnO did not alter the granularity in eosinophils (SSC in the graph) when tested after 30 min (panel a), as well as after 3 h (panel c) and even after up to 48 h (data not shown), suggesting that ZnO do not enter inside eosinophils. In addition to the granularity, the cell size was determined in parallel by flow cytometry (FSC) and, as illustrated in Fig. 1B (panels c and d), it remained unchanged after 30 min and 3 h, respectively. Just as for the granularity, we did not observe any changes for the cell size over a period of up to 48 h (data not shown). Some NPs were recently found to modulate spontaneous apoptosis in human neutrophils (Goncalves et al., 2010; Goncalves and Girard, 2014), but their effects on eosinophil apoptosis are still unknown. To verify this, we incubated freshly isolated human eosinophils with increasing concentrations of ZnO and determined the apoptotic rate after 24 h by cytology. The 24 h time point was selected based on the fact that normally,  $\sim 30\text{--}50\%$  of eosinophils undergo spontaneous apoptosis, a suitable time point for our experimental conditions (Ilmarinen et al., 2009). Fig. 1C (upper panel) illustrates that ZnO inhibited spontaneous eosinophil apoptosis in a concentration-dependent fashion when compared to untreated cells. In these experiments, the plant lectin VAA-1 known to induce human eosinophil apoptosis was used as a positive control (Lavastre et al., 2005). Results

were confirmed with another assay measuring the binding of FITC-annexin-V (Fig. 1C, bottom panel).



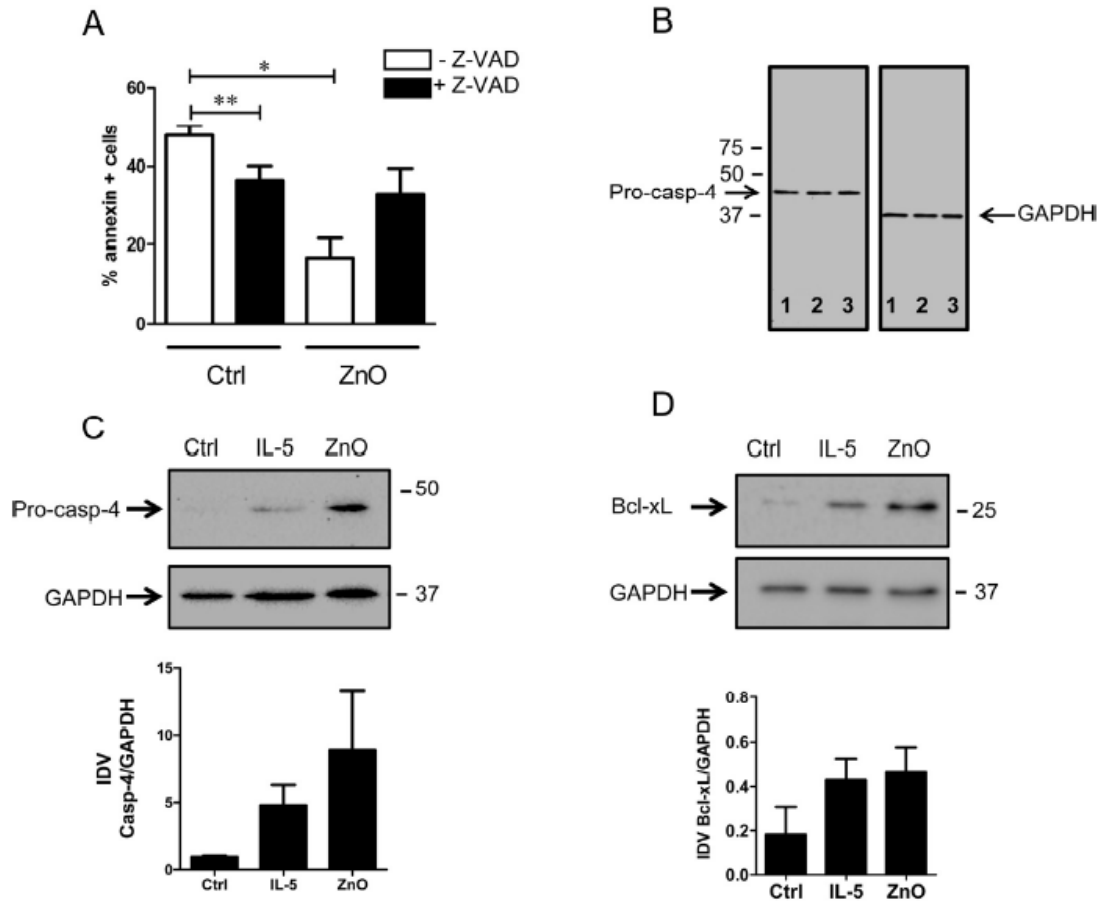
**Fig. 1. ZnO do not induce cell shape changes, do not affect cell size and intracellular complexity but delay spontaneous eosinophil apoptosis.** (A) freshly isolated human eosinophils were incubated in the presence or absence (Ctrl) of ZnO (100 mg/ml) for 0–48 h and cell morphology was monitored by optical microscopy. For clarity, only the data obtained after 48 h are shown. Results are typical illustrations representative of 5 different experiments. (B) cells were incubated in the presence or absence (Ctrl) of ZnO (100 mg/ml) for 30 min (panels a,b) or 3 h (panels c and d) and intracellular granularity (SSC, panels a,c) and cell size (FSC, panels b,d) were determined by flow cytometry. Results are means  $\pm$  SEM (n = 3); (C) cells were incubated for 24 h in the presence of buffer (Ctrl), *Viscum album agglutinin-1* (VAA) or the indicated concentration of ZnO and apoptosis was determined by cytology (upper panel) and flow cytometry (bottom panel) by determining the number of FITC-annexin-V positive cells as described in Materials and Methods. Results are means  $\pm$  SEM (n  $\geq$  4).

### ZnO inhibit caspases and prevent Bcl-xL degradation in human eosinophils

In order to determine if ZnO could act by inhibiting caspases, we next used the pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK. As illustrated in Fig. 2A, addition of Z-VAD reversed the antiapoptotic effect of ZnO in human eosinophils. In other cells, ZnO were found to be proapoptotic and to act as an



endoplasmic reticulum (ER) stressor, generally involving caspase-4 (Chen et al., 2014). Here, since Z-VAD is known to inhibit caspase-1, -3, -4 and -7, we reasoned that ZnO could inhibit the ER stress-induced cell apoptosis pathway, by preventing caspase-4 activation, which, prior this study, has probably never been investigated in human eosinophils. Although the protein expression of caspase-1 has been recently reported in human eosinophils (Wong et al., 2014), that of caspase-4 is unknown. Therefore, we first determined if these cells express caspase-4 at the protein level. As illustrated in Fig. 2B, human eosinophils express caspase-4. Fig. 2C illustrates that treatment with ZnO prevents the degradation of capsase-4 at different degrees when compared with control cells where caspase-4 was only faintly visible. In these experiments, the antiapoptotic IL-5 cytokine was used in parallel and was also found to prevent caspase-4 degradation. IL-5 is known to delay human eosinophil apoptosis by increasing/maintaining the expression of the potent antiapoptotic protein Bcl-xL (Dibbert et al., 1998). Therefore, we next decided to determine if the mode of action of ZnO will be similar or not. As illustrates in Fig. 2D, the protein expression of Bcl-xL was increased by ZnO when compared to Ctrl, correlating with their antiapoptotic effect in human eosinophils. As expected, IL-5 also increased the Bcl-xL expression.

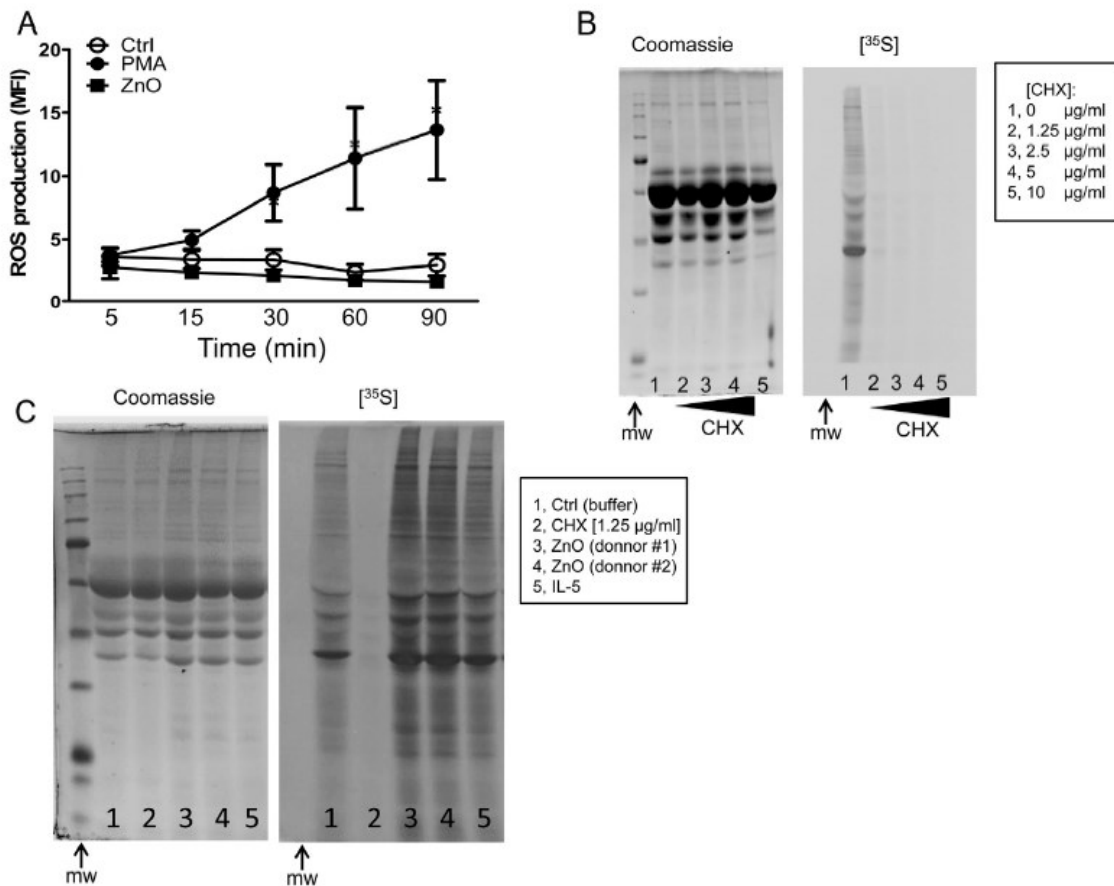


**Fig. 2. ZnO inhibit caspase activity in human eosinophils and prevent pro-caspase-4 and Bcl-xL degradation.** A, eosinophils were incubated 1 h with (+) or without (-) the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Z-VAD) 1 h prior addition of buffer (Ctrl) or ZnO for a total of 24 h and apoptosis was evaluated by flow cytometry by determining the number of FITC-annexin-V positive cells. B-D, cell lysates were prepared with fresh unstimulated eosinophils (B) or from cells incubated with buffer (Ctrl), IL-5 or ZnO for 24 h and the protein expression of pro-caspase-4 (Pro-casp-4), Bcl-xL or GAPDH (for loading control) were determined by western blot experiments as described in Materials and Methods. A, results are means  $\pm$  SEM (n = 4). B, lanes 1–3, represent three different blood donors. C and D, (upper part), results are from one representative experiments out of three. Densitometry analysis is illustrated in the corresponding bottom part.

### ZnO NPs do not promote ROS production but induce de novo protein synthesis in human eosinophils

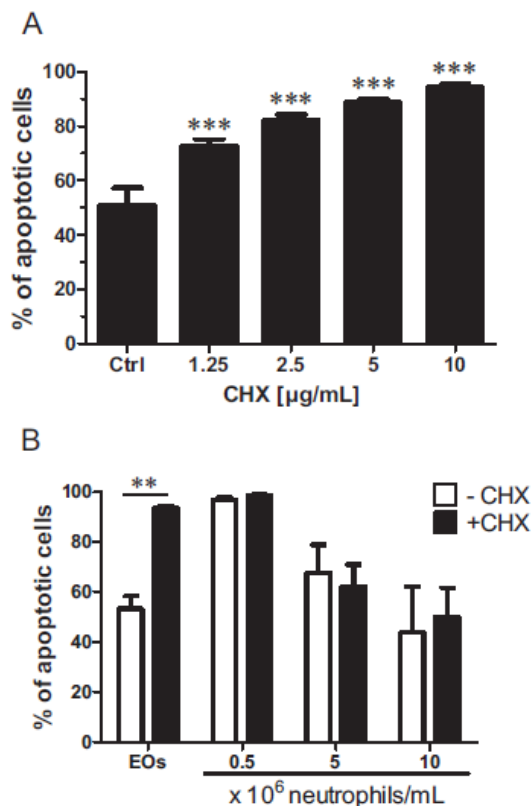
ZnO NPs were previously found to induce ROS production, but this has never been reported in human eosinophils (Song et al., 2010). In this study, as illustrated in Fig. 3A, ZnO did not induce ROS production when compared to untreated cells (0–90 min). Cells were however responsive, since, as expected (Kovacs et al., 2014) PMA induce ROS production. In order to better understand the mode of action of ZnO, we next investigated possible involvement of de novo

protein synthesis. We first performed a series of experiments by incubating freshly isolated human eosinophils for 24 h in the presence or absence of an increasing concentration of CHX, a potent protein synthesis inhibitor. Although *de novo* protein synthesis has been the object of several studies in human neutrophils (Binet et al., 2006; Girard et al., 1997; Goncalves and Girard, 2014; Poirier et al., 2014), this has not been reported in eosinophils. Interestingly, as illustrated in Fig. 3, eosinophils synthesize new polypeptides when incubated without addition of exogenous cytokines and/or growth factors (see Fig. 3B, lane 1). This *de novo* synthesis of polypeptides is inhibited by CHX in a concentration-dependent fashion (Fig. 3B, lanes 2–5). Next, the effect of ZnO on the ability of human eosinophils to exert *de novo* protein synthesis was investigated. As illustrated in Fig. 3C, ZnO induce the neo synthesis of several new polypeptides, as strongly as IL-5.



**Fig. 3. ZnO do not increase ROS production but induce *de novo* protein synthesis in human eosinophils.** A, cells were stained with the probe CM-H2DCFDA for 15 min and then treated with buffer (Ctrl), PMA, or ZnO for the indicated period of time and ROS production was determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are means  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). B and C, cells were metabolically labeled and incubated with the indicated agents for 24 h and *de novo* protein synthesis was performed as described in Methods. Results are from one representative experiment out of four. CHX, cycloheximide; mw, molecular weights.

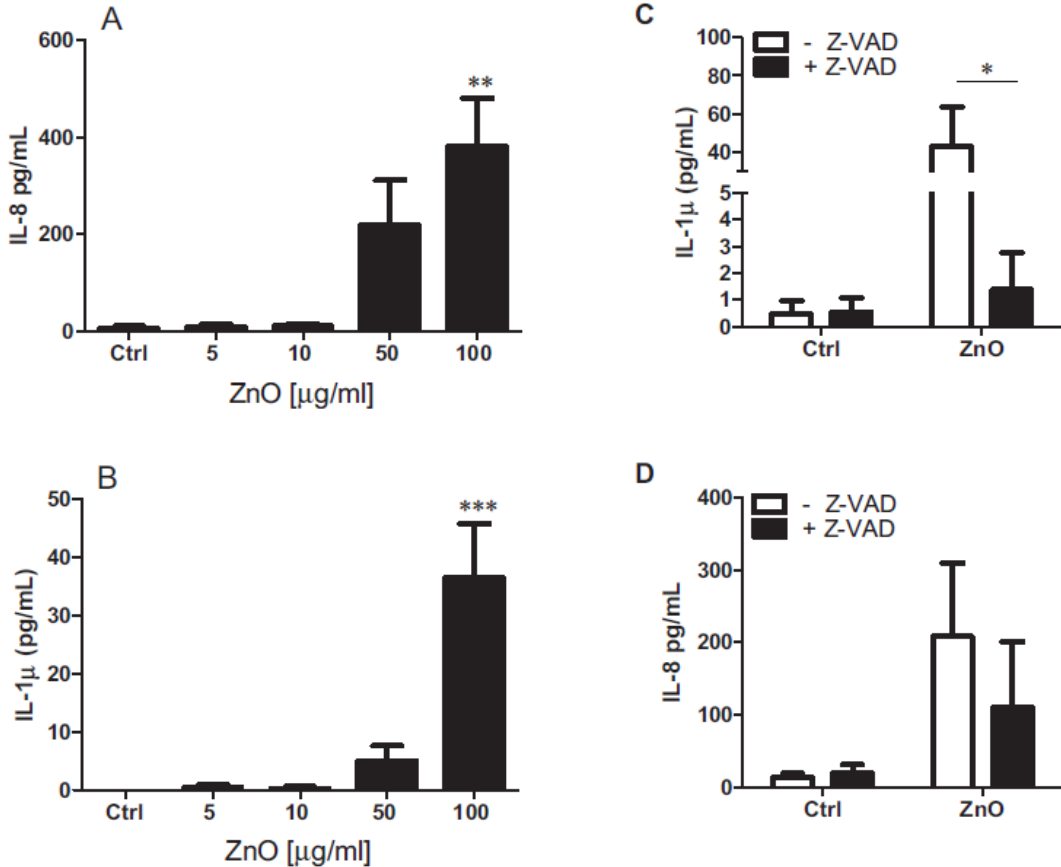
Because this is probably the first study investigating the role of de novo protein synthesis during human eosinophil apoptosis, we first determined how CHX itself will alter spontaneous apoptosis aiming that, as in neutrophils (Binet et al., 2006; Goncalves and Girard, 2014), it will not affect apoptosis. Unfortunately, unlike in neutrophils, CHX significantly induce eosinophil apoptosis in a concentration-dependent manner (Fig. 4A), even at the lowest concentration of 1.25 mg/ml. We normally use a concentration of 10 mg/ml CHX with neutrophils at a cell density of  $10 \times 10^6$  cells/ml for investigating the role of protein synthesis during apoptosis without altering the spontaneous apoptotic rate. However, we performed here a series of experiments to determine the role of CHX in neutrophils incubated at a lower cell density in order to make comparison with eosinophils. Interestingly, the basal apoptotic rate of human neutrophils incubated at a cell density of  $0.5 \times 10^6$  cells/ml, was close to 90% and this value decreased to ~70% and ~45% when neutrophils were incubated at 5 and  $10 \times 10^6$  cells/ml, respectively (Fig. 4B). Addition of 10 mg/ml of CHX during these experiments did not significantly alter neutrophil spontaneous apoptosis.



**Fig. 4. Cycloheximide induce eosinophil apoptosis and, unlike in neutrophils, could not be used to reverse spontaneous and ZnO-induced suppression of apoptosis.** A, eosinophils were incubated in the presence of the indicated concentrations of cycloheximide (CHX) and apoptosis was assessed by cytology after 24 h as described in Materials and Methods. Results are means  $\pm$  SEM (n = 4). B, eosinophils (EOs) or neutrophils were incubated in the presence or absence of 10 mg/ml CHX and apoptosis was determined by cytology after 24 h at various neutrophil cell density. Results are means  $\pm$  SEM (n = 4).

**The pancaspase Z-VAD-FMK inhibitor reverses the ability of ZnO to induce the production of IL-1 $\beta$ , but not IL-8**

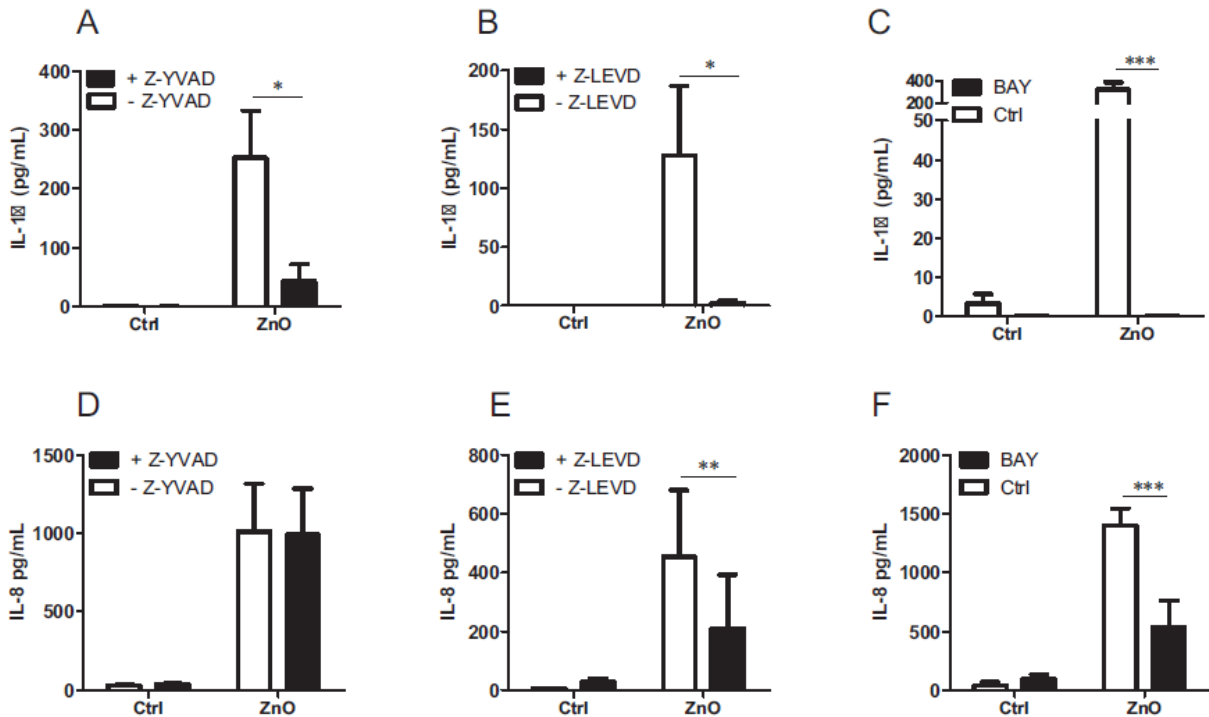
IL-8 and IL- $\beta$  are two important pro-inflammatory cytokines known to be produced by human eosinophils (Braun et al., 1993; Esnault et al., 2012). We next determined whether or not ZnO NPs increase the production of these two cytokines. As illustrated in Fig. 5, ZnO significantly increased the levels of IL-8 (Fig. 5A) and IL-1 $\beta$  (Fig. 5B) detected in the supernatants after 24 h of treatment. We next quantified the IL-1 $\beta$  and IL-8 release in the supernatants of eosinophils treated for 60 min with the pancaspase Z-VAD-FMK inhibitor prior incubation with ZnO. As illustrated in Fig. 5C, the ability of ZnO to increase the production of IL-1 $\beta$  was markedly and significantly inhibited by the pancaspase inhibitor. However, in contrast, the IL-8 production was not significantly affected by the same treatment (Fig. 5D).



**Fig. 5. Role of caspases in the ability of ZnO to induce the production of IL-1 $\beta$  and IL-8 in human eosinophils.** (A, B) eosinophils were incubated in the presence of buffer (Ctrl) or of the indicated concentrations of ZnO for 24 h and the supernatants were collected and used to measure the amount of IL-1 $\beta$  and IL-8 by ELISA as described in Materials and Methods. (C, D) cells were pre-incubated 1 h with the pan-caspase Z-VAD-FMK (+Z-VAD) inhibitor or its diluent (-Z-VAD) and buffer (Ctrl) or 100 mg/ml ZnO were added for a total period of time of 24 h and the supernatants were collected and used to measure the amount of IL-1 $\beta$  and IL-8 by ELISA Results are means  $\pm$  SEM (n = 5 for A,B or n  $\geq$  3 for C,D).

**The ZnO-induced production of both IL-1 $\beta$  and IL-8 is reversed by the caspase-1 inhibitor while the caspase-4 inhibitor reverses only the production of IL-1 $\beta$**

Given the importance of caspase-1 in the production of IL-1 $\beta$  (Man and Kanneganti, 2015), and since caspase-4 play important roles in the production of IL-1 $\beta$  by its ability to regulate caspase-1 in humans (Kajiwara et al., 2014), and that caspase-4 is expressed in human eosinophils (this report), we next verified the possibility that the IL-1 $\beta$  production produced by human eosinophils in response to ZnO could be dependent of caspase-1 and/or caspase-4. Fig. 6 shows that the ability of ZnO to induce the production of IL-1 $\beta$  was inhibited by caspase-1 (panel A) and by caspase-4 (panel B) inhibitors. However, the IL-8 production induced by ZnO was not inhibited by the caspase-1 inhibitor (panel D), whereas it was in the presence of the Z-LEVD-FMK caspase-4 inhibitor (panel E). As expected (Wu et al., 2010), inhibition of NF-kB by Bay 117085 reversed the ZnO-induced IL-8 production (panel C), but also that of IL-1 $\beta$  (panel F).



**Fig. 6. Effect of caspase-1 and caspase-4 inhibitors on the ZnO-induced production of IL-1 $\beta$  and IL-8 in human eosinophils.** Eosinophils were pre-incubated 1 h with (+) or without (-) the caspase-1 (Z-YVAD), caspase-4 (Z-LEVD) or NF-kB (BAY) inhibitors and buffer (Ctrl) or 100 mg/ml ZnO were added for a total period of time of 24 h. The concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-8 were measured by ELISA as described in Materials and Methods. Results are means  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ).

#### 4.2.6 Discussion

In this study, we present the first evidences that NPs, namely ZnO, can alter the biology of human eosinophils. The results of the DLS analysis indicate that the ZnO suspension is homogeneous when suspended in HBSS buffer but not in RPMI  $\pm$  FCS. However, we cannot conclude if the few (mega)aggregates (4% of the NP suspension) observed when ZnO NP are suspended in RPMI  $\pm$  FCS are responsible for the biological effects observed. It is important to remember that 96% of the ZnO NP are under 100 nm and are thus still considered as nanoparticles.

Indeed, we found that ZnO delay eosinophil apoptosis. These results are in contrast with the vast majority of studies investigating the cytotoxic effects of ZnO on cells others than eosinophils. For example, at concentrations of 10 and 50 mg/ml (identical to us), ZnO were found to have proapoptotic effects on rat subcutaneous adipose-derived mesenchymal stem cells (Orazizadeh et al., 2015), human pulmonary adenocarcinoma cell line LTEP-a-2 (Wang et al., 2015), rat astrocyte C6 glial cell line (Sruthi and Mohanan, 2015), human hepatocyte HepG2 cells (Sharma et al., 2012; Wahab et al., 2014) and human breast cancer MCF-7 cells (Wahab et al., 2014). However, in agreement with our present results, ZnO were found to inhibit apoptosis in isolated rat pancreatic islets (Shoae-Hagh et al., 2014) and, as we recently documented, also in primary human neutrophils (Goncalves and Girard, 2014). Although our results regarding the granularity determined by flow cytometry suggested that ZnO were not ingested by human eosinophils, we are aware that further experiments need to be performed to make any firm conclusion. Interestingly, although the major mechanism of ZnO-induced apoptosis in a variety of cells appears to be associated with the production of ROS (Akhtar et al., 2012; De Berardis et al., 2010; Wang et al., 2014), we found here in human eosinophils that ZnO do not induce ROS production. This is in agreement with Shoae- Hagh et al. (2014) reporting that ZnO even decrease ROS production, using the non-fluorescent compound DCFH-DA (20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate), a probe similar to CM-H2DCFDA that we used here as a general oxidative stress indicator. Also in agreement with our present results, we have previously reported that ZnO do not induce ROS production in human neutrophils (Goncalves and Girard, 2014). Since different proapoptotic agents are known to activate caspases, here we reasoned that inhibition of caspases with a general caspase inhibitor (Z-VAF-FMK) will reverse the antiapoptotic effect of ZnO in human eosinophils. In this study, we also demonstrate that these cells express caspase-4 at the protein level and that its inhibition also prevented the antiapoptotic effect of ZnO, opening the possibility that these NP alleviate a pre-existing ongoing ER stress- induced cell apoptotic machinery. In parallel, we also reported here that ZnO prevent the degradation of Bcl-xL, a crucial

player known to be involved in the antiapoptotic effect mediated by the cytokine IL-5 (and GM-CSF) (Dibbert et al., 1998). Therefore, our results indicate that the antiapoptotic properties of ZnO are complex as they involve caspase inactivation as well as they prevent Bcl-xL degradation.

To the best of our knowledge, this is the first study showing that human eosinophils can perform de novo protein synthesis, especially in response to NP. Even if our results indicate that ZnO increase the synthesis of neo-polypeptides, CHX is not suitable for investigating the role of de novo protein synthesis during apoptosis in human eosinophils, as opposed to human neutrophils. Indeed, CHX by itself was found to induce apoptosis in eosinophils but has no significant effect when used in human neutrophils at the same cell density of  $0.5 \times 10^6$  cells/ml. It is interesting to note that ZnO delay apoptosis and induce de novo protein synthesis in both cell types, but the profiles of proteins involved in these two situations remained to be determined. Thus, based on these two aspects (delay of apoptosis and induction of de novo protein synthesis) nanoparticles like ZnO can act similarly to other agents, including methyl mercuric chloride (Moisan et al., 2003), sodium butyrate (Stringer et al., 1996), or IL-4 cytokine (Girard et al., 1997). The fact that eosinophils undergoing spontaneous apoptosis (in absence of exogenous agents like ZnO in this study or IL-5) can synthesize new polypeptides fits well with a possible activation of an unfolding protein response following an ER stress, a situation when cells attempt to overcome apoptosis by producing several proteins, especially chaperones. However, other studies are needed to fully understand this and also to determine the mode of action of ZnO in human eosinophil apoptosis.

Herein, ZnO were also found to induce the production of both IL-1 $\beta$  and IL-8 in human eosinophils, two cytokines important in inflammation. Because of the increasing recognized roles of caspases in the production of cytokines, it was important to determine here if caspases are somewhat involved in ZnO-induced cytokine production. This was determined with the use of the pan caspase-inhibitor Z-VAD-FMK where the production of IL-1 $\beta$  and IL-8 was decreased drastically and weakly, respectively. Caspase-1 is among the caspases known to be inhibited by Z-VAD-FMK, and this caspase is of particular interest for its role during inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production (Man and Kanne-ganti, 2015). Caspase-4 is also inhibited by Z-VAD-FMK and is also somewhat involved in inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production (Vigano et al., 2015). Recently, caspase-4 was found to regulate caspase-1 activity in humans (Kajiwara et al., 2014) but, to the best of our knowledge, its role in human eosinophils has not been documented and its presence at the protein level had not been reported before the present study. Although there are some data regarding inflammasome activation in a murine model of ovalbumin-induced allergic airway inflammation where active caspase-1, and some inflammasome components, were



detected from mice tissue eosinophils (Tran et al., 2012), activation of inflammasome leading to the IL-1 $\beta$  production in human eosinophils is unknown. Therefore, our results showing that inhibition of caspase-4 by Z-LEVD-FMK leading to inhibition of ZnO-induced production of IL-1 $\beta$  are probably the first in this area. Furthermore, they are in agreement with the role of caspase-4 in regulating caspase-1 in humans, a process not observed in laboratory rodents (Kajiwara et al., 2014). Of note, using another type of NP, nanosilver, we previously documented that this same caspase-4 inhibitor was also able to reverse the nanosilver-induced IL-1 $\beta$  production in human neutrophils (Liz et al., 2015). Interestingly, our present results indicating that caspase-4 inhibitor can reverse the production of IL-8 but that caspase-1 inhibitor had no effect, suggest that caspase-4 is also involved in the production of IL-8 by human eosinophils, but the mechanism needs to be determined. However, in contrast, we previously demonstrated that arsenic trioxide-induced IL-8 production was not inhibited in the presence of Z-LEVD-FMK inhibitor in human neutrophils; it was even found to increase the effect of arsenic trioxide (Binet et al., 2011). Therefore, based on these results, it is tempting to speculate that caspase-4 possesses differential roles in human eosinophils and neutrophils. This remains to be elucidated. Interestingly, in one study, caspase-4-deficient human THP-1 cells were found to exhibit a marked reduction in the production of different cytokines, including not only IL-8, but also IL-1 $\beta$ , in response to LPS, indicating that this caspase is involved in cytokine production (Lakshmanan and Porter, 2007). Recently, we also reported that caspase-4 was involved in cytokine production since nanosilver-induced IL-1 $\beta$  cytokine production was reversed by the Z-LEVD-FMK inhibitor, as well as the caspase-1 activity (Liz et al., 2015). Knowing now that ZnO NPs can increase the production of IL-1 $\beta$  and IL-8 cytokines (this report), it will be important in future to determine if these NPs can increase the production of other cytokines and chemokines in order to better understand how they can affect not only the biology of human eosinophils but also other cells.

#### **4.2.7 Conclusion**

This is probably the first study showing that human eosinophils are cellular targets to nanoparticles, namely, ZnO. Also, we bring evidences that ZnO delay human eosinophil apoptosis by preventing caspase activation as well as caspase-4 and Bcl-xL degradation. This ability to delay eosinophil apoptosis has to be considered in terms of inflammatory potential. Indeed, increasing cell survival of eosinophils under certain circumstances could be deleterious for individuals. Therefore, the unique antiapoptotic activity of naked ZnO on human granulocytes, including eosinophils (this report) and neutrophils (Goncalves and Girard, 2014) has to be

considered, especially when the aim is to use ZnO as potential drug delivery agents for the development of new therapeutic strategies (Xiong, 2013; Zhang et al., 2013). Similarly, the capacity of ZnO to increase the production of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-8 by eosinophils should not be neglected.

#### **4.2.8 Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **4.2.9 Acknowledgement**

The study was supported by grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).

#### **4.2.10 References**

Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.M., Ahmad, J., Alrokayan, S.A., 2012. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int. J. Nanomed.* 7, 845–857.

Babin, K., Antoine, F., Goncalves, D.M., Girard, D., 2013. TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol. Lett.* 221, 57–63.

Barnes, P.J., 1996. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, S26–27.

Binet, F., Cavalli, H., Moisan, E., Girard, D., 2006. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br. J. Haematol.* 132, 349–358.

Binet, F., Chiasson, S., Girard, D., 2011. Interaction between arsenic trioxide (ATO) and human neutrophils. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 416–424.

Braun, R.K., Franchini, M., Erard, F., Rihs, S., De Vries, I.J., Blaser, K., Hansel, T.T., Walker, C., 1993. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.* 23, 956–960.

Chen, R., Huo, L., Shi, X., Bai, R., Zhang, Z., Zhao, Y., Chang, Y., Chen, C., 2014. Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. *ACS Nano* 8, 2562–2574.

De Berardis, B., Civitelli, G., Condello, M., Lista, P., Pozzi, R., Arancia, G., Meschini, S., 2010. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 116–127.

Dibbert, B., Daigle, I., Braun, D., Schranz, C., Weber, M., Blaser, K., Zangemeister-Wittke, U., Akbar, A.N., Simon, H.U., 1998. Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* 92, 778–783.

Druilhe, A., Letuve, S., Pretolani, M., 2003. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis* 8, 481–495.

Esnault, S., Kelly, E.A., Nettenstrom, L.M., Cook, E.B., Seroogy, C.M., Jarjour, N.N., 2012. Human eosinophils release IL-1ss and increase expression of IL-17A in activated CD4+ T lymphocytes. *Clin. Exp. Allergy* 42, 1756–1764.

Girard, D., Paquin, R., Beaulieu, A.D., 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.* 325 (Pt 1), 147–153.

Goncalves, D.M., Girard, D., 2014. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol. In Vitro* 28, 926–931.

Goncalves, D.M., Chiasson, S., Girard, D., 2010. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Toxicol. In Vitro* 24, 1002–1008.

Huang, K.L., Lee, Y.H., Chen, H.I., Liao, H.S., Chiang, B.L., Cheng, T.J., 2015. Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *J. Hazard. Mater.* 297, 304–312.

Ilmarinen, P., Kankaanranta, H., 2014. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114, 109–117.

Ilmarinen, P., Hasala, H., Sareila, O., Moilanen, E., Kankaanranta, H., 2009. Bacterial DNA delays human eosinophil apoptosis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22, 167–176.

Ilmarinen, P., Moilanen, E., Kankaanranta, H., 2014. Regulation of spontaneous eosinophil apoptosis—a neglected area of importance. *J. Cell Death* 7, 1–9.

Kajiwara, Y., Schiff, T., Voloudakis, G., Gama Sosa, M.A., Elder, G., Bozdagi, O., Buxbaum, J.D., 2014. A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J. Immunol.* 193, 335–343.

Kim, M.H., Seo, J.H., Kim, H.M., Jeong, H.J., 2014. Zinc oxide nanoparticles, a novel candidate for the treatment of allergic inflammatory diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 738, 31–39.

Kovacs, I., Horvath, M., Kovacs, T., Somogyi, K., Tretter, L., Geiszt, M., Petheo, G.L., 2014. Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. *Free Radic. Res.* 48, 1190–1199.

Lakshmanan, U., Porter, A.G., 2007. Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). *J. Immunol.* 179, 8480–8490.

Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H., Girard, D., 2005. *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br. J. Haematol.* 130, 527–535.

- Liz, R., Simard, J.C., Leonardi, L.B., Girard, D., 2015. Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *Int. Immunopharmacol.* 28, 616–625.
- Man, S.M., Kanneganti, T.D., 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* 265, 6–21. Moisan, E., Kouassi, E., Girard, D., 2003. Mechanisms involved in methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced suppression of human neutrophil apoptosis. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 629–637.
- Onoue, S., Yamada, S., Chan, H.K., 2014. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomed.* 9, 1025–1037.
- Orazizadeh, M., Khodadadi, A., Bayati, V., Saremy, S., Farasat, M., Khorsandi, L., 2015. In vitro toxic effects of zinc oxide nanoparticles on rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell J.* 17, 412–421.
- Poirier, M., Simard, J.C., Antoine, F., Girard, D., 2014. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J. Appl. Toxicol.* 34, 404–412.
- Roy, R., Kumar, S., Verma, A.K., Sharma, A., Chaudhari, B.P., Tripathi, A., Das, M., Dwivedi, P.D., 2013. Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a Th2 response in Balb/c mice. *Int. Immunol.* 13, 13.
- Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83. Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A., 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* 17, 852–870.
- Shoae-Hagh, P., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Baeeri, M., Gholami, M., Mohammadirad, A., Abdollahi, M., 2014. Zinc oxide nanoparticles reduce apoptosis and oxidative stress values in isolated rat pancreatic islets. *Biol. Trace Elem. Res.* 162, 262–269.
- Simard, J.C., Simon, M.M., Tessier, P.A., Girard, D., 2011. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J. Immunol.* 186, 3622–3631.
- Song, W., Zhang, J., Guo, J., Ding, F., Li, L., Sun, Z., 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 199, 389–397.
- Sruthi, S., Mohanan, P.V., 2015. Investigation on cellular interactions of astrocytes with zinc oxide nanoparticles using rat C6 cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 133, 1–11.
- L.R. Silva, D. Girard / *Toxicology Letters* 259 (2016) 11–20 19 Stringer,  
R.E., Hart, C.A., Edwards, S.W., 1996. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.* 92, 169–175.
- Suzuki, H., Toyooka, T., Ibuki, Y., 2007. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3018–3024.

Szelenyi, I., 2012. Nanomedicine: evolutionary and revolutionary developments in the treatment of certain inflammatory diseases. *Inflamm. Res.* 61, 1–9.

Tai, P.C., Sun, L., Spry, C.J., 1991. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 312–316.

Tran, H.B., Lewis, M.D., Tan, L.W., Lester, S.E., Baker, L.M., Ng, J., Hamilton-Bruce, M. A., Hill, C.L., Koblar, S.A., Rischmueller, M., Ruffin, R.E., Wormald, P.J., Zalewski, P. D., Lang, C.J., 2012. Immunolocalization of NLRP3 inflammasome in normal murine airway epithelium and changes following induction of ovalbumin-induced airway inflammation. *J. Allergy* 2012, 819176.

Vigano, E., Diamond, C.E., Spreafico, R., Balachander, A., Sobota, R.M., Mortellaro, A., 2015. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat. Commun.* 6, 876.

Wahab, R., Siddiqui, M.A., Saquib, Q., Dwivedi, S., Ahmad, J., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., Shin, H.S., 2014. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 267–276.

Wang, J., Deng, X., Zhang, F., Chen, D., Ding, W., 2014. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 117.

Wang, C., Hu, X., Gao, Y., Ji, Y., 2015. ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTP-a-2Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 423287.

Wong, C.K., Dong, J., Lam, C.W., 2014. Molecular mechanisms regulating the synergism between IL-32 gamma and NOD for the activation of eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* 95, 631–642.

Wu, W., Samet, J.M., Peden, D.B., Bromberg, P.A., 2010. Phosphorylation of p65 is required for zinc oxide nanoparticle-induced interleukin 8 expression in human bronchial epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* 118, 982–987.

Xiong, H.M., 2013. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Adv. Mater. (Deerfield Beach, Fla.)* 25, 5329–5335.

Zhang, Y., Nayak, T.R., Hong, H., Cai, W., 2013. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials. *Curr. Mol. Med.* 13, 1633–1645.

## CHAPITRE 5: DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce projet avait pour but de déterminer si les NPs ZnO sont en mesure de moduler directement les fonctions des éosinophiles humains. Pour ce faire, nous avons étudié leur effet sur six fonctions cellulaires principales soit : la morphologie, la production d'espèces réactives de l'oxygène, la viabilité cellulaire, la synthèse *de novo* de protéines, l'activité gélatinase et la libération de cytokines. Nos résultats ont permis de démontrer que les NPs ZnO sont des agonistes des éosinophiles humains, capables de moduler certaines de leurs fonctions. Cependant, alors que nous nous attendions à des effets semblables entre les éosinophiles et les neutrophiles, nous avons plutôt remarqué que certaines fonctions modulées chez les neutrophiles ne l'étaient pas chez les éosinophiles. Les travaux menés par Roy et collaborateurs indiquent que le niveau d'apoptose induit par les NPs ZnO est variable selon le type cellulaire à l'étude (R. Roy *et al.*, 2015). Cependant, les travaux de notre laboratoire démontrent que les NPs ZnO ne sont pas uniquement proapoptotiques; celles-ci retardent l'apoptose spontanée des neutrophiles humains *in vitro* (Goncalves *et al.*, 2014). Tout comme Roy et collaborateurs, nous considérons qu'il est important d'étudier les effets des NPs sur plusieurs types cellulaires, car la modélisation du mode d'action de ces nouveaux agonistes sur l'organisme à partir de la simple extrapolation des effets observés chez un nombre limité de modèles d'étude est insuffisante.

Les nanoparticules sont des matériaux nanométriques ayant des propriétés physicochimiques distinctes à celles du matériau équivalent non nanométrique. Celles-ci sont principalement associées à leur petite taille et à leur grand ratio aire de surface sur volume. Or, le comportement des NPs en solution est dépendant des caractéristiques du milieu. En effet, des facteurs tels que le pH, la température, la composition ionique peuvent avoir une influence sur leur stabilité ou sur leur tendance à s'agglomérer. Alors, lors des tests *in vitro*, il est important de les caractériser dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des expériences. Les NPs ZnO utilisées dans nos expériences mesuraient moins de 20 nm selon le fournisseur. Lorsque nous les avons caractérisées dans la solution tampon HBSS elles avaient plutôt une taille moyenne de 2.9 nm. De plus, dans le milieu de culture RPMI supplémenté de sérum bovin fœtal, les NPs avaient tendance à s'agglomérer. Ainsi, la solution comportait une majorité d'agglomérats de 61.9 nm et en proportion moindre des NPs de 11.6 nm. La caractérisation des NPs a aussi compris l'évaluation de leur charge de surface via la mesure de leur potentiel zêta. Contrairement à leur taille, celui-ci est demeuré sensiblement le même dans les deux milieux utilisés. Ainsi, la charge

ionique du tampon ou la présence de protéines n'influenceraient pas significativement le rayon hydrodynamique des NPs ZnO en solution.

Tout comme les neutrophiles, les éosinophiles sont des cellules possédant une capacité à se mouvoir par chimiotactisme. Pour ce faire, ils comptent sur un cytosquelette ayant une plasticité remarquable, leur permettant de changer de forme drastiquement selon les conditions. L'utilisation de la cytométrie en flux pour suivre le remodelage du cytosquelette et les changements morphologiques des éosinophiles induits par des agonistes tels que les agents chemoattractants est une méthode courante. Celle-ci a été mise à profit par divers groupes pour démontrer, par exemple, que la prostaglandine ou l'histamine activent et modulent le chimiotactisme des éosinophiles (Heinemann *et al.*, 2003, Schratl *et al.*, 2007). Notre laboratoire a utilisé la cytométrie en flux et la microscopie optique pour démontrer que les NPs ZnO induisent des changements morphologiques des neutrophiles (Goncalves *et al.*, 2014). Ainsi, nous nous attendions à observer des résultats similaires pour les éosinophiles. Cependant, il n'y a pas eu d'évidence d'induction de changements morphologiques par les NPs ZnO après des stimulations allant de 30 minutes jusqu'à 48 heures. Il n'est pas anormal que les observations au sein des deux granulocytes soient différentes car, malgré leur ressemblance, ils portent tout de même des récepteurs de surface et des molécules régulatrices différents et ils répondent différemment aux stimuli chemoattractants. Par exemple, une étude classique a mis en évidence des différences significatives entre les réponses des neutrophiles et des éosinophiles à des peptides chimiotactiques. Ainsi, la libération d'enzymes lysosomales induite par la même concentration du peptide fMLF passe de 42 % chez les neutrophiles à 2 % chez les éosinophiles (Ogawa *et al.*, 1981).

La grande majorité des études concernant les effets des NPs ZnO sur les cellules soulignent leur capacité à induire la production de ROS intracellulaires. Des études menées sur des cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les monocytes/macrophages ont par ailleurs démontré que cette accumulation de ROS serait à la base des effets cytotoxiques des NPs ZnO (Hanley *et al.*, 2009). Or, notre laboratoire a démontré que celles-ci ne sont pas en mesure de déclencher une flambée oxydative chez les neutrophiles (Goncalves *et al.*, 2014). Ainsi, l'apparition d'un stress oxydatif à la suite d'une interaction avec ces NPs ne serait pas un mécanisme ubiquitaire. Nous avons ici démontré que les NPs ZnO n'induisent pas la production de ROS par les éosinophiles et qu'elles n'exacerbent pas celle générée par le PMA. Des études précédentes ont démontré que les populations cellulaires composant les PBMC ont des sensibilités distinctes aux NPs ZnO (Hanley *et al.*, 2009). Celle-ci serait dépendante de la tendance des cellules à les capter.

Par exemple, des concentrations faibles de ZnO NPs peuvent déclencher une flambée oxydative chez les monocytes, alors que des concentrations plus élevées seraient nécessaires pour en déclencher une chez les lymphocytes. Donc, tout comme pour les lymphocytes par rapport aux monocytes, il se pourrait que les éosinophiles aient une faible capacité de captation des NPs ZnO et que les concentrations utilisées lors de nos expériences aient été au-deçà du seuil nécessaire au déclenchement de leur flambée oxydative. Par ailleurs, la production de ROS par les éosinophiles activés ou provenant de patients asthmatiques, en réponse à d'agonistes classiques, est exacerbée (Sannohe *et al.*, 2003). Cependant, dans nos conditions expérimentales, les NPs ZnO n'activent pas suffisamment les éosinophiles pour moduler à la hausse les ROS produits en réponse au PMA. Il aurait ensuite été intéressant de vérifier si leur activation avec l'IL-5 ou le GM-CSF avant un traitement avec les NPs ZnO aurait été suffisante à l'induction de l'éclat oxydatif.

La majorité de la littérature concernant les effets des NPs ZnO souligne leurs effets cytotoxiques. Celles-ci induisent la mort cellulaire d'une grande variété de cellules, dont la plupart des cellules immunitaires et celle des cellules de l'épithélium pulmonaire, par un processus dépendant des ROS. Cependant, notre laboratoire a démontré qu'elles induisent plutôt un retard de l'apoptose spontanée des neutrophiles (Goncalves *et al.*, 2014). Considérant que les NPs ZnO n'ont pas induit la production de ROS par les éosinophiles dans nos conditions expérimentales, nous ne nous attendions pas d'y remarquer l'induction de leur apoptose. Plutôt, aux mêmes concentrations que chez les neutrophiles, nous avons remarqué un retard de leur apoptose spontanée. Les éosinophiles sont des cellules au renouvellement rapide dont le programme proapoptotique est induit par défaut. Cependant, leur survie est rallongée par divers médiateurs solubles, dont des cytokines, des hormones ou des ligands des TLR. Alors, il serait possible que dans nos conditions la concentration de NPs ZnO soit suffisante à l'induction d'une cascade de signalisation changeant la programmation cellulaire vers des conditions anti-apoptotiques, sans qu'elle atteigne le seuil suffisant à l'induction d'un stress oxydatif.

Des études menées sur les neutrophiles ont mis en évidence leur synthèse protéique active, inductible par divers médiateurs solubles. Par exemple, l'IL-4 et l'IL-15 sont des cytokines capables de retarder leur apoptose spontanée via la synthèse *de novo* de protéines. (Bouchard *et al.*, 2004, Girard *et al.*, 1997) Notre laboratoire a démontré que les NPs ZnO font partie des médiateurs retardant l'apoptose des neutrophiles via un procédé dépendant de la synthèse *de novo* de protéines (Goncalves *et al.*, 2014). Nous démontrons ici leur capacité d'induire la synthèse *de novo* de protéines également chez les éosinophiles. Au meilleur de nos



connaissances, notre étude est la première ayant effectué un marquage métabolique des éosinophiles, permettant de visualiser les polypeptides nouvellement produits en réponse à un stimulus sur un film radiographique. Ainsi, nous contribuons à la documentation de la capacité des éosinophiles matures d'avoir une synthèse protéique active, alors que traditionnellement il est considéré que ce sont des cellules ayant effectué l'essentiel de leur synthèse protéique au niveau de la moelle osseuse. Malheureusement, il nous a été impossible de déterminer si le retard de l'apoptose des éosinophiles induite par les NPs ZnO est dépendant de la synthèse *de novo* de protéines. En effet, la dose minimale d'inhibiteur (cycloheximide) nécessaire à l'arrêt de la synthèse de protéines induit l'apoptose des éosinophiles. Il sera donc important de trouver un autre inhibiteur moins toxique afin de démontrer un lien causal entre la synthèse *de novo* de protéines et le retard de l'apoptose induits par les NPs ZnO. De plus, il serait intéressant d'investiguer si le fait que les éosinophiles sont plus sensibles que les neutrophiles à l'inhibiteur de la synthèse protéique est le reflet de programmations apoptotiques distinctes. Ainsi, les éosinophiles auraient une programmation proapoptotique plus robuste et leur survie nécessiterait la synthèse constante de protéines anti-apoptotiques. D'un autre côté, l'apoptose spontanée rapide des neutrophiles serait indépendante (ou très faiblement dépendante) de la synthèse de protéines (Bouchard *et al.*, 2004, Girard *et al.*, 1997, Goncalves *et al.*, 2014).

Les éosinophiles libèrent une variété de médiateurs solubles dans leur environnement en réponse à des stimuli spécifiques. Dans le cadre de notre recherche, nous avons examiné l'effet des NPs ZnO sur la libération de gélatinases ou des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-8. Les gélatinases, dont la MMP9, sont des protéinases capables de dégrader la matrice interstitielle. Cette propriété en ferait des effecteurs importants lors des processus de remodelage tissulaire et lors de l'infiltration de cellules immunitaires associée aux réactions inflammatoires. Diverses études ont mis en évidence une accumulation de MMP9 au niveau des voies respiratoires de patients asthmatiques. Celle-ci est par ailleurs corrélée avec une présence accrue d'éosinophiles et de neutrophiles dans le sputum des patients. Cependant, même si des évidences au niveau de l'ARNm ont démontré que les éosinophiles de patients asthmatiques possèdent des niveaux de MMP9 plus élevés que ceux des volontaires sains, certains auraient démontré que les neutrophiles en sont la source la plus importante (Jehan *et al.*, 2013, Ohno *et al.*, 1997, Ventura *et al.*, 2014). Des recherches menées dans notre laboratoire ont mis en évidence une libération de MMP9 dans le surnageant de culture de neutrophiles stimulés avec les NPs ZnO, accompagnée par une modulation à la hausse de son activité gélatinasique (Babin *et al.*, 2013). Cependant, nous n'avons pas eu d'évidence ni de la dégranulation ni de la modulation de l'activité enzymatique de la MMP9 chez les éosinophiles. Il est connu que la libération de MMP9 en réponse à des agonistes classiques

tels que le PMA est bien plus faible chez les éosinophiles, comparativement aux neutrophiles (Fujisawa *et al.*, 1999). Ainsi, si un puissant activateur tel que le PMA n'induit qu'une faible dégranulation, il n'est pas anormal que les signaux activateurs induits par les NPs ZnO puissent être insuffisants à l'initiation du processus de dégranulation de MMP9. Alors, il serait intéressant de compléter cette caractérisation en déterminant si la dégranulation des quatre protéines granulaires éosinophiliques majeures (MBP, ECP, EDN, EPO) est, quant à elle, modulée par les NPs ZnO. À ce jour, des données préliminaires démontreraient que celles-ci n'auraient pas d'effet sur la dégranulation d'EPO (Fujisawa *et al.*, 1999, Jehan *et al.*, 2013, Ohno *et al.*, 1997, Ventura *et al.*, 2014).

Alors que les NPs ZnO ne semblaient pas influencer l'activité gélatinase des éosinophiles humains, nous avons démontré qu'elles induiraient leur libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8. L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Sa synthèse, régulée par le NF- $\kappa$ B, produit une pro-protéine activable via clivage protéolytique par la caspase-1 (Cogswell *et al.*, 1994). Elle serait notamment impliquée dans la régulation à la hausse de la libération d'IL-17 par des lymphocytes T (Esnault *et al.*, 2012). Elle contribuerait aussi aux réponses immunitaires homéostatiques au niveau de l'intestin grêle (Jung *et al.*, 2015). Pour sa part, l'IL-8 est un des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire. Il active les neutrophiles en plus d'agir en tant qu'agent chimiotactique pour les neutrophiles, les basophiles et les lymphocytes T. Tout comme pour l'IL-1 $\beta$ , sa synthèse est régulée par le NF- $\kappa$ B (Brat *et al.*, 2005, Hoffmann *et al.*, 2002). De plus, sa pleine activité pro-inflammatoire est dépendante d'un clivage protéolytique sur sa portion N-terminale. Son niveau est élevé dans le fluide de lavage broncho-alvéolaire et chez les éosinophiles de patients asthmatiques (Yousefi *et al.*, 1995). Sa libération chez les éosinophiles est classiquement induite, après activation avec du GM-CSF, par la stimulation avec du RANTES, du PAF ou du PMA. En somme, la stimulation des éosinophiles humains avec les NPs ZnO induit la libération de cytokines pro-inflammatoires pouvant être impliquées dans le recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi que dans la modulation de l'environnement inflammatoire.

La caspase-1 active est au cœur du complexe protéique dénommé inflammasome. Celui-ci est essentiel à l'activation du pro-IL-1 $\beta$  (Sollberger *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré que la caspase-4 interagirait physiquement avec la caspase-1, qu'elle procéderait à son activation et qu'elle contribuerait à l'activation du pro-IL-1 $\beta$  en réponse au LPS (Sollberger *et al.*, 2012). L'expression de la caspase-4 est aussi nécessaire à l'activation de l'inflammasome chez un modèle de macrophages (Vigano *et al.*, 2015). De plus, notre laboratoire a démontré que la

caspase-4 est nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la libération d'IL-1 $\beta$  ayant lieu chez un modèle de monocytes humains activés avec le LPS puis stimulés avec des NPs d'argent de 15 nm (Simard *et al.*, 2015). Enfin, la caspase-4 est nécessaire à la production d'IL-8 NF- $\kappa$ B-dépendante en réponse au LPS chez un modèle de monocytes humains (Lakshmanan *et al.*, 2007). Nous avons ici procédé à une des premières caractérisations de l'implication des caspases dans la libération de cytokines par les éosinophiles humains. L'utilisation de l'inhibiteur ubiquitaire des caspases a, logiquement, renversé la libération d'IL-1 $\beta$  par les éosinophiles induite par les NPs ZnO. Or, il a aussi renversé la libération d'IL-8, mettant en évidence l'implication des caspases dans la libération de ces deux cytokines pro-inflammatoires. Ensuite, alors que l'inhibiteur spécifique de la caspase-1 n'a renversé que la libération d'IL-1 $\beta$ , l'inhibiteur de la caspase-4 a, pour sa part, renversé la libération des deux cytokines à l'étude. Cela serait compatible avec les études proposant que la caspase-1 serait en aval de la caspase-4 et confirmerait, chez les éosinophiles la participation de cette dernière dans la production d'IL-1 $\beta$  biologiquement actif. Enfin, nous confirmons ici l'implication de la caspase-4 dans la libération d'IL-8 induite par les NPs ZnO chez les éosinophiles. Considérant l'implication de NF- $\kappa$ B dans la production de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-8, il aurait été intéressant de démontrer formellement la capacité des NPs ZnO d'induire la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau et de déterminer les voies de signalisation cellulaire associées.

En conclusion, les résultats obtenus lors de ce projet de recherche ont permis de démontrer que les NPs sont des agonistes directs des éosinophiles humains. Tout comme il avait été montré chez les neutrophiles humains, les NPs ZnO induisent une programmation pro-inflammatoire chez les éosinophiles. En effet, certaines fonctions cellulaires ont été modulées de la même façon chez ces deux granulocytes (retard de l'apoptose spontanée et induction de la synthèse *de novo* de protéines). Par contre, certaines des fonctions modulées chez les neutrophiles ne l'ont pas été chez les éosinophiles (aucune induction de changements morphologiques et aucune évidence de libération de gélatinases). Cela met en évidence des différences fondamentales, totalement justifiées, dans la signalisation de ces deux cellules. Il faut se rappeler que les éosinophiles possèdent des fonctions bien spécifiques devant être précisément régulées. Ainsi, il sera important de les tenir en compte lors des futures études toxicologiques tentant d'évaluer l'impact de xénobiotiques sur l'organisme. Par ailleurs, tel que notre laboratoire l'a démontré chez les neutrophiles humains et comme d'autres l'ont aussi mis en évidence avec chez d'autres modèles cellulaires, les différents types de NPs ont des effets distincts selon le type cellulaire. Il est donc difficile d'extrapoler les résultats obtenus chez un modèle cellulaire à un organisme complexe. Alors, le présent projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche ayant

pour objectif de déterminer les effets d'un large éventail de NPs sur les fonctions du système immunitaire *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats contribueront à l'établissement d'un classement relatif de la toxicité de chaque NP. Car, c'est en en décelant les plus toxiques et en comprenant les mécanismes associés à leur toxicité, qu'il sera possible de bien gérer les risques leur étant associés et de les réglementer en conséquence,

## RÉFÉRENCES

- Acharya KR & Ackerman SJ (2014) Eosinophil granule proteins: form and function. *The Journal of biological chemistry* 289(25):17406-17415.
- Acherman S & Du J (2013) Chapter 5 - Eosinophilopoiesis. *Eosinophils in Health and Disease*, Rosenberg JILF (Édit.) Academic Press, Boston <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394385-9.00005-5>. p 73-119.
- Aderem A & Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797):782-787.
- Ahlstrom-Emanuelsson CA, Greiff L, Andersson M, Persson CG & Erjefalt JS (2004) Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. *The European respiratory journal* 24(5):750-757.
- Aitken RC, KS.; Tran, CL. (2004) Nanoparticles: An occupational hygiene review. (Institute of Occupational Medicine), p 102.
- Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA & Hull M (2006) Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine* 56(5):300-306.
- Akdis CA (2012) Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med* 18(5):736-749.
- Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Aldridge AJ (2002) Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 168(4):204-214.
- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK & Farokhzad OC (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* 5(4):505-515.
- Almeida JP, Chen AL, Foster A & Drezek R (2011) In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 6(5):815-835.
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.
- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP & Valiyaveetil S (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3(2):279-290.
- Aust SD, Morehouse LA & Thomas CE (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med* 1(1):3-25.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F & Coglianò V (2006) Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *The Lancet. Oncology* 7(4):295-296.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicology letters* 221(1):57-63.

- Babin K, Goncalves DM & Girard D (2015) Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. *Biochimica et biophysica acta* 10.1016/j.bbagen.2015.08.006.
- Bandeira-Melo C & Weller PF (2005) Mechanisms of eosinophil cytokine release. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100:73-81.
- Barnes PJ (1990) Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 9(3):235-243.
- Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, Speers DM, Stewart JC, Frampton MW, Utell MJ, Huang LS, Cox C, Zareba W & Oberdorster G (2005) Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med* 171(10):1129-1135.
- Becler K, Hakansson L & Rak S (2002) Treatment of asthmatic patients with a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist montelukast (Singulair), decreases the eosinophil survival-enhancing activity produced by peripheral blood mononuclear leukocytes in vitro. *Allergy* 57(11):1021-1028.
- Bell A (1957) THE MORPHOLOGY OF HUMAN BLOOD CELLS. *California Medicine* 86(2):144.
- Berry CE & Hare JM (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555(Pt 3):589-606.
- Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, Bradding P, Wardlaw AJ & Pavord ID (2007) Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax* 62(12):1043-1049.
- Beutler B (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40(12):845-859.
- Biswas P & Wu CY (2005) Nanoparticles and the environment. *J Air Waste Manag Assoc* 55(6):708-746.
- Blumenthal RD, Samoszuk M, Taylor AP, Brown G, Alisauskas R & Goldenberg DM (2000) Degranulating eosinophils in human endometriosis. *Am J Pathol* 156(5):1581-1588.
- Boatright KM & Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15(6):725-731.
- Boonruksa P, Bello D, Zhang J, Isaacs JA, Mead JL & Woskie SR (2015) Characterization of Potential Exposures to Nanoparticles and Fibers during Manufacturing and Recycling of Carbon Nanotube Reinforced Polypropylene Composites. *Ann Occup Hyg* 10.1093/annhyg/mev073.
- Bordea C, Latifaj B & Jaffe W (2009) Delayed presentation of tattoo lymphadenopathy mimicking malignant melanoma lymphadenopathy. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62(8):e283-285.
- Bouchard A, Rathé C & Girard D (2004) Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *Journal of Leukocyte Biology* 75(5):893-900.
- Bozza PT, Melo RC & Bandeira-Melo C (2007) Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 113(1):30-49.

- Bozza PT, Payne JL, Goulet JL & Weller PF (1996) Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med* 183(4):1515-1525.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM & Weller PF (1997) Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. *J Exp Med* 186(6):909-920.
- Brat DJ, Bellail AC & Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7(2):122-133.
- Brightling CE (2011) Eosinophils, bronchitis and asthma: pathogenesis of cough and airflow obstruction. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24(3):324-327.
- Brottman GM, Regelman WE, Slungaard A & Wangenstein OD (1996) Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr Pulmonol* 21(3):159-166.
- Bystrom J, Amin K & Bishop-Bailey D (2011) Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res* 12(1):10.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2):S3-S23.
- Chen Y, Li D, Tsang JY, Niu N, Peng J, Zhu J, Hui K, Xu A, Lui VC, Lamb JR & Tam PK (2011) PPAR-gamma signaling and IL-5 inhibition together prevent chronic rejection of MHC Class II-mismatched cardiac grafts. *J Heart Lung Transplant* 30(6):698-706.
- Cheung PF, Wong CK & Lam CW (2008) Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 180(8):5625-5635.
- Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho HY, Han BS, Kim SH, Kim HO, Lim YT, Chung BH & Jeong J (2009) Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 236(1):16-24.
- Cho WS, Duffin R, Poland CA, Duschl A, Oostingh GJ, Macnee W, Bradley M, Megson IL & Donaldson K (2012) Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology* 6(1):22-35.
- Chovatiya R & Medzhitov R (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell* 54(2):281-288.
- Chu VT, Frohlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Lohning M & Berek C (2011) Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 12(2):151-159.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF & Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133(1):157-165.

- Clogston J & Patri A (2011) Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, (Methods in Molecular Biology, Mcneil SE (Édit.) Humana Press, Vol 697. p 63-70.
- Closa D & Folch-Puy E (2004) Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 56(4):185-191.
- Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP & Gray JG (1994) NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* 153(2):712-723.
- Costello RW, Jacoby DB & Fryer AD (1998) Pulmonary neuronal M2 muscarinic receptor function in asthma and animal models of hyperreactivity. *Thorax* 53(7):613-616.
- Crawford ED & Wells JA (2011) Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* 80:1055-1087.
- Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA & Ribatti D (2003) Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274(1):778-784.
- Cromvik J, Johnsson M, Vaht K, Johansson JE & Wennerås C (2014) Eosinophils in the blood of hematopoietic stem cell transplanted patients are activated and have different molecular marker profiles in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immun Inflamm Dis* 2(2):99-113.
- Dallaire MJ, Ferland C, Page N, Lavigne S, Davoine F & Laviolette M (2003) Endothelial cells modulate eosinophil surface markers and mediator release. *The European respiratory journal* 21(6):918-924.
- Davoine F & Lacy P (2014) Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity. *Frontiers in immunology* 5.
- DeChatelet LR, Migler RA, Shirley PS, Muss HB, Szejda P & Bass DA (1978) Comparison of intracellular bactericidal activities of human neutrophils and eosinophils. *Blood* 52(3):609-617.
- DeLeo FR & Quinn MT (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 60(6):677-691.
- Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D & Minchin RF (2009) Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20(45):455101.
- Dent LA, Daly CM, Mayrhofer G, Zimmerman T, Hallett A, Bignold LP, Creaney J & Parsons JC (1999) Interleukin-5 Transgenic Mice Show Enhanced Resistance to Primary Infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but Not Primary Infections with *Toxocara canis*. *Infect Immun* 67(2):989-993.
- Dent LA, Strath M, Mellor AL & Sanderson CJ (1990) Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *The Journal of experimental medicine* 172(5):1425-1431.
- Dewson G, Cohen GM & Wardlaw AJ (2001) Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils. *Blood* 98(7):2239-2247.



- Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S & Poma A (2011) Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res* 722(1):20-31.
- Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, Zangemeister-Wittke U, Akbar AN & Simon HU (1998) Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* 92(3):778-783.
- Djurišić AB, Leung YH, Ng AMC, Xu XY, Lee PKH, Degger N & Wu RSS (2015) Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts. *Small* 11(1):26-44.
- Donaldson K, Stone V, Gilmour PS, Brown DM & MacNee W (2000) Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 358(1775):2741-2749.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W & Borm PJ (2004) Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61(9):727-728.
- Donaldson K & Tran CL (2002) INFLAMMATION CAUSED BY PARTICLES AND FIBERS. *Inhalation Toxicology* 14(1):5-27.
- Driss V, Legrand F, Hermann E, Loiseau S, Guerardel Y, Kremer L, Adam E, Woerly G, Dombrowicz D & Capron M (2009) TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins. *Blood* 113(14):3235-3244.
- Druilhe A, Letuve S & Pretolani M (2003) Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8(5):481-495.
- Dvorak AM & Weller PF (2000) Ultrastructural analysis of human eosinophils. *Chem Immunol* 76:1-28.
- Dyer KD, Percopo CM, Xie Z, Yang Z, Kim JD, Davoine F, Lacy P, Druey KM, Moqbel R & Rosenberg HF (2010) Mouse and Human Eosinophils Degranulate in Response to Platelet-Activating Factor (PAF) and LysoPAF via a PAF-Receptor-Independent Mechanism: Evidence for a Novel Receptor. *The Journal of Immunology* 184(11):6327-6334.
- El-Shazly A, Yamaguchi N, Masuyama K, Suda T & Ishikawa T (1999) Novel Association of the Src Family Kinases, Hck and c-Fgr, with CCR3 Receptor Stimulation: A Possible Mechanism for Eotaxin-Induced Human Eosinophil Chemotaxis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264(1):163-170.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.
- Elovic A, Wong DTW, Weller PF, Matossian K & Galli SJ (1994) Expression of transforming growth factors- $\alpha$  and  $\beta$ 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93(5):864-869.
- EPA-Nanotechnology-White-Paper (2007) *Nanotechnology White paper*. 120 p

- Erjefält JS, Greiff L, Andersson M, Ädelroth E, Jeffery PK & Persson CGA (2001) Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56(5):341-344.
- Esnault S, Kelly EA, Nettenstrom LM, Cook EB, Seroogy CM & Jarjour NN (2012) Human eosinophils release IL-1ss and increase expression of IL-17A in activated CD4+ T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 42(12):1756-1764.
- Esnault S & Malter JS (2002) Extracellular signal-regulated kinase mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA stabilization in tumor necrosis factor-alpha plus fibronectin-activated peripheral blood eosinophils. *Blood* 99(11):4048-4052.
- Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ & Appleton JA (2009) Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol* 182(3):1577-1583.
- Ferreira MAR (2003) Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies. *Mediators Inflamm* 12(5):259-267.
- Filley TR.; Ahn MH, BW.; Blanchette, RA. (2005) Investigations of Fungal Mediated (C60-C70) Fullerene Decomposition. . *ACS National Meeting*. American Chemical Society, p 446-450.
- Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology* 15(2):247-254.
- Fraker PJ & King LE (2004) REPROGRAMMING OF THE IMMUNE SYSTEM DURING ZINC DEFICIENCY. *Annual Review of Nutrition* 24(1):277-298.
- Fujisawa T, Kato Y, Terada A, Iguchi K & Kamiya H (1999) Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 120 Suppl 1:65-69.
- Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM & Orkin SH (2004) Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood* 103(2):583-585.
- Fulda S & Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25(34):4798-4811.
- Fulkerson PC & Rothenberg ME (2013) Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nature reviews. Drug discovery* 12(2):117-129.
- Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, Doepker MP, Kavanaugh JL, Mishra A, Witte DP, Zhang H, Farber JM, Yang M, Foster PS & Rothenberg ME (2004) Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-gamma (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):1987-1992.
- Furuta GT, Atkins FD, Lee NA & Lee JJ (2014) Changing roles of eosinophils in health and disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 113(1):3-8.
- Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S & Capron M (2012) Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother* 61(9):1527-1534.

- Gebel T, Foth H, Damm G, Freyberger A, Kramer PJ, Lilienblum W, Rohl C, Schupp T, Weiss C, Wollin KM & Hengstler JG (2014) Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Arch Toxicol* 88(12):2191-2211.
- Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ & Appleton JA (2012) Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. *J Immunol* 188(1):417-425.
- Geering B, Stoeckle C, Conus S & Simon HU (2013) Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology* 34(8):398-409.
- Gervais FG, Cruz RP, Chateauneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM & O'Neill G P (2001) Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108(6):982-988.
- Girard D (2014) Using the air pouch model for assessing in vivo inflammatory activity of nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9:1105-1109.
- Girard D, Paquin R & Beaulieu AD (1997) Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325(Pt 1):147-153.
- Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM & Barakat AI (2007) Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* 115(3):403-409.
- Goldman M, Le Moine A, Braun M, Flamand V & Abramowicz D (2001) A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends in immunology* 22(5):247-251.
- Gonçalves D (2015) *Caractérisation des propriétés inflammatoires et des effets sur le neutrophile de nanoparticules de type oxyde-métal et des fullerenols*. Philosophiae Doctor Biologie (Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier). 176 p
- Goncalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *International immunopharmacology* 11(8):1109-1115.
- Goncalves DM & Girard D (2013) Evidence that polyhydroxylated C60 fullerenes (fullerenols) amplify the effect of lipopolysaccharides to induce rapid leukocyte infiltration in vivo. *Chem Res Toxicol* 26(12):1884-1892.
- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28(5):926-931.
- Gonçalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *International immunopharmacology* 11(8):1109-1115.
- Gopee NV, Roberts DW, Webb P, Cozart CR, Siitonen PH, Warbritton AR, Yu WW, Colvin VL, Walker NJ & Howard PC (2007) Migration of Intradermally Injected Quantum Dots to Sentinel Organs in Mice. *Toxicol Sci* 98(1):249-257.

- Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP & Capron M (1994) High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367(6459):183-186.
- Hafez I, Stolpe A & Lindau M (2003) Compound Exocytosis and Cumulative Fusion in Eosinophils. *Journal of Biological Chemistry* 278(45):44921-44928.
- Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, Marshall RP, Bradding P, Green RH, Wardlaw AJ & Pavord ID (2009) Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine* 360(10):973-984.
- Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang J & Wingett DG (2009) The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction. *Nanoscale Res Lett* 4(12):1409-1420.
- Hannah W & Thompson PB (2008) Nanotechnology, risk and the environment: a review. *Journal of environmental monitoring : JEM* 10(3):291-300.
- Hara J, Fujimura M, Myou S, Kita T, Abo M, Katayama N, Furusho S, Nobata K, Oribe Y, Kimura H, Sone T, Waseda Y, Ichikawa Y, Araya T, Ohkura N, Tamori S, Takato H, Tambo Y, Herai Y, Hori A, Yasui M, Kasahara K & Nakao S (2008) Sputum eosinophilia, airway hyperresponsiveness and airway narrowing in young adults with former asthma. *Allergol Int* 57(3):211-217.
- Heinemann A, Schuligoi R, Sabroe I, Hartnell A & Peskar BA (2003)  $\Delta$ 12-Prostaglandin J2, a Plasma Metabolite of Prostaglandin D2, Causes Eosinophil Mobilization from the Bone Marrow and Primes Eosinophils for Chemotaxis. *The Journal of Immunology* 170(9):4752-4758.
- Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA & Abraham D (2000) Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol* 165(8):4544-4551.
- Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H & Iwama A (2002) Essential and Instructive Roles of GATA Factors in Eosinophil Development. *J Exp Med* 195(11):1379-1386.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H & Kracht M (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 72(5):847-855.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB & Rothenberg ME (2008) Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38(5):709-750.
- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ & Jacobson J (2008) Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118(4):1311-1321.
- Hsiao IL & Huang Y-J (2011) Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of The Total Environment* 409(7):1219-1228.

- Hu R, Gong X, Duan Y, Li N, Che Y, Cui Y, Zhou M, Liu C, Wang H & Hong F (2010) Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials* 31(31):8043-8050.
- Huang C-C, Aronstam RS, Chen D-R & Huang Y-W (2010) Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in Vitro* 24(1):45-55.
- Huang K-L, Lee Y-H, Chen H-I, Liao H-S, Chiang B-L & Cheng T-J (2015) Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *Journal of Hazardous Materials* 297:304-312.
- Hybertson BM, Gao B, Bose SK & McCord JM (2011) Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine* 32(4-6):234-246.
- Ignacio R, Kim C-S & Kim S-K (2014) Immunotoxicity of metal oxide nanoparticle: zinc oxide. *Mol. Cell. Toxicol.* 10(3):237-244.
- Ingulli E (2010) Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 25(1):61-74.
- Inomata M, Into T, Nakashima M, Noguchi T & Matsushita K (2009) IL-4 alters expression patterns of storage components of vascular endothelial cell-specific granules through STAT6- and SOCS-1-dependent mechanisms. *Mol Immunol* 46(10):2080-2089.
- Irshad M & Chaudhuri PS (2002) Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol* 40(11):1233-1239.
- Ivask A, Titma T, Visnapuu M, Vija H, Kakinen A, Sihtmae M, Pokhrel S, Madler L, Heinlaan M, Kisand V, Shimmo R & Kahru A (2015) Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Current topics in medicinal chemistry* 15(18):1914-1929.
- Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, Takatsu K, Tenen DG & Akashi K (2006) The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 20(21):3010-3021.
- Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ & Lee NA (2012) The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood* 120(19):3882-3890.
- Jacobsen EA, Ochkur SI, Pero RS, Taranova AG, Protheroe CA, Colbert DC, Lee NA & Lee JJ (2008) Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205(3):699-710.
- Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA & Lee JJ (2007) Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *The Journal of allergy and clinical immunology* 119(6):1313-1320.
- Jacobsen EA, Zellner KR, Colbert D, Lee NA & Lee JJ (2011) Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol* 187(11):6059-6068.
- Jan T, Iqbal J, Ismail M, Zakauallah M, Naqvi SH & Badshah N (2013) Sn doping induced enhancement in the activity of ZnO nanostructures against antibiotic resistant *S. aureus* bacteria. *Int J Nanomedicine* 8:3679-3687.

- Jehan S, Mohamed F & Osman J (2013) Bronchial asthma and airway remodeling markers. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* 62(4):545-548.
- Jeziorska M, Salamonsen LA & Woolley DE (1995) Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 53(2):312-320.
- Johansson MW & Mosher DF (2011) Activation of beta1 integrins on blood eosinophils by P-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(4):889-897.
- Jung Y, Wen T, Mingler MK, Caldwell JM, Wang YH, Chaplin DD, Lee EH, Jang MH, Woo SY, Seoh JY, Miyasaka M & Rothenberg ME (2015) IL-1[beta] in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunol* 8(4):930-942.
- Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, Skov PS, Poulsen LK & Alam R (2000) Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* 95(6):1911-1917.
- Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ & Kita H (1995) Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest* 95(6):2813-2821.
- Kaser A, Zeissig S & Blumberg RS (2010) Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology* 28:573-621.
- Kato M, Suzuki M, Hayashi Y & Kimura H (2006) Role of eosinophils and their clinical significance in allergic inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 2(1):121-133.
- Kaur J (2014) A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice* 2014:21.
- Kim J-T, Schimming AW & Kita H (1999) Ligation of FcγRII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *The Journal of Immunology* 162(7):4253-4259.
- Kita H (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunological reviews* 242(1):161-177.
- Knudsen UB, Uldbjerg N, Rechberger T & Fredens K (1997) Eosinophils in human cervical ripening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 72(2):165-168.
- Kobayashi T, Kouzaki H & Kita H (2010) Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol* 184(11):6350-6358.
- Kobayashi T, Robinson JM & Seguchi H (1998) Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci* 111 ( Pt 1):81-91.
- Kołodziejczak-Radzimska A & Jesionowski T (2014) Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials* 7(4):2833.
- Kouro T & Takatsu K (2009) IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International Immunology* 21(12):1303-1309.
- Krug HF & Wick P (2011) Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angewandte Chemie International Edition* 50(6):1260-1278.

- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA & Blanc PD (1995) Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. *J Invest Med* 43(4):371-378.
- Kvarnhammar AM & Cardell LO (2012) Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology* 136(1):11-20.
- Lacy P, Abdel-Latif D, Steward M, Musat-Marcu S, Man SF & Moqbel R (2003) Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol* 170(5):2670-2679.
- Lakshmanan U & Porter AG (2007) Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1 ). *J Immunol* 179(12):8480-8490.
- Lampinen M, Backman M, Winqvist O, Rorsman F, Ronnblom A, Sangfelt P & Carlson M (2008) Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J Leukoc Biol* 84(6):1392-1399.
- Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G & Galli SJ (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392(6671):90-93.
- Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M & Flamand N (2015) Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 136(4):904-913.
- Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, Hoppenot D & Sakalauskas R (2015) Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. *J Inflamm (Lond)* 12:25.
- Law SK, Leung CS, Yau KL, Tse CL, Wong CK, Leung FP, Mascheck L, Huang Y, Sauer H & Tsang SY (2013) Regulation of multiple transcription factors by reactive oxygen species and effects of pro-inflammatory cytokines released during myocardial infarction on cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Int J Cardiol* 168(4):3458-3472.
- Lawrence T, Willoughby DA & Gilroy DW (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2(10):787-795.
- Le Moine A, Flamand V, Demoor FX, Noel JC, Surquin M, Kiss R, Nahori MA, Pretolani M, Goldman M & Abramowicz D (1999) Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *J Clin Invest* 103(12):1659-1667.
- Lecoanet HF, Bottero JY & Wiesner MR (2004a) Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. *Environ Sci Technol* 38(19):5164-5169.
- Lecoanet HF & Wiesner MR (2004b) Velocity effects on fullerene and oxide nanoparticle deposition in porous media. *Environ Sci Technol* 38(16):4377-4382.
- Lee JH, Ahn KH, Kim SM, Kim E, Lee GH, Han JH & Yu IJ (2015) Three-Day Continuous Exposure Monitoring of CNT Manufacturing Workplaces. *BioMed research international* 2015:237140.

- Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP & Lee NA (2010) Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy* 40(4):563-575.
- Lee JJ, Jacobsen EA, Ochkur SI, McGarry MP, Condjella RM, Doyle AD, Luo H, Zellner KR, Protheroe CA, Willetts L, LeSuer WE, Colbert DC, Helmers RA, Lacy P, Moqbel R & Lee NA (2012) Human vs. Mouse Eosinophils: “That which we call an eosinophil, by any other name would stain as red”. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130(3):572-584.
- Lefort J, Nahori MA, Ruffie C, Vargaftig BB & Pretolani M (1996) In vivo neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen-induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J Clin Invest* 97(4):1117-1121.
- Legrand F, Driss V, Woerly G, Loiseau S, Hermann E, Fournié J-J, Héliot L, Mattot V, Soncin F, Gougeon M-L, Dombrowicz D & Capron M (2009) A Functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from  $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils. *PloS one* 4(6):e5926.
- Levi-Schaffer F, Lacy P, Severs NJ, Newman TM, North J, Gomperts B, Kay AB & Moqbel R (1995) Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85(9):2579-2586.
- Levi N, Hantgan RR, Lively MO, Carroll DL & Prasad GL (2006) C(60)-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *J Nanobiotechnology* 4:14.
- Li CH, Shen CC, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW & Kang JJ (2012) Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology* 6(7):746-756.
- Li XB, Zheng H, Zhang ZR, Li M, Huang ZY, Schluesener HJ, Li YY & Xu SQ (2009) Glia activation induced by peripheral administration of aluminum oxide nanoparticles in rat brains. *Nanomedicine* 5(4):473-479.
- Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA & Taylor PR (2011) Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *European journal of immunology* 41(9):2503-2508.
- Lim YT, Kim S, Nakayama A, Stott NE, Bawendi MG & Frangioni JV (2003) Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol Imaging* 2(1):50-64.
- Lin CD, Kou YY, Liao CY, Li CH, Huang SP, Cheng YW, Liao WC, Chen HX, Wu PL, Kang JJ, Lee CC & Lai CH (2014) Zinc oxide nanoparticles impair bacterial clearance by macrophages. *Nanomedicine (Lond)* 9(9):1327-1339.
- Lin W, Huang YW, Zhou XD & Ma Y (2006) Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol* 25(6):451-457.
- Lioy PJ, Nazarenko Y, Han TW, Lioy MJ & Mainelis G (2010) Nanotechnology and Exposure Science: What Is Needed To Fill the Research and Data Gaps for Consumer Products. *Int J Occup Environ Health* 16(4):378-387.
- Lopez-Serrano A, Olivas RM, Landaluze JS & Camara C (2014) Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Analytical Methods* 6(1):38-56.



- Lopez AF, Begley CG, Williamson DJ, Warren DJ, Vadas MA & Sanderson CJ (1986) Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med* 163(5):1085-1099.
- Lotfi R, Herzog GI, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Lee JJ, Rubartelli A, Schrezenmeier H & Lotze MT (2009) Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells. *J Immunol* 183(8):5023-5031.
- Lovrić J, Cho SJ, Winnik FM & Maysinger D (2005) Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death. *Chemistry & Biology* 12(11):1227-1234.
- Luther We (2004) Technological Analysis, Industrial Application of Nanomaterials - Chances and risks - Technology analysis. Dusseldorf (Germany)), p 112
- Macer ML & Taylor HS (2012) Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 39(4):535-549.
- Macias MP, Fitzpatrick LA, Brenneise I, McGarry MP, Lee JJ & Lee NA (2001) Expression of IL-5 alters bone metabolism and induces ossification of the spleen in transgenic mice. *J Clin Invest* 107(8):949-959.
- Maizels RM & Balic A (2004) Resistance to Helminth Infection: The Case for Interleukin-5-Dependent Mechanisms. *Journal of Infectious Diseases* 190(3):427-429.
- Manabe I (2011) Chronic Inflammation Links Cardiovascular, Metabolic and Renal Diseases. *Circulation Journal* 75(12):2739-2748.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C & Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11(8):519-531.
- Maret W & Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20(1):3-18.
- Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6:13.
- Masterson JC, McNamee EN, Jedlicka P, Fillon S, Ruybal J, Hosford L, Rivera-Nieves J, Lee JJ & Furuta GT (2011) CCR3 Blockade Attenuates Eosinophilic Ileitis and Associated Remodeling. *Am J Pathol* 179(5):2302-2314.
- Mathew SO, Rao KK, Kim JR, Bamard ND & Mathew PA (2009) Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol* 39(6):1632-1641.
- Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER & Castranova V (2004) Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 67(1):87-107.
- McCormick ML, Metwali A, Railsback MA, Weinstock JV & Britigan BE (1996) Eosinophils from schistosoma-induced hepatic granulomas produce superoxide and hydroxyl radical. *J Immunol* 157(11):5009-5015.

- McLaren DJ, Mackenzie CD & Ramalho-Pinto FJ (1977) Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). *Clinical and Experimental Immunology* 30(1):105-118.
- McNagny K & Graf T (2002) Making Eosinophils Through Subtle Shifts in Transcription Factor Expression. *J Exp Med* 195(11):f43-47.
- McSorley HJ & Maizels RM (2012) Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin Microbiol Rev* 25(4):585-608.
- Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140(6):771-776.
- Medzhitov R & Janeway Jr CA (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9(1):4-9.
- Melo RC, Spencer LA, Dvorak AM & Weller PF (2008) Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol* 83(2):229-236.
- Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM & Weller PF (2005) Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 6(11):1047-1057.
- Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, Dvorak AM & Weller PF (2009) Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89(7):769-781.
- Melo RCN & Weller PF (2014) Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. *J Leukoc Biol* 96(5):703-712.
- Miehlke S (2015) Clinical features of Eosinophilic esophagitis in children and adults. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29(5):739-748.
- Miike S, McWilliam AS & Kita H (2001) Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167(11):6615-6622.
- Moisan É, Chiasson S & Girard D (2007) The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin Exp Immunol* 150(1):158-168.
- Moore MN (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int* 32(8):967-976.
- Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K & Akashi K (2009) Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 206(1):183-193.
- Munitz A, Bachelet I, Eliashar R, Khodoun M, Finkelman FD, Rothenberg ME & Levi-Schaffer F (2006a) CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils. *J Immunol* 177(1):77-83.

- Munitz A, Bachelet I, Eliashar R, Moretta A, Moretta L & Levi-Schaffer F (2006b) The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) suppresses the effects of IL-5, GM-CSF, and eotaxin on human peripheral blood eosinophils. *Blood* 107(5):1996-2003.
- Munitz A, Bachelet I, Fraenkel S, Katz G, Mandelboim O, Simon HU, Moretta L, Colonna M & Levi-Schaffer F (2005) 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol* 174(1):110-118.
- Muniz VS, Weller PF & Neves JS (2012) Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *J Leukoc Biol* 92(2):281-288.
- Munoz NM, Hamann KJ, Rabe KF, Sano H, Zhu X & Leff AR (1999) Augmentation of eosinophil degranulation and LTC(4) secretion by integrin-mediated endothelial cell adhesion. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1):L802-810.
- Muraki M, Gleich GJ & Kita H (2011) Antigen-specific IgG and IgA, but not IgE, activate the effector functions of eosinophils in the presence of antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 154(2):119-127.
- Myo S, Zhu X, Myou S, Meliton AY, Liu J, Boetticher E, Lambertino AT, Xu C, Munoz NM & Leff AR (2004) Additive blockade of beta 2-integrin adhesion of eosinophils by salmeterol and fluticasone propionate. *The European respiratory journal* 23(4):511-517.
- Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, Inman MD, Efthimiadis A, Pizzichini E, Hargreave FE & O'Byrne PM (2009) Mepolizumab for Prednisone-Dependent Asthma with Sputum Eosinophilia. *New England Journal of Medicine* 360(10):985-993.
- Najafzadeh H, Ghoreishi SM, Mohammadian B, Rahimi E, Afzalzadeh MR, Kazemivarnamkhasi M & Ganjealidarani H (2013) Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. *Vet World* 6(8):534-537.
- Nel A (2005) Air Pollution-Related Illness: Effects of Particles. *Science* 308(5723):804-806.
- Nel A, Xia T, Madler L & Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627.
- Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RC, Reynolds L, Ghiran I, Mahmudi-Azer S, Odemuyiwa SO, Dvorak AM, Moqbel R & Weller PF (2008) Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18478-18483.
- Nguyen T, Nioi P & Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 284(20):13291-13295.
- Niemeyer CM (2001) Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition* 40(22):4128-4158.
- Nounou H, Attia H, Shalaby M & Arafah M (2013) Oral exposure to zinc oxide nanoparticles induced oxidative damage, inflammation and genotoxicity in rat's lung. *Life Science Journal* 10(1):1969-1979.
- Nune SK, Gunda P, Thallapally PK, Lin Y-Y, Laird Forrest M & Berkland CJ (2009) Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6(11):1175-1194.

- Nutku E, Aizawa H, Hudson SA & Bochner BS (2003) Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood* 101(12):5014-5020.
- O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ & Abraham D (2011) Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 79(7):2770-2778.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W & Cox C (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 65(20):1531-1543.
- Ogawa H, Kunkel SL, Fantone JC & Ward PA (1981) Comparative study of eosinophil and neutrophil chemotaxis and enzyme release. *Am J Pathol* 105(2):149-155.
- Ohnmacht C, Pullner A, van Rooijen N & Voehringer D (2007) Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J Immunol* 179(7):4766-4774.
- Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, Isoyama S, Tanno Y, Tamura G, Yamauchi K, Nagura H & Shirato K (1997) Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 16(3):212-219.
- Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA & Abraham D (2006) Eosinophils Can Function as Antigen-Presenting Cells To Induce Primary and Secondary Immune Responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun* 74(6):3232-3238.
- Palomaki J, Karisola P, Pylkkanen L, Savolainen K & Alenius H (2010) Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology* 267(1-3):125-131.
- Park YM & Bochner BS (2010) Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2(2):87-101.
- Pasare C & Medzhitov R (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection* 6(15):1382-1387.
- Patel KD (1998) Eosinophil tethering to interleukin-4-activated endothelial cells requires both P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 92(10):3904-3911.
- Peixe TS, de Souza Nascimento E, Schofield KL, Arcuri AS & Bulcão RP (2015) Nanotoxicology and Exposure in the Occupational Setting. *Occupational Diseases and Environmental Medicine* 3(03):35.
- Pelcova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Turci F, Corazzari I, Kacer P, Schwarz J, Zikova N, Makes O, Syslova K, Komarc M, Belacek J, Navratil T, Machajova M & Zakharov S (2015) Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO<sub>2</sub> (nano)particles. *Occup Environ Med* 10.1136/oemed-2015-103161.

- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 173(12):7521-7530.
- Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA & Elkon KB (2007) Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *Journal of Autoimmunity* 29(4):303-309.
- Persson C & Uller L (2013) Primary lysis of eosinophils as a major mode of activation of eosinophils in human diseased tissues. *Nat Rev Immunol* 13(12):902-902.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S & Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14(9):1-11.
- Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA & Tibério IFLC (2013) Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Frontiers in Pharmacology* 4.
- Pozo VD, de Andrés B, Martín E, Cárdbaba B, Fernández JC, Gallardo S, Tramón P, Palomino P, Lahoz C & Leyva-Cobian F (1992) Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *European Journal of Immunology* 22(7):1919-1925.
- Pujalte I, Passagne I, Brouillaud B, Treguer M, Durand E, Ohayon-Courtes C & L'Azou B (2011) Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and fibre toxicology* 8:10.
- Querfurth E, Schuster M, Kulesa H, Crispino JD, Doderlein G, Orkin SH, Graf T & Nerlov C (2000) Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 14(19):2515-2525.
- Rajakulasingam K, Till S, Ying S, Humbert M, Barkans J, Sullivan M, Meng Q, Corrigan CJ, Bungre J, Grant JA, Kay AB & Durham SR (1998) Increased expression of high affinity IgE (FcepsilonRI) receptor-alpha chain mRNA and protein-bearing eosinophils in human allergen-induced atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158(1):233-240.
- Rathé C, Ennaciri J, Garcês Gonçalves DM, Chiasson S & Girard D (2009) Interleukin (IL)-4 Induces Leukocyte Infiltration In Vivo by an Indirect Mechanism. *Mediators of Inflammation* 2009:10.
- Rosenberg HF (2008) Eosinophil-derived neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol* 9(3):135-140.
- Rothenberg ME, Owen WF, Jr., Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF & Stevens RL (1988) Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 81(6):1986-1992.
- Roy R, Das M & Dwivedi PD (2015) Toxicological mode of action of ZnO nanoparticles: Impact on immune cells. *Mol Immunol* 63(2):184-192.
- Roy R, Kumar D, Sharma A, Gupta P, Chaudhari BP, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2014a) ZnO nanoparticles induced adjuvant effect via toll-like receptors and Src signaling in Balb/c mice. *Toxicology letters* 230(3):421-433.
- Roy R, Kumar S, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2014b) Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology letters* 158(1-2):79-87.

- Roy R, Kumar S, Verma AK, Sharma A, Chaudhari BP, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2014c) Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a Th2 response in Balb/c mice. *International immunology* 26(3):159-172.
- Roy R, Parashar V, Chauhan LK, Shanker R, Das M, Tripathi A & Dwivedi PD (2014d) Mechanism of uptake of ZnO nanoparticles and inflammatory responses in macrophages require PI3K mediated MAPKs signaling. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28(3):457-467.
- Roy R, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2011) Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide. *J Biomed Nanotechnol* 7(1):110-111.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE & Monteiro-Riviere NA (2006) Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicological Sciences* 91(1):159-165.
- Sanderson CJ (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79(12):3101-3109.
- Sandstead HH & Smith JC, Jr. (1996) Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *J Nutr* 126(9 Suppl):2410S-2418S.
- Sannohe S, Adachi T, Hamada K, Honda K, Yamada Y, Saito N, Cui CH, Kayaba H, Ishikawa K & Chihara J (2003) Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis. *The European respiratory journal* 21(6):925-931.
- Saptarshi SR, Duschl A & Lopata AL (2015) Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview. *Nanomedicine (Lond)* 10(13):2075-2092.
- Sayes CM, Reed KL & Warheit DB (2007) Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 97(1):163-180.
- Schilling K, Bradford B, Castelli D, Dufour E, Nash JF, Pape W, Schulte S, Tooley I, van den Bosch J & Schellauf F (2010) Human safety review of "nano" titanium dioxide and zinc oxide. *Photochem Photobiol Sci* 9(4):495-509.
- Schratl P, Royer JF, Kostenis E, Ulven T, Sturm EM, Waldhoer M, Hoefler G, Schuligoi R, Lippe IT, Peskar BA & Heinemann A (2007) The Role of the Prostaglandin D2 Receptor, DP, in Eosinophil Trafficking. *The Journal of Immunology* 179(7):4792-4799.
- Seaton A, Tran L, Aitken R & Donaldson K (2009) Nanoparticles, human health hazard and regulation. *Journal of The Royal Society Interface* 10.1098/rsif.2009.0252.focus.
- Seminario M-C & Bochner BS (1997) Expression and function of b1 integrins on human eosinophils. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92:157-164.
- Sergejeva S, Johansson AK, Malmhall C & Lotvall J (2004) Allergen exposure-induced differences in CD34+ cell phenotype: relationship to eosinophilopoietic responses in different compartments. *Blood* 103(4):1270-1277.

- Shen ZJ, Esnault S, Rosenthal LA, Szakaly RJ, Sorkness RL, Westmark PR, Sandor M & Malter JS (2008) Pin1 regulates TGF-beta1 production by activated human and murine eosinophils and contributes to allergic lung fibrosis. *J Clin Invest* 118(2):479-490.
- Shen ZJ & Malter JS (2015) Determinants of eosinophil survival and apoptotic cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20(2):224-234.
- Shi HZ (2004) Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 76(3):520-527.
- Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z & Weller PF (2000) Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest* 105(7):945-953.
- Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HS, Das G & Devadas S (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res* 16(2):126-133.
- Shin MH, Lee YA & Min DY (2009) Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection. *Korean J Parasitol* 47(Suppl):S125-131.
- Shinkai K, Mohrs M & Locksley RM (2002) Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 420(6917):825-829.
- Shrimpton R, Gross R, Darnton-Hill I & Young M (2005) Zinc deficiency: what are the most appropriate interventions? *BMJ* 330(7487):347-349.
- Sibilia J (2007) Comment définir et classer les maladies inflammatoires ? *Revue du Rhumatisme* 74(8):714-725.
- Simard JC, Vallieres F, de Liz R, Lavastre V & Girard D (2015) Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome. *The Journal of biological chemistry* 290(9):5926-5939.
- Simko M & Mattsson MO (2010) Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Particle and fibre toxicology* 7:42.
- Simón-Vázquez R, Lozano-Fernández T, Peleteiro-Olmedo M & González-Fernández Á (2014) Conformational changes in human plasma proteins induced by metal oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113:198-206.
- Simon HU (2001) Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunological reviews* 179:156-162.
- Simon HU (2009) Cell death in allergic diseases. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14(4):439-446.
- Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C & Blaser K (1997) Direct Demonstration of Delayed Eosinophil Apoptosis as a Mechanism Causing Tissue Eosinophilia. *Journal of Immunology* 158(8):3902-3908.
- Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus N, Ann L, Bakhori S, Hasan H & Mohamad D (2015) Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* 7(3):219-242.
- Smith DM, Simon JK & Baker Jr JR (2013) Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* 13(8):592-605.

- Sodikoff J & Hirano I (2015) Therapeutic strategies in eosinophilic esophagitis: Induction, maintenance and refractory disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 29(5):829-839.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J & Beer HD (2014) Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate immunity* 20(2):115-125.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE & Beer HD (2012) Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol* 188(4):1992-2000.
- Someya A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S & Nagaoka I (1997) Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils--comparison of the NADPH oxidase components. *Arch Biochem Biophys* 345(2):207-213.
- Spahn J & Covar R (2007) Glucocorticoid Therapy in Asthma. *Allergic Diseases*, (Current Clinical Practice, Lieberman P & Anderson J (Édit.) Humana Press, 10.1007/978-1-59745-382-0\_23. p 385-401.
- Spencer LA, Bonjour K, Melo RCN & Weller PF (2014) Eosinophil Secretion of Granule-Derived Cytokines. *Frontiers in immunology* 5.
- Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL & Weller PF (2009) Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol* 85(1):117-123.
- Stone KD, Prussin C & Metcalfe DD (2010) IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2):S73-80.
- Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA & Rosenberg HF (2006) Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 108(7):2420-2427.
- Symon FA, Lawrence MB, Williamson ML, Walsh GM, Watson SR & Wardlaw AJ (1996) Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. *The Journal of Immunology* 157(4):1711-1719.
- Tabas I & Glass CK (2013) Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. *Science* 339(6116):166-172.
- Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH & Luster AD (2000) BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med* 192(3):439-446.
- Tai PC, Hayes DJ, Clark JB & Spry CJ (1982) Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells in vitro. *Biochem J* 204(1):75-80.
- Tait SW & Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9):621-632.
- Takatsu K, Takaki S & Hitoshi Y (1994) Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol* 57:145-190.
- Takatsu K, Tominaga A, Harada N, Mita S, Matsumoto M, Takahashi T, Kikuchi Y & Yamaguchi N (1988) T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. *Immunological reviews* 102:107-135.



- Tanaka Y, Takenaka M, Matsunaga Y, Okada S, Anan S, Yoshida H & Ra C (1995) High affinity IgE receptor (FcεRI) expression on eosinophils infiltrating the lesions and mite patch tested sites in atopic dermatitis. *Archives of dermatological research* 287(8):712-717.
- Tang S, Wang M, Germ KE, Du HM, Sun WJ, Gao WM & Mayer GD (2015) Health implications of engineered nanoparticles in infants and children. *World J Pediatr* 11(3):197-206.
- Temkin V & Levi-Schaffer F (2001) MECHANISM OF TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA MEDIATED EOSINOPHIL SURVIVAL. *Cytokine* 15(1):20-26.
- Teresa Ramírez-Prieto M, García-Río F & Villamor J (2006) Papel del estrés oxidativo en las enfermedades respiratorias y su monitorización. *Medicina Clínica* 127(10):386-396.
- Timmons BC, Fairhurst AM & Mahendroo MS (2009) Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. *J Immunol* 182(5):2700-2707.
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K & Adkins EJ (2003) Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 111(9):1202-1208.
- Tokoyoda K, Hauser AE, Nakayama T & Radbruch A (2010) Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat Rev Immunol* 10(3):193-200.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M & Orkin SH (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90(1):109-119.
- Tseng Y-H, Sun D-S, Wu W-S, Chan H, Syue M-S, Ho H-C & Chang H-H (2013) Antibacterial performance of nanoscaled visible-light responsive platinum-containing titania photocatalyst in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830(6):3787-3795.
- Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB & McCord JM (1991) Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 2:681-689.
- Turvey SE & Broide DH (2010) Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2, Supplement 2):S24-S32.
- Uhm TG, Kim BS & Chung IY (2012) Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 4(2):68-79.
- Van Dijk T, Bracke M, Caldenhoven E, Raaijmakers J, Lammers J, Koenderman L & De Groot R (1996) Cloning and characterization of Fc alpha Rb, a novel Fc alpha receptor (CD89) isoform expressed in eosinophils and neutrophils. *Blood* 88(11):4229-4238.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Jr., Rejeski D & Hull MS (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6:1769-1780.
- Ventura I, Vega A, Chacon P, Chamorro C, Aroca R, Gomez E, Bellido V, Puente Y, Blanca M & Monteseirin J (2014) Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy* 69(7):898-905.

- Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Goncalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP & Teixeira MM (2009) Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am J Pathol* 175(6):2382-2391.
- Vigano E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM & Mortellaro A (2015) Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat Commun* 6:8761.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM & Weller PF (2007) Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 21(1):167-178.
- Wang HB, Ghiran I, Matthaei K & Weller PF (2007) Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 179(11):7585-7592.
- Wang J, Li N, Zheng L, Wang S, Wang Y, Zhao X, Duan Y, Cui Y, Zhou M, Cai J, Gong S, Wang H & Hong F (2011) P38-Nrf-2 signaling pathway of oxidative stress in mice caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. *Biol Trace Elem Res* 140(2):186-197.
- Wastney ME, Aamodt RL, Rumble WF & Henkin RI (1986) Kinetic analysis of zinc metabolism and its regulation in normal humans. *Am J Physiol* 251(2 Pt 2):R398-408.
- White GE, Iqbal AJ & Greaves DR (2013) CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. *Pharmacological Reviews* 65(1):47-89.
- Wiesner MR, Lowry GV, Alvarez P, Dionysiou D & Biswas P (2006) Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol* 40(14):4336-4345.
- Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, Kuhlbusch TAJ, Scherbart AM, Esser C, Schins RPF & Albrecht C (2013) Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner. *PLoS one* 8(6):e65704.
- Wong CK, Cheung PF, Ip WK & Lam CW (2007) Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37(1):85-96.
- Wong TW, Doyle AD, Lee JJ & Jelinek DF (2014) Eosinophils regulate peripheral B cell numbers in both mice and humans. *J Immunol* 192(8):3548-3558.
- Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A & Locksley RM (2011) Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332(6026):243-247.
- Xiaoyong D, Qixia L, Wenting C, Yanli W, Minghong W, Haijiao Z & Zheng J (2009) Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology* 20(11):115101.
- Xie Y, Williams NG, Tolic A, Chrisler WB, Teeguarden JG, Maddux BL, Pounds JG, Laskin A & Orr G (2012) Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface. *Toxicol Sci* 125(2):450-461.

- Yamaguchi Y, Nishio H, Kishi K, Ackerman SJ & Suda T (1999) C/EBPbeta and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBPbeta activity in eosinophil gene expression. *Blood* 94(4):1429-1439.
- Yin J-J, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP & Zhao B (2012) Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* 263(1):81-88.
- Yoo Y, Koh YY, Kang H, Yu J, Nah KM & Kim CK (2004) Sputum eosinophil counts and eosinophil cationic protein levels in cough-variant asthma and in classic asthma, and their relationships to airway hypersensitivity or maximal airway response to methacholine. *Allergy* 59(10):1055-1062.
- Yoon J, Terada A & Kita H (2007) CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol* 179(12):8454-8462.
- Yousefi S, Hemmann S, Weber M, Holzer C, Hartung K, Blaser K & Simon HU (1995) IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. Evidence for increased secretion in asthma. *J Immunol* 154(10):5481-5490.
- Ze Y, Zheng L, Zhao X, Gui S, Sang X, Su J, Guan N, Zhu L, Sheng L, Hu R, Cheng J, Cheng Z, Sun Q, Wang L & Hong F (2013) Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere* 92(9):1183-1189.
- Zhang H, Ji Z, Xia T, Meng H, Low-Kam C, Liu R, Pokhrel S, Lin S, Wang X, Liao Y-P, Wang M, Li L, Rallo R, Damoiseaux R, Telesca D, Mädler L, Cohen Y, Zink JI & Nel AE (2012) Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation. *ACS Nano* 6(5):4349-4368.
- Zhang W-x (2003) Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *Journal of Nanoparticle Research* 5(3-4):323-332.