

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Armand Frappier

**INTERACTION ÉOSINOPHILES HUMAINS-NANOPARTICULES :
FOCUS SUR LA CAPACITÉ DU DIOXYDE DE TITANE (TiO₂) POUR
INDUIRE L'ADHÉRENCE**

Par
Maxime Murphy Marion

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentale de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Francis Davoine University of Alberta
Président du jury Examineur interne	Kessen Patten INRS-IAF
Directeur de recherche	Denis Girard INRS-IAF

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de deux ans. En préambule, je veux adresser tous mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé pour la rédaction de ce mémoire.

Tout d'abord, j'avais envie d'adresser mes sincères remerciements à ceux qui ont contribué à l'élaboration de mon mémoire. Je tiens tout particulièrement à remercier Pr. Denis Girard, pour son aide précieuse, ses encouragements et pour le travail énorme qu'il effectue pour nous créer les conditions les plus favorables pour le déroulement de nos études.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements à Francis Vallières pour ces nombreux conseils et son temps consacré dans mon initiation aux différentes techniques de laboratoire. Enfin, je voudrais également remercier Jean-Christophe Simard, Isabelle Durocher et Pascal Chhay, mes collègues, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux ainsi que leur dynamisme hors du commun qui a permis l'apprentissage aussi plaisant.

Finalement, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille et tous mes proches et amis, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

RESUME

L'industrialisation des nanoparticules (NPs) soulève d'importantes considérations toxicologiques puisqu'une grande partie de la population se voit exposée aux NPs. Une des NPs prototypes la plus abondamment étudiée est le dioxyde de titane (TiO_2). Certaines études ont démontré que des NPs augmentent le recrutement des éosinophiles (Eos) en plus d'exacerber les symptômes de l'asthme chez la souris. Par contre, peu d'études rapportent les effets directs des NPs sur la biologie des Eos. Dans ce mémoire, nous voulons déterminer si certaines NPs peuvent altérer certaines fonctions importantes des Eos humains, comme l'adhésion. Nous avons étudié une dizaine de NPs différentes, dont près de la moitié provoquent une augmentation de l'adhésion des Eos sur un tapis cellulaire, les NPs de TiO_2 démontrant la plus grande activité. Les niveaux d'expression des différentes molécules d'adhésion ont été mesurés, et des expériences de type westerns blots, avec des inhibiteurs pharmacologiques, ont mis en évidence les voies d'activations importantes. Nos résultats suggèrent que la NP de TiO_2 active les voies signalétiques du p38 et de Akt dans le processus d'adhésion. Enfin, cela permet de mieux comprendre les effets des NPs sur la physiologie des Eos et de voir que les NPs agissent de différente façon sur la biologie des Eos.

ABSTRACT

The industrialisation of nanoparticles (NPs) raises awareness from a toxicological perspective. In fact, a majority of the population is exposed to NPs, hence the importance of this study. One of the most abundant NP that has been studied over the years is the titanium dioxide (TiO₂). Studies have shown that NPs increase eosinophils (Eos) recruitment as well as exacerbate asthmatic symptoms in mice. On the other hand, the effect of TiO₂ on human Eos have not been investigated yet. In this master's dissertation, NPs have shown to alter important functions among Eos particularly the adhesion. Among ten or so NPs studied, half of them increase the adhesion phenomena and TiO₂ have shown to induce the strongest activity. The level of expression of adhesion molecules has been measured and the activation pathways have been elucidated by Western Blotting human Eos treated with pharmacological protein inhibitors. Our results suggest that TiO₂ NP activate signalisation pathway involving p38 and AkT in the adhesion process. At last, this study provides a better understanding of the interaction between NPs and human Eos, thus perceiving that NPs act in different ways on the biology of Eos.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
1. Introduction au système immunitaire	1
1.1 Généralité	1
1.1.1 Réponse Immunitaire.....	1
1.1.2 Ontogénèse des cellules immunitaires	2
1.2 Le système immunitaire acquis	4
1.3 Le système immunitaire inné	5
1.3.1 Les barrières physiologiques	5
1.3.2 Les cellules NK	5
1.3.3 Les phagocytes mononucléés	6
1.3.4 Les granulocytes.....	7
2. Les éosinophiles	10
2.1 Généralité	10
2.1.1 Développement du éosinophile	10
2.1.2 Morphologie	11
2.1.3 Récepteurs de surface.....	13
2.2 Les fonctions de l'éosinophile	15
2.2.1 Son activation	15
2.2.2 Chimiotactisme	16
2.2.3 L'adhérence cellulaire	16
2.2.4 La production d'espèces réactives de l'oxygène	19
2.2.5 La survie et la mort cellulaire	21
2.3 Éosinophile et maladie humaine	23
2.3.1 Infection parasitaire	23
2.3.2 Asthme éosinophilique.....	24
3. Les nanoparticules.....	26
3.1 Caractéristique d'une nanoparticule	26
3.2 La nanotoxicologie	29
3.2.1 Présence dans l'environnement	29
3.2.2 L'exposition humaine	30
3.3 Les différentes nanoparticules	32
3.3.1 Le dioxyde de titane (TiO ₂)	34
3.4 Exposition humaine au TiO ₂	35
3.4.1 Interaction avec les granulocytes	36
3.4.2 Interaction avec les éosinophiles	38
ARTICLE	40
DISCUSSION ET CONCLUSION	63
RÉFÉRENCE	71
ANNEXE	85

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES EFFETS DIRECTS CONNUS DES NANOPARTICULES SUR LA BIOLOGIE DES EOSINOPHILES.....	39
---	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ONTOGÉNÈSE DES CELLULES IMMUNITAIRES À PARTIR DE LA MOELLE OSSEUSE.....	3
FIGURE 2 : CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE L'ÉOSINOPHILE HUMAIN.....	12
FIGURE 3 : LES ÉTAPES DU PASSAGE DE L'ÉOSINOPHILE VERS LE SITE INFLAMMATOIRE.....	19

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Al ₂ O ₃	Oxyde d'aluminium
BCR	Récepteur de cellule B
CD	Cluster de différenciation
CeO ₂	Dioxyde de cérium
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSL	Cellule souche lymphoïde
CSM	Cellule souche myéloïde
cysLT	Cystéinyl leucotriène
ECFA	<i>Eosinophils chemotatic factor of anaphylaxis</i>
ECP	Protéine cationique d'éosinophile
EDN	Neurotoxine dérivé d'éosinophile
EPO	Peroxydase d'éosinophile
Fc	Fragments constants
Fe ₃ O ₄	Magnétite
Flt3L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
fMLF	<i>Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GC	Glucocorticostéroïde
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interféron
IgE	Immunoglobuline E
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukine
JAK	Janus kinase
LT	Leucotriène
MadCAM-1	<i>Mucosal addressin cellular adhesion molecule</i>
MAPK	<i>Mitogen activated proteins kinase</i>
MBP	<i>Major basic protein</i>
MBP-1	<i>Myc promoter-binding protein-1</i>

NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-kB	Facteur nucléaire-kB
Nm	Nanomètre
NK	Cellule tueuse naturelle
NP	Nanoparticule
PAF	Facteur d'activation des plaquettes
Pd	Palladium
PG	Prostaglandine
PI3K	<i>Phospholinositide-3-kinase</i>
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
Pt	Platine
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
SEM	Microscopie électronique à balayage
SyK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TCR	Récepteur de cellule T
TGF	Facteur de croissance transformant
Th	Cellule T auxiliaire
TiO ₂	Dioxyde de titane
TLR	Récepteurs de type Toll
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i>
TX	Thromboxane
UV	Ultraviolet
V-CAM	<i>Vascular cell adhesion protein</i>
ZnO	Oxyde de zinc

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION AU SYSTÈME IMMUNITAIRE

1.1 Généralité

Le système immunitaire sert de bouclier en protégeant l'organisme contre les agressions. Il se présente comme un mur que doivent franchir les agresseurs provenant de l'environnement, tels que les bactéries, les virus, ou autres parasites, mais aussi les cellules du «soi» modifiées. Il effectue son rôle en étroite communication avec d'autres systèmes physiologiques tels que les systèmes nerveux et endocrinien, le tout grâce aux neurotransmetteurs, aux cytokines et aux hormones (Procaccini *et al.*, 2014, Taub, 2008). Le corps humain se protège via deux principaux types d'immunité : innée et acquise. Dès la naissance, le système immunitaire est actif, il s'agit de l'immunité innée. De plus, le système immunitaire est perfectionniste. Il est en constant développement selon les menaces auxquelles il fait face dépendamment de son environnement et du mode de vie de l'hôte; ce deuxième type se nomme l'immunité acquise. L'immunité acquise mène à l'établissement d'une mémoire immunologique qui se construit en se basant sur les agressions rencontrées auparavant ou encore à l'aide des vaccins, ce qui lui permet de répondre plus rapidement lorsqu'une même menace se présente. (Delves *et al.*, 2000).

1.1.1 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire correspond à l'activation des processus de défense du système immunitaire en reconnaissance des molécules du «soi» ou du «non-soi» modifiées. La première étape de ce processus consiste à reconnaître les corps étrangers en recueillant d'abord l'information puis en la transmettant ensuite aux cellules de défense dans le but d'activer des effecteurs spécifiques pour éliminer ces corps étrangers. Ces étapes sont effectuées grâce à la coopération de cellules spécialisées du système immunitaire. Par exemple, l'entrée d'une bactérie dans l'organisme est d'abord reconnue par les cellules résidentes, comme les cellules dendritiques, qui migreront ensuite vers le ganglion lymphatique dans le but de présenter cette molécule sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes T possédant les récepteurs d'antigène spécifique au peptide en question pourront proliférer et se différencier en cellules T effectrices cytotoxiques (CD8+), en cellules T effectrices accessoires (CD4+) ou en cellules T mémoires (Salmond *et al.*, 2009). Les cytokines produites par les cellules T peuvent aussi contribuer à l'activation des cellules innées du système immunitaire. Les types de cytokines produites influenceront les types de lignées cellulaires pouvant être activées. Par exemple, les neutrophiles seront activés par le « Granulocyte colony-stimulating factor » (G-CSF) et par le « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) produit, par exemple, par des macrophages lors d'infections bactériennes ou encore produit par des éosinophiles qui seront activés lors d'une agression parasitaire par l'IL-5 et l'éotaxine (Chaplin, 2010, Parkin *et al.*, 2001). Les neutrophiles et les éosinophiles ont une durée de vie d'environ 2 à 5 jours dépendamment de leur localisation tissulaire. Si l'agent pathogène n'est pas éliminé par les cellules de l'immunité innée rapidement, il sera donc confronté à l'immunité acquise en plus grande quantité. L'activation, la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et B durent environ 5 à 8 jours suivant l'exposition à l'antigène avant qu'elles puissent répondre avec une quantité suffisante d'anticorps. Par conséquent, dépendamment du niveau d'activation des cellules du système immunitaire, leur durée de vie peut être allongée selon le tissu (Park *et al.*, 2010, Sprent, 2001).

Il existe également une réponse dite intermédiaire se situant entre l'immunité innée et acquise. Elle comprend notamment la sécrétion d'anticorps, généralement des immunoglobulines M (IgM) produites par les plasmocytes dans la rate et les ganglions lymphatiques même en absence de stimulation par des antigènes. Grâce à leur faible affinité, elles peuvent interagir avec des structures chimiques particulières de certains microorganismes. Donc, elles permettent une réponse rapide via des anticorps non spécifique (Casali *et al.*, 1996, Coutinho *et al.*, 1995, Panda *et al.*, 2015). Finalement, la réponse immune est un processus complexe orchestré via plusieurs types cellulaires, le but ultime étant d'éliminer le plus rapidement et le plus efficacement possible les menaces potentielles afin d'assurer une protection maximale de l'organisme.

1.1.2 Ontogénèse des cellules immunitaires

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) totipotentes sont issues de la moelle osseuse. Celles-ci pourront générer les cellules souches lymphoïdes (CSL) ainsi que les cellules souches

myéloïdes (CSM) dans la moelle osseuse. La différenciation de ces dernières dépend des signaux présents dans leur microenvironnement, tels que différentes cytokines et chimiokines, afin de favoriser une lignée particulière ou simplement pour le maintien des cellules souches (Schofield, 1978, Solaroglu *et al.*, 2007, Sugiyama *et al.*, 2012, C. C. Zhang *et al.*, 2008). Les CSL donneront naissance aux lymphocytes B, aux lymphocytes T CD4 et TCD8, ainsi qu'aux cellules tueuses naturelles (NK). Les lymphocytes T devront continuer leur maturation dans le thymus ou encore dans d'autres organes lymphoïdes secondaires tandis que les lymphocytes B sortiront de la moelle osseuse mature (Germain, 2002, Pui *et al.*, 1999). Les CSM sont à l'origine des granulocytes (les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles) ainsi que des monocytes. Ceux-ci sont retrouvés matures principalement dans le sang, mais également dans les tissus cibles lorsqu'ils y seront recrutés. Les monocytes poursuivront leur différenciation en macrophages ou en cellules dendritiques dans les tissus où ils seront recrutés selon les besoins (Johnson *et al.*, 2009, Sallusto *et al.*, 1994). Il est possible de constater ces faits sur l'ontogénèse de ces cellules à la **figure 1**.

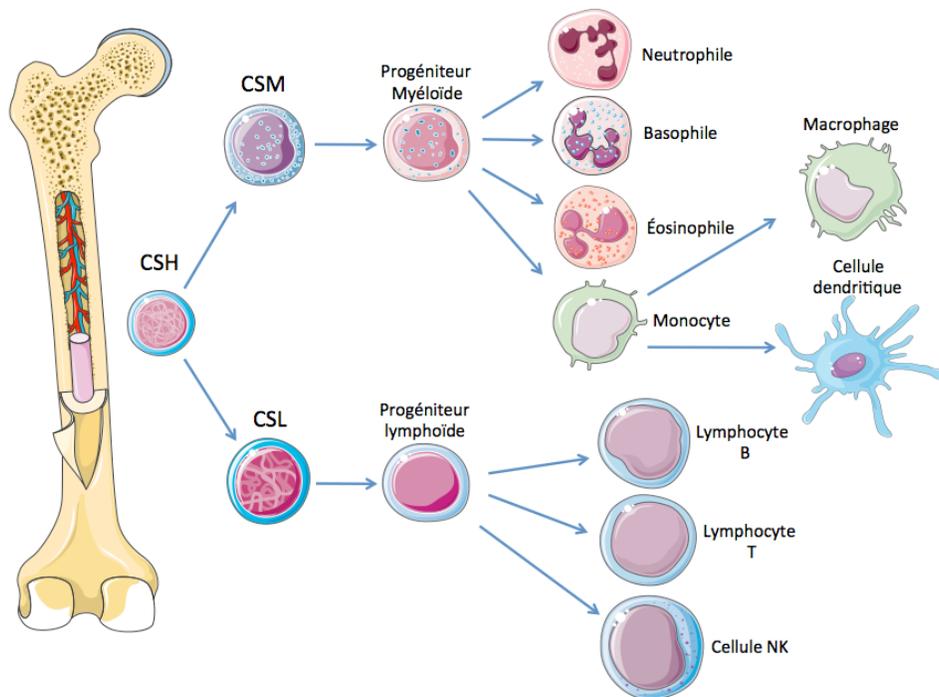


Figure 1 : Ontogénèse des cellules immunitaires à partir de la moelle osseuse : Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) totipotentes sont conçues dans la moelle osseuse pour ensuite se différencier en deux types de cellules, les cellules souches lymphoïdes (CSL) qui deviendront les cellules progénitrices de la lignée lymphoïde, et les cellules souches myéloïdes (CSM) qui deviendront les cellules progénitrices de la lignée myéloïde. Dépendamment des signaux reçus par la cellule progénitrice myéloïde, elle pourra se différencier soit en neutrophiles, en basophiles, en éosinophiles ou bien en monocyte qui lui pourra devenir un macrophage ou une cellule dendritique. La cellule progénitrice lymphoïde pourra devenir soit un lymphocyte B, T ou une cellule NK.

1.2 Le système immunitaire acquis

Le système immunitaire acquis se nomme ainsi puisqu'il peut acquérir une spécificité suite à une présentation antigénique. Les immunorécepteurs exprimés à la surface des cellules B (BCR) et à la surface des cellules T (TCR) permettent la reconnaissance de l'antigène. Suivant la reconnaissance de cet antigène, deux réponses peuvent avoir lieu : soit que l'antigène active directement les lymphocytes B possédant le récepteur spécifique à cet antigène, ce qui lui permet de se différencier en plasmocyte et de sécréter des anticorps spécifiques visant l'antigène en question (Hoffman *et al.*, 2016); soit que l'antigène sera présenté aux lymphocytes T par des cellules présentatrices d'antigène afin d'activer les lymphocytes T effecteurs. Ceux-ci peuvent devenir des lymphocytes (CD8+) cytotoxiques et détruire les cellules infectées, ou ils peuvent devenir des lymphocytes (CD4+) auxiliaires qui favorisent la différenciation en plasmocyte, la production d'anticorps et la production de cellules mémoires par les lymphocytes B. Plusieurs types de cellules T auxiliaires (Th) existent, dont deux d'entre eux qui nous intéressent davantage : les cellules de l'immunité Th1 qui favorisent la phagocytose, l'inflammation et la présentation d'antigène aux cellules T, ainsi que les Th2 favorisant la production d'anticorps via la stimulation des cellules B (Luckheeram *et al.*, 2012, J. Zhu *et al.*, 2010). De plus, le système immunitaire acquis est doté d'un système de mémoire, c'est-à-dire qu'après l'élimination du pathogène, l'organisme garde en mémoire les cellules nécessaires afin d'éliminer ce même pathogène dans une autre éventualité. Ainsi, la mémoire immunologique permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors de la rencontre subséquente du même antigène (Chang *et al.*, 2014, Sallusto *et al.*, 2004).

1.3 Le système immunitaire inné

La réponse innée est la première protection de l'organisme. Elle constitue une action non spécifique à l'agresseur, mais rapide pouvant éliminer directement le pathogène ou bien le ralentir, le temps que l'immunité acquise prenne le relais. L'immunité innée possède deux lignes de défense : une défense externe avec des barrières physiques et chimiques, ainsi qu'une barrière interne comportant plusieurs types de cellules immunitaires.

1.3.1 Les barrières physiologiques

La peau, le plus grand organe du corps, crée un milieu défavorable aux pathogènes grâce à sa surface sèche, légèrement acide et aux bonnes bactéries à sa surface. Elle sera la première barrière à franchir pour tout pathogène. La barrière épithéliale peut également produire des sécrétions de protection comme le mucus, les sucs gastriques, la bile ou encore les larmes, limitant ainsi l'infiltration du pathogène. Enfin, ces barrières physiologiques de premier rang sont très importantes pour réduire au minimum les risques d'infections, mais également l'introduction de tout élément exogène pouvant s'infiltrer dans l'organisme.

1.3.2 Les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (NK) font partie de la famille des grands lymphocytes granuleux. Contrairement aux autres lymphocytes, les cellules NK humaines ne possèdent pas le CD3, mais elles possèdent le CD56 (Yuen *et al.*, 2001). Elles jouent un rôle important dans la détection et l'élimination de cellules dont les molécules du soi sont altérées. Elles peuvent aussi produire différentes cytokines, tels que l'interféron gamma (IFN- γ) et le « tumor necrosis factor » (TNF- α), qui permettent d'activer d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T, B ou les macrophages, en plus de jouer leur rôle principal de tueur (Kobayashi *et al.*, 1989, Perussia, 1996). Les cellules NK peuvent agir de deux manières afin d'éliminer la cellule modifiée. D'une part, elles possèdent des récepteurs reconnaissant les fragments constants (Fc) des anticorps IgG qui déclencheront la lyse de la cellule cible. Ce mécanisme est appelé « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (ADCC). D'autre part, les cellules NK possèdent des molécules de classe 1 du CMH qui leur permettent d'identifier les cellules du soi. En effet, les cellules du soi possèdent des récepteurs inhibiteurs ayant comme ligand les molécules de classe 1 du CMH, ce qui envoie un message permettant leur survie aux cellules NK. Par contre,

les cellules du non-soi ou celles dont les molécules du soi sont modifiées, tel que la perte de l'expression des molécules de classe 1 du CMH, ne sont pas reconnues par les lymphocytes T. Toutefois, cette modification sera reconnue par les cellules NK ce qui, ultimement, conduira à la lyse de la cellule cible (Campbell *et al.*, 1999, Hoglund *et al.*, 1997, Long *et al.*, 1997).

1.3.3 Les phagocytes mononucléés

Les phagocytes mononucléés comprennent les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ils sont caractérisés par leurs activités phagocytaires. D'abord, les monocytes peuvent atteindre 40 µm de diamètre et ont une durée de vie variable de quelques jours à plusieurs mois. Les monocytes contiennent de fines granules basophiles azurophiles et plusieurs lysosomes ce qui leur donnent la capacité de phagocyter (Nichols *et al.*, 1971). Sous l'influence de cytokines et de facteurs chimioattractants, les monocytes migrent vers le tissu infecté où ils se différencieront en deux types de phagocytes mononucléés : les macrophages via le GM-CSF et les cellules dendritiques via FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) (Liu *et al.*, 2009, Naik *et al.*, 2005, van Furth *et al.*, 1968, Yona *et al.*, 2013).

Le principal rôle des macrophages est d'éliminer les pathogènes afin d'enrayer toute infection. La phagocytose a été découverte à la fin du 19^e siècle par Élie Metchnikov (1880), gagnant du prix Nobel de physiologie ou de médecine. Les récepteurs à la surface des macrophages reconnaissent les motifs microbiens, provoquant ainsi le processus de phagocytose. Cela lui permet d'allonger sa membrane plasmique afin de progressivement entourer le microbe pour l'internaliser. Une fois englouti dans un phagosome, il y a jumelage avec un lysosome permettant de libérer des enzymes digestives et des radicaux libres de l'oxygène, afin de détruire complètement le contenu (de Chastellier *et al.*, 1997). La phagocytose dure environ 30 à 60 minutes, et elle est aussi utilisée afin d'éliminer les corps nécrotiques, apoptotiques et les autres débris (Cannon *et al.*, 1992). Chaque macrophage peut phagocyter une centaine de particules avant de mourir. De plus, ils peuvent jouer un rôle dans l'immunité adaptative puisqu'ils peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T grâce aux molécules de classe 2 du CMH. Enfin, les macrophages peuvent aussi produire plusieurs cytokines dans le but de recruter et d'activer les autres cellules immunitaires (Aderem *et al.*, 1999, Harding *et al.*, 1992, Holling *et al.*, 2004).

Les cellules dendritiques possèdent des prolongements cytoplasmiques et sont présentes non seulement dans le sang et les organes lymphoïdes, mais aussi dans les muqueuses. Étant les premières cellules immunitaires rencontrant le pathogène, les cellules dendritiques agissent comme chef d'orchestre du système immunitaire. Suivant l'ingestion du pathogène, la cellule dendritique peut exposer des fragments de ce dernier à sa surface et se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter l'antigène aux lymphocytes. Les cellules dendritiques jouent un rôle dans l'immunité innée, et elles ont un rôle essentiel et rapide dans l'activation de l'immunité acquise. Enfin, elles retourneront au tissu cible pour poursuivre leur rôle phagocytaire (Blanco *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2010, Steinman *et al.*, 2007).

1.3.4 Les granulocytes

Provenant de la lignée myéloïde, les granulocytes possèdent un seul gros noyau polylobé ainsi que de nombreuses granulations au niveau de leur cytoplasme. Ils possèdent une activité dite « non spécifique », étant donné qu'ils ne sont pas orientés contre un seul antigène. Les granulocytes possèdent deux types de granules : les granules azurophiles et les granules spécifiques. Les granules azurophiles sont non spécifiques et correspondent à des lysosomes contenant des particules bactéricides indépendantes à l'oxygène et de la myéloperoxydase (Bainton *et al.*, 1968). Les granules spécifiques ne contiennent ni des enzymes lysosomiales ni de la peroxydase. Ils contiennent surtout du lysozyme, du cytochrome b, de la gélatinase et du collagène (Zurier *et al.*, 1973). Les granules des leucocytes peuvent avoir une apparence variable dépendamment de leur niveau de maturation. Les granulocytes se distinguent en trois types de cellules basés sur l'affinité de leur granule à être coloré par différents colorants acides et basiques : les basophiles, les neutrophiles ainsi que les éosinophiles.

Les basophiles sont les leucocytes les moins nombreux à circuler dans le sang, représentant moins de 0,5% des leucocytes totaux (Min *et al.*, 2012). Leur cytoplasme contient de nombreux granules à l'intérieur desquels se retrouvent majoritairement l'histamine et l'héparine. Les basophiles jouent un rôle important dans les réactions allergiques. En effet, les récepteurs membranaires des immunoglobulines E (IgE) du basophile sont activés en présence d'antigènes, ce qui permet la libération du contenu de leurs granules par exocytose (Min, 2008). L'histamine ainsi libérée augmente la perméabilité vasculaire en agissant comme vasodilatateur. Elle contribue également à activer la réponse inflammatoire en plus de jouer un rôle important dans les réactions allergiques d'hypersensibilité de type 1 (He *et al.*, 2013,

Siracusa *et al.*, 2013). De plus, les basophiles peuvent libérer un facteur « eosinophils chemotatic factor of anaphylaxis » (ECFA), ce qui permet d'attirer les éosinophiles au tissu cible, favorisant ainsi la réaction allergique (Lichtenstein *et al.*, 1978).

Les neutrophiles mesurent de 10 à 15 μm et sont caractérisés par leur noyau polylobé comprenant de trois à cinq lobes. Ils représentent de 50 à 70% des leucocytes du sang et ont une courte durée de vie. Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées aux sites inflammatoires où ils seront retrouvés en majorité (Mayadas *et al.*, 2014). Lorsqu'un tissu est confronté à des microbes, des débris cellulaires ou des toxines, les cellules du tissu et/ou les leucocytes résidents, tel que les macrophages et les mastocytes, sécrèteront différents médiateurs solubles chimioattractants ce qui conduira le neutrophile à quitter la circulation sanguine afin de migrer vers le tissu cible (Abtin *et al.*, 2014, Lammermann *et al.*, 2014). Les neutrophiles contribuent à enrayer l'infection en exerçant la phagocytose, ainsi qu'en libérant le contenu toxique de leurs granules au site inflammatoire. La sécrétion de différents médiateurs de l'inflammation par le neutrophile assure une communication efficace avec les cellules environnantes mais également avec les autres leucocytes afin de réguler la réponse inflammatoire (Cadman *et al.*, 2010). Parmi ces médiateurs, il est possible de retrouver les médiateurs peptidiques, tels que les cytokines et chimiokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 et des MIP) ainsi que des médiateurs lipidiques, tels que les leucotriènes (LT)B₄, les prostaglandines (PG)E₂ et les thromboxanes (TX)A₂ (Altstaedt *et al.*, 1996, Fitzharris *et al.*, 1987, O'Flaherty *et al.*, 1979). Après avoir effectué son rôle phagocytaire et de libération de granules, le neutrophile aura épuisé toutes ses réserves en glucose, ce qui entrainera sa mort programmée par apoptose. La mort du neutrophile formera du pus et il sera éliminé par les macrophages par phagocytose (Kolaczkowska *et al.*, 2013, Rodriguez-Espinosa *et al.*, 2015). Enfin, de par ses fonctions décrites précédemment, le neutrophile joue un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire.

L'éosinophile possède un diamètre variant de 9 à 12 μm , avec un noyau généralement bilobé et compte pour environ 1 à 3% des leucocytes présents dans le sang. L'éosine est un colorant acide de couleur orange-rosé qui se fixe sur les molécules basiques. L'éosinophile est donc appelé ainsi, puisqu'il possède plusieurs granules spécifiques ayant une grande affinité pour l'éosine. L'éosinophile est recruté au tissu cible par des mécanismes similaires à ceux permettant le recrutement des neutrophiles. Ils sont principalement recrutés aux sites de réactions allergiques et d'infections parasitaires. Ils sont également abondants sous les

épithéliums digestif et respiratoire (Rothenberg, 2004). Les granules des éosinophiles contiennent beaucoup de peroxydase leur permettant ainsi d'éliminer efficacement les parasites ou les microorganismes lorsqu'ils sont reconnus par l'éosinophile. Les éosinophiles contribuent également à éliminer par phagocytose les complexes anticorps-antigène présents lors d'une réaction allergique ou retrouvés à la surface d'un parasite (Galioto *et al.*, 2006, Herbert *et al.*, 2000). De plus, les éosinophiles peuvent participer au recrutement des lymphocytes T aux sites infectés par la sécrétion de CCL7 et de CL22 (Jacobsen *et al.*, 2008). Les éosinophiles possèdent plusieurs caractéristiques et effectuent plusieurs fonctions essentielles au système immunitaire qui seront détaillées davantage dans la section suivante de ce mémoire.

2. LES ÉOSINOPHILES

2.1 Généralités

2.1.1 Développement de l'éosinophile

Tel que mentionné précédemment, l'éosinophile est issu d'une cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse. Plusieurs cytokines dont l'IL-3, l'IL-5, et le GM-CSF qui sont produites par d'autres cellules immunitaires tels que les lymphocytes T, les mastocytes et les éosinophiles eux-mêmes (Valent *et al.*, 2012) contrôlent le développement des éosinophiles (Sanderson, 1992). Les récepteurs de surface cellulaire de ces cytokines sont exprimés très tôt chez les cellules progénitrices d'éosinophiles immatures (Lopez *et al.*, 1991). L'IL-5 est la cytokine la plus spécifique de cette lignée. Elle est principalement responsable de la différenciation et de la libération des éosinophiles de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Cela a été démontré par plusieurs études, dont une étude *in vivo* où la surexpression d'IL-5 chez la souris a provoqué une augmentation importante du nombre d'éosinophiles dans la circulation sanguine (Dent *et al.*, 1990). Une corrélation a également été observée chez l'homme entre des niveaux plus élevés d'IL-5, de GM-CSF et d'IL-3 et une augmentation du nombre d'éosinophiles dans le sang (Owen *et al.*, 1989). Ces cytokines activent principalement trois facteurs de transcription dont le GATA-1, le PU.1 et le C/EBP (McNagny *et al.*, 2002, Nerlov *et al.*, 1998). Bien que ces facteurs de transcription ne soient pas exclusifs aux éosinophiles, leurs profils d'expression spécifiques chez ces derniers permettent la régulation de la différenciation de plusieurs types cellulaires à un même ensemble de facteurs de transcription. Par exemple, l'expression graduelle du facteur de transcription PU.1 chez les éosinophiles induit la différenciation de cette lignée particulière et non pas celle de la lignée lymphocytaire. De plus, GATA-1 est connu comme étant le facteur de transcription le plus important chez les éosinophiles. Ceci a entre autre été démontré en modifiant le site de liaison de GATA-1 où une diminution de la différenciation des éosinophiles *in vivo* (Yu *et al.*, 2002) et *in vitro* (Hirasawa *et al.*, 2002) a été observée. Les éosinophiles sont les seules cellules à posséder un double site de liaison à GATA-1. Leur deuxième site permet notamment la régulation des gènes du éosinophile comme le CCR3, le « major basic protéine » (MBP), « l'éosinophile peroxydase » (l'EPO) et l'IL5R- α . De plus, les facteurs GATA-1 et PU.1 ont un rôle antagoniste dans la plupart

des lignées cellulaires, tandis que chez l'éosinophile, ils possèdent une activité synergique dans la différenciation de cette lignée (Du *et al.*, 2002).

Enfin, certaines cytokines tels que le TGF- β , l'IFN- α et l'IFN- γ permettent aussi d'inhiber la croissance ainsi que la différenciation des éosinophiles (de Bruin *et al.*, 2010). En plus de ces cytokines inhibitrices, les éosinophiles possèdent des récepteurs glucocorticostéroïdes (GC) qui inhibent également la croissance de ces derniers (Peterson *et al.*, 1981). Finalement, le développement des éosinophiles dépend en grande partie de l'activation des autres cellules immunitaires afin de produire les cytokines qui induisent spécifiquement leur différenciation.

2.1.2 Morphologie

Tel que mentionné précédemment, le cytoplasme des éosinophiles contient de nombreuses granules. Trois types de granules ont été identifiés chez les éosinophiles. D'abord, les granules primaires sont présents tôt dans le développement et la maturation de l'éosinophile et ne possèdent pas de noyau cristalloïde. Ils contiennent principalement la lysophospholipase et peuvent se condenser afin de former les cristaux de Charcot-Leyden. Les granules spécifiques aux éosinophiles, pour leur part, possèdent un noyau cristalloïde d'électron dense (Cadman *et al.*, 2010). Ce noyau cristalloïde est composé de « myc promoter-binding protein-1 » (MBP)-1, de MBP-2 et d'une matrice comportant des protéines cationiques d'éosinophiles (ECP), des neurotoxines dérivées d'éosinophiles (EDN) et des peroxydases d'éosinophiles (EPO). L'ECP et l'EDN sont des ribonucléases possédant une activité antivirale et toxique sur différents tissus. L'ECP peut également inhiber la prolifération des lymphocytes T, la synthèse d'immunoglobuline des cellules B ainsi que l'induction de la dégranulation des mastocytes. L'EPO permet quant à elle de créer des espèces hautement réactives de l'oxygène ainsi que des métabolites réactifs de l'azote afin de favoriser le stress oxydatif et la mort cellulaire (MacPherson *et al.*, 2001). Finalement, le cytoplasme des éosinophiles contient également des granules de plus petite taille invisibles en microscopie optique, qui contiennent certaines enzymes comme l'arylsulfatase et la phosphatase. En plus des nombreux granules, l'éosinophile contient des compartiments vésiculaires nommés vésicules de sombrero d'éosinophiles. Ils sont impliqués dans le transport des granules vers la membrane. Ces grands porteurs vésiculo-tubulaires peuvent transporter l'IL-4 (Melo *et al.*, 2005), les MBP (Melo *et al.*, 2009) ainsi que d'autres granules à travers la membrane plasmique. L'éosinophile peut ainsi libérer des protéines sélectives des granules via les vésicules de sombrero. La reconnaissance

d'un complexe antigène-anticorps par les récepteurs Fc, ou la liaison de diverses cytokines à leur récepteur tel que l'IL-3, l'IL-5, le TNF, le GM-CSF ou le facteur d'activation des plaquettes (PAF) sont tous des signaux favorisant la libération du contenu des vésicules de sombrero (Cadman *et al.*, 2010). La composition interne des éosinophiles ainsi que les différentes granules des éosinophiles sont représentées dans la **figure 2**. Finalement, les corps lipidiques de forme ronde et très dense contribuent à la formation de médiateurs lipidiques, tels que les leucotriènes, les prostaglandines, les cysteinyls et les thromboxanes (Rosenberg *et al.*, 2013).

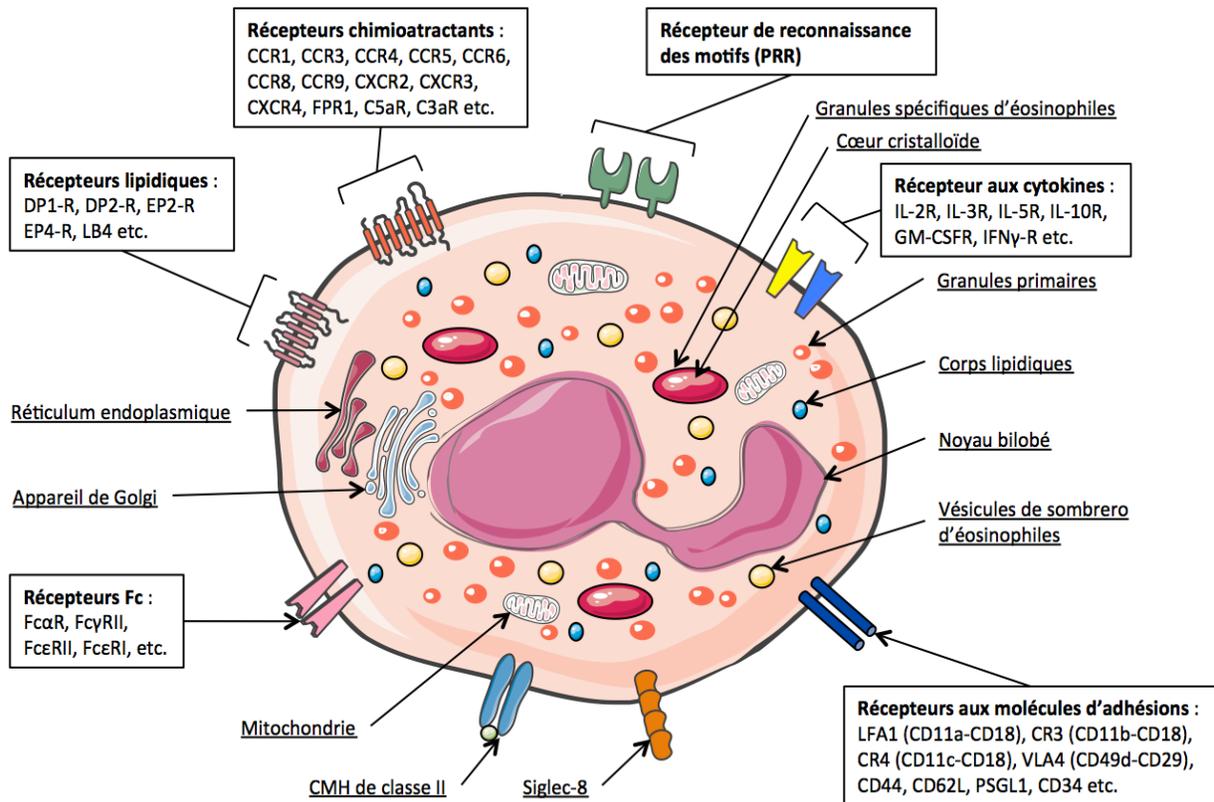


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques de l'éosinophile humain : Morphologie de l'éosinophile humain possédant un noyau bilobé et différentes granules à l'intérieur caractérisant l'éosinophile des autres cellules immunitaires. L'éosinophile possède plusieurs types de récepteurs importants à sa surface afin de pouvoir interagir avec les molécules ou les cellules de son environnement. On retrouve les récepteurs chimioattractants, les récepteurs de reconnaissance des motifs, les récepteurs aux cytokines, les récepteurs aux molécules d'adhésions, les récepteurs Fc ainsi que les récepteurs lipidiques chez les éosinophiles humains. Information extraite : (Rosenberg *et al.*, 2013)

2.1.3 Récepteurs de surface

L'éosinophile exprime plusieurs récepteurs importants à sa surface ayant différents rôles dans la régulation de la croissance cellulaire, de l'adhérence, de la chimiotaxie et de la dégranulation. Cette section sera consacrée à quelques récepteurs importants définissant l'éosinophile. D'abord, l'éosinophile exprime plusieurs récepteurs aux cytokines, dont celui pour l'IL-2, -3, -4, -5, -7, -9, -10, -15, le GM-CSF, pour la superfamille des interférons (IFN-), celui du TNF et ceux des TGF (Hogan *et al.*, 2008). Le récepteur de l'IL-5 (IL-5R α) (IL-5R β) et celui du GM-CSF (GMR α) (GMR β) jouent un rôle très important dans la physiologie de l'éosinophile. L'IL-5 produite par les lymphocytes T, les mastocytes et les cellules NK travaille en synergie avec d'autres cytokines comme l'IL-4, IL-3 et d'autres chemoattractants afin d'activer et de recruter les éosinophiles aux tissus cibles (Rosenberg *et al.*, 2013).

Les récepteurs aux chimiokines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'éosinophile exprime le récepteur aux chimiokines C-C (CCR3) ce qui permet de favoriser la chimiotaxie des éosinophiles. Ce récepteur permet la liaison de l'éotaxine-1 (CCL11), de l'éotaxine-2 (CCL24) et de l'éotaxine-3 (CCL26), qui lui permet la plus forte activation de la migration de l'éosinophile. Elle permet également la liaison du CCL5, du CCL8, du CCL7 et du CCL12. Une fois liées au CCR3, ces cytokines contribuent à l'activation de l'éosinophile. (Lloyd *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2013). De plus, les éosinophiles peuvent eux-mêmes favoriser leur recrutement sécrétant des chimiokines dont le CCL11, le CCL5, le CCL2, le CCL3 et l'IL-8 (Decot *et al.*, 2006). On retrouve aussi le récepteur de la prostaglandine D2 (CRTH2) jouant un rôle important dans les réactions allergiques inflammatoires, dont l'asthme (Hirai *et al.*, 2001).

Les éosinophiles expriment également à leur surface des protéines capables de se lier aux lipides et aux glucides. En effet, la lectine de type immunoglobuline à acide sialique, siglec 8, est exprimée chez les éosinophiles humains, tandis que chez la souris, nous retrouvons le siglec-F (Bochner, 2009). La liaison du glucide 6'-sulfo-sLe(x), un ligand connu de siglec 8, induit l'apoptose des éosinophiles préalablement stimulés à l'IL-5 (Hudson *et al.*, 2009), ce qui peut être intéressant comme cible thérapeutique potentielle.

Les éosinophiles expriment également plusieurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) à la surface des éosinophiles. Les motifs reconnus sont des composés

microbiens associés au pathogène dont l'expression est absente chez les cellules de l'hôte. Parmi les PRR, la famille des récepteurs « toll-like » (TLR) est exprimée chez les neutrophiles et les macrophages, ainsi que chez les éosinophiles humains et de souris en plus petites quantités. Afin d'augmenter la spécificité de la réponse, les cellules immunitaires peuvent utiliser une combinaison de plusieurs TLR. L'éosinophile exprime plusieurs TLR tels que le TLR1, le TLR4, le TLR7, le TLR9 et le TLR10 (Nagase *et al.*, 2003). Le TLR7 est l'un des plus importants chez les éosinophiles. L'activation de l'éosinophile par l'IL-5 augmente la sensibilité aux ARN simple brin du TLR7, ce qui accroît la sécrétion d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire. De plus, le TLR7 joue un rôle dans la migration, la chimiotaxie, l'adhérence ainsi que dans la survie cellulaire des éosinophiles (Mansson *et al.*, 2009).

En plus, les éosinophiles expriment plusieurs intégrines de surface ayant des rôles dans l'adhérence cellulaire, la migration cellulaire et dans la survie cellulaire. Les intégrines forment une famille de récepteurs hétérodimères composés d'environ 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β (Hynes, 2002). On retrouve sept intégrines dont le CD49d, le CD49f, le CD11a, le CD11b, le CD11c, le CD11d et le CD49 exprimées chez l'éosinophile humain (Barthel *et al.*, 2008). Ces intégrines permettent principalement aux éosinophiles de s'attacher aux cellules épithéliales afin d'établir un canal de communication entre ces deux cellules. Les fonctions des intégrines présentes à la surface de la cellule peuvent varier selon leurs niveaux d'expression (Palecek *et al.*, 1997). Les éosinophiles expriment également les récepteurs aux intégrines comme « vascular cell adhesion protein » (V-CAM) et « Intercellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM1) (CD56) afin reconnaître les intégrines présentées par les autres cellules. Des études ont démontré que l'infiltration d'éosinophiles était corrélée avec l'expression de VCAM-1 dans les poumons, le nez et la peau de patients asthmatiques (Bentley *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1994). Enfin, le rôle spécifique et le fonctionnement de certaines molécules de surface importantes de l'éosinophile seront davantage abordés dans une autre section de ce mémoire dédiée à ce sujet.

Enfin, nous retrouvons les récepteurs Fc qui servent principalement à reconnaître les Ig. Parmi les plus importants chez l'éosinophile, on retrouve le CD64 qui permet une liaison forte avec les IgG, le CD32, qui lui permet une liaison faible avec les IgG et le CD16B permettant la liaison faible aux Ig. De plus, les récepteurs Fc de l'éosinophile permettent la reconnaissance des parasites trop gros pour être ingérés directement. Les récepteurs Fc de l'éosinophile vont reconnaître les IgE des parasites afin de pouvoir s'activer (Capron *et al.*, 1995).

2. 2 Les fonctions de l'éosinophile

2.2.1 Son activation

L'éosinophile présent dans la circulation sanguine est normalement dans un état non activé. Lorsqu'il y a un stress, par exemple causé par un pathogène, la liaison de diverses molécules grâce aux différents récepteurs de surface permet d'activer l'éosinophile. L'activation de l'éosinophile peut être caractérisée par l'augmentation de l'expression basale de plusieurs récepteurs de surface. Par exemple, l'expression des CD4, CD69, CD44 et CD122 chez l'éosinophile est augmentée suivant son activation (Conesa *et al.*, 2002). Également, la stimulation de l'IL-3, l'IL-5 ou du GM-CSF, provoque la surexpression du récepteur ICAM-1 chez l'éosinophile (Hansel *et al.*, 1992). Tel que mentionné précédemment, plusieurs autres cytokines et chimiokines chimioattractantes peuvent activer l'éosinophile et ainsi lui permettre de jouer son rôle de défense au tissu cible. L'activation d'un récepteur de surface initiera une cascade signalétique. La nature du récepteur et du ligand déterminera le type de réponse déclenchée par l'éosinophile. Dans le présent mémoire, l'accent sera mis uniquement sur deux des voies signalétiques importantes de l'éosinophile. La première voie sera celle de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt, qui joue plusieurs rôles, notamment dans la régulation de la survie cellulaire et dans celle de l'angiogenèse (Brazil *et al.*, 2001, Machida *et al.*, 2005). La deuxième voie sera celle des « mitogen activated proteins kinase » (MAPK) où l'on distingue six membres : ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 et p38. Les MAPK jouent un rôle important dans la différenciation et la croissance cellulaire, dans la survie ainsi que dans l'inflammation allergique des voies respiratoires (Kankaanranta *et al.*, 1999, Matsumoto *et al.*, 2002).

De plus, il est possible d'inhiber l'activation de l'éosinophile grâce à des récepteurs inhibiteurs présents à sa surface. L'éosinophile exprime plusieurs de ces récepteurs dont l'IRp60/CD300a, le p140, le siglec-8, l'ILT5/LIR3 et le CD33 (Munitz *et al.*, 2007). L'activation d'une cellule est un processus complexe qui dépend entre autres de signaux que cette cellule reçoit au même moment. Par exemple, l'activation de IRp60, un récepteur normalement inhibiteur, peut initier un signal inhibiteur et/ou un signal activateur dépendamment du contexte où il est activé (Munitz *et al.*, 2008). Pour conclure, l'activation de l'éosinophile est complexe et spécifique aux signaux extérieurs qu'il capte via ces récepteurs de surface. Son activation passe par plusieurs

cascades de signalisation et provoque des changements physiologiques et morphologiques importants.

2.2.2 Chimiotactisme

La chimiotaxie est un phénomène qui permet le mouvement dirigé des cellules en fonction du gradient extracellulaire de molécules chimiques présentes dans leur environnement. C'est en 1888 qu'il a été découvert que les leucocytes pouvaient converger vers les sites inflammatoires grâce à des molécules diffusées à partir de ce site (Jin *et al.*, 2008). Plusieurs molécules chimiques comme l'éotaxine 1 (hCCL11), l'éotaxine 2 (hCCL24) et l'éotaxine 3 (hCCL26) sont reconnues par les récepteurs des chimiokines afin de recruter les éosinophiles humains au site inflammatoire (Pease, 2006). Le CCL24 humain se lie davantage au récepteur CCR3, un récepteur qui est important pour la chimiotaxie. L'éotaxine peut coopérer avec d'autres cytokines et interleukines (IL-5, IL-3) afin de favoriser le recrutement des éosinophiles (Mattes *et al.*, 2003, Pope *et al.*, 2005a, Pope *et al.*, 2005b). Les récepteurs activés par l'éotaxine ou encore par l'IL-5 vont permettre l'activation des MAP kinases tels que ERK 1 et 2, p38 et PKC afin d'initier le processus de chimiotaxie (Choi *et al.*, 2003). De plus, des lipides comme les LTB, les facteurs d'activation des plaquettes (PAF), le fragment de complément C5a, le N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), le RANTES et l'IL-8 sont aussi des chimioattractants puissants des éosinophiles (Kameyoshi *et al.*, 1992, Warringa *et al.*, 1991). Plusieurs autres molécules exprimées par d'autres cellules immunitaires, comme le (MIP)-1 produit par les macrophages, peuvent aussi agir à titre de chimioattractant, (Rot *et al.*, 1992). Enfin, l'activation des MAP kinases par les chimioattractants est essentielle pour le recrutement et le déplacement des éosinophiles vers le tissu inflammatoire.

2.2.3 L'adhérence cellulaire

Le processus de recrutement des éosinophiles au site inflammatoire comporte plusieurs étapes importantes. Tel que mentionné précédemment, il y a d'abord l'activation des éosinophiles puis le processus de chimiotaxie, afin de diriger les éosinophiles dans la bonne direction. La dilatation du vaisseau sanguin engendrée par les cellules endommagées augmente le flux sanguin, facilitant le recrutement des éosinophiles au site en question. Rendu au site inflammatoire, les éosinophiles doivent traverser la barrière épithéliale du sang vers le tissu cible. Il est possible de distinguer trois étapes importantes dans ce processus : le roulement de

l'éosinophile, son adhérence et la transmigration. Ces trois étapes primordiales sont basées sur l'interaction entre les molécules d'adhésion des éosinophiles circulants et celles des cellules endothéliales. L'activation des éosinophiles par des cytokines ou par des chimiokines augmente l'expression des molécules d'adhésion à sa surface. Cela lui permettra de créer des liaisons faibles et transitoires, afin de rouler sur les cellules endothéliales. Il a été démontré que le roulement, l'adhérence et la transmigration sont médiés par différents groupes de récepteurs d'adhérence démontrés à la **figure 3**. D'abord, le roulement est effectué par l'interaction des L-sélectines (CD52L), des P-sélectines, ainsi que des intégrines $\alpha 4\beta 1$ en plus petite quantité (Sriramarao *et al.*, 2000). Les L-sélectines du éosinophile réagissent avec les molécules Glycam-1, les « mucosol adressin cellular adhesion molecule » (MadCAM-1) et les CD34 qui sont tous présents sur les cellules endothéliales (Baumhueter *et al.*, 1994). Les P-sélectines des éosinophiles se lient aux récepteurs de glycoprotéines sialylées (PSGL-1) des cellules endothéliales (Edwards *et al.*, 2000). Par contre, les E-sélectines, connues pour leur participation au roulement chez les neutrophiles, n'ont pas la même fonction chez les éosinophiles (Sriramarao *et al.*, 1996). Une étude *in vitro* montre que le GM-CSF permet une diminution du roulement des neutrophiles sans modifier l'expression des L-sélectines. Tandis que chez les éosinophiles, l'expression des L-sélectines est modulée par le GM-CSF (Sheikh Bahaie *et al.*, 2010). Cela indique que malgré leur rôle semblable, ces deux cellules ont des mécanismes qui leur sont propres. Il a été démontré que l'activation des éosinophiles par le GM-CSF augmente la force de liaison des intégrines $\alpha 4$ par son récepteur VCAM-1 (Sung *et al.*, 1997). De plus, l'état d'activation des intégrines $\beta 1$ joue un rôle important sur l'adhérence ferme ainsi que son détachement de VCAM-1. Le lacto-fucopentose III (CD15) aussi appelé « sialyl-Lewis x », permet la reconnaissance des sélectines sur l'endothélium, favorisant ainsi la fonction de roulement de l'éosinophile. Ainsi, les molécules polysaccharidiques peuvent aussi jouer un rôle dans le roulement de l'éosinophile sur l'endothélium.

Enfin, l'adhérence ferme des éosinophiles sur les cellules épithéliales résulte d'une liaison puissante entre les différentes molécules d'adhésion. La liaison des intégrines à leurs récepteurs est généralement de plus forte affinité que celle des sélectines avec leurs récepteurs. Donc, la présence accrue d'intégrines à la surface de l'éosinophile permettra une adhérence ferme sur les cellules épithéliales. Les éosinophiles expriment plusieurs intégrines utiles dans l'adhérence cellulaire dont les intégrines $\beta 1$; CD49b, CD49d, CD49e et CD49f, qui possèdent VCAM-1 comme ligand et les intégrines $\beta 2$; CD11a, CD11b, CD11c et CD18 qui elles possèdent ICAM-1 comme ligand (Bochner *et al.*, 1991). L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ hautement

exprimée chez les éosinophiles permet principalement leur adhérence à l'endothélium vasculaire des muqueuses du tractus intestinal via son ligand MadCAM (Rothenberg *et al.*, 2006). Certains chimioattractants peuvent favoriser l'interaction entre les intégrines et leur ligand, par exemple RANTES ou MCP-3 pouvant renforcer la liaison du CD49d à son ligand. De plus, l'activation de l'éosinophile par l'IL-5 ou par l'IL-3 permet l'expression des ligands des intégrines tels que ICAM-1 (Czech *et al.*, 1993), lui permettant ainsi de se fixer avec davantage de fermeté aux cellules endothéliales. Enfin, l'interaction entre les molécules d'adhésion et leur ligand permet d'activer la transcription des gènes spécifiques à l'adhérence cellulaire. Une étude a démontré que l'IL-5 augmentait l'adhérence cellulaire des éosinophiles via les intégrines $\beta 2$ en activant la voie MAP-kinase ERK 1/2 (X. Zhu *et al.*, 2002). Les voies signalétiques activées dépendent des molécules d'adhésion impliquées. Des études effectuées chez le neutrophile ont démontré que le CD18 pouvait se lier à un récepteur différent d'ICAM-1 sur les cellules épithéliales des voies aériennes humaines (Bloemen *et al.*, 1996, Tosi *et al.*, 1992). Cela témoigne de la complexité des études sur l'adhérence cellulaire, puisque les molécules d'adhésion peuvent interagir avec plusieurs ligands différents en fonction du type cellulaire avec lequel elle interagit. En plus, les signaux présents dans l'environnement, comme les cytokines et les chimiokines, peuvent aussi jouer un rôle dans l'activation des cellules endothéliales. L'expression des sélectines et des intégrines des cellules endothéliales est modulée par les différents signaux présents dans son microenvironnement. Par exemple, les cellules endothéliales exposées aux cytokines inflammatoires comme l'IL-4 ou bien le TNF- α sur-expriment ICAM-1 et VCAM-1 à leur surface (Moser *et al.*, 1992a, Moser *et al.*, 1992b).

Suivant l'adhérence ferme de l'éosinophile sur la cellule endothéliale, le processus de transmigration de l'éosinophile à travers l'épithélium vasculaire débute afin de lui permettre de rejoindre le tissu cible. Tout comme l'adhérence ferme de l'éosinophile, le processus de transmigration utilise plusieurs molécules d'adhérence, comme les intégrines $\beta 2$ / ICAM-1 ainsi que les intégrines $\alpha 4$ / VCAM-1 (Yamamoto *et al.*, 1998). La cellule passera la barrière principalement par voie paracellulaire, c'est-à-dire, entre deux cellules endothéliales. Ce passage fera appel à plusieurs jonctions entre les deux types cellulaires (Carman *et al.*, 2004). La liaison des molécules d'adhésion permettra un réarrangement des molécules de jonction entre les cellules endothéliales permettant ainsi une ouverture (Shaw *et al.*, 2001). Ce passage très restreint demande à la cellule un réarrangement des protéines du cytosquelette. La cellule sera polarisée et formera un pseudopode en réorganisant son cytosquelette d'actine afin de s'allonger vers l'avant. La contraction de la myosine II liée aux filaments d'actine fourni la

traction nécessaire à l'avancement de la cellule à travers l'endothélium (Eddy *et al.*, 2000). Par contre, ce mécanisme de transmigration est encore peu connu chez l'éosinophile et demande à être plus approfondi. Pour conclure, l'adhérence de l'éosinophile est une étape très importante pour lui permettre de se rendre au site inflammatoire afin de remplir son rôle crucial de défense soit en présence de pathogène ou dans les cas d'allergies.

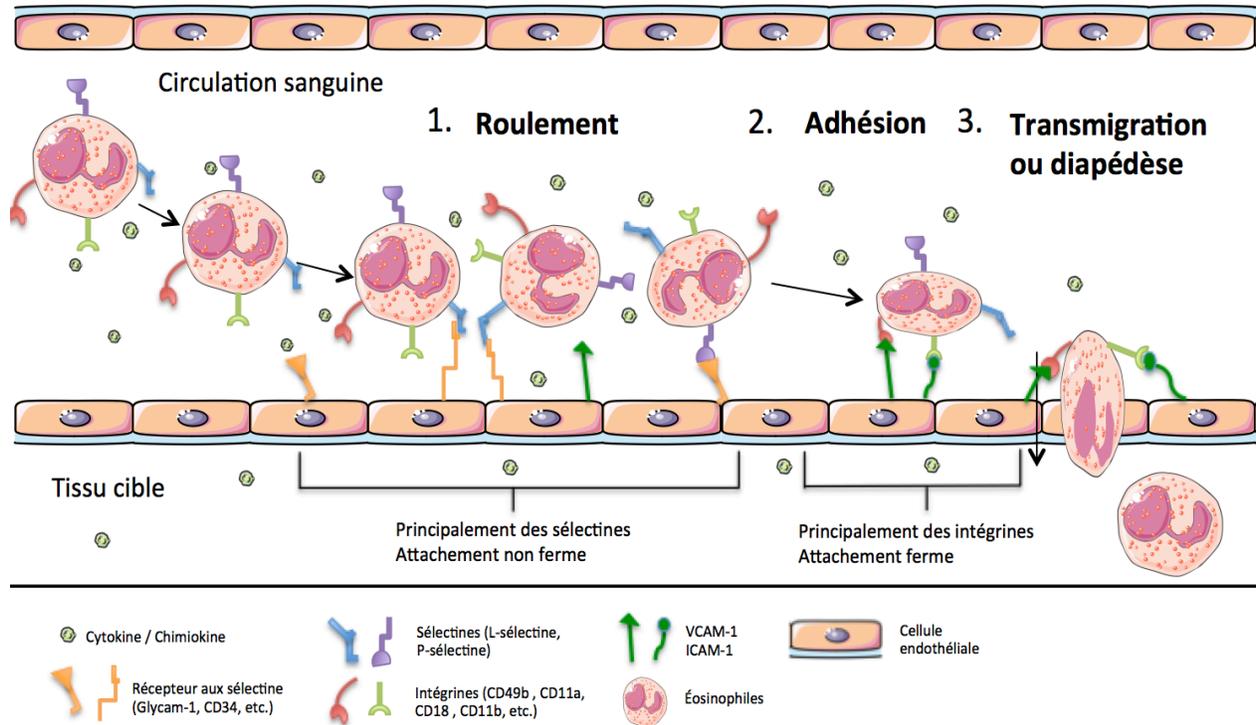


Figure 3 : Les étapes du passage de l'éosinophile vers le site inflammatoire : Le recrutement des éosinophiles de la circulation sanguine vers le tissu cible se compose en trois grandes étapes. Le roulement de l'éosinophile sur les cellules endothéliales est effectué principalement par les molécules d'adhésion, les sélectines et un peu par les intégrines. L'adhérence ferme de l'éosinophile sur les cellules endothéliales est provoquée principalement par des intégrines. La transmigration de l'éosinophile se fait à travers deux cellules endothéliales à l'aide des différentes molécules d'adhésion et le réarrangement du cytosquelette de l'éosinophile.

2.2.4 La production d'espèces réactives de l'oxygène

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est effectuée principalement par les phagocytes. Considérées comme des médiateurs inflammatoires, elles sont utiles notamment dans la défense contre les bactéries envahissantes, les protozoaires ou encore les champignons. Cependant, les ROS peuvent également causer des lésions cellulaires lors de

réponses allergiques (DeCoursey, 2016). Ces radicaux libres sont très réactifs grâce à leurs électrons non-appariés qui tentent d'interagir avec d'autres molécules afin de se stabiliser. On retrouve, principalement chez l'homme, des métabolites de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde et des radicaux hydroxyles. Lorsque ces métabolites sont secrétés, ils interagissent avec d'autres molécules ce qui provoque une cascade oxydative conduisant à la production de radicaux secondaires et tertiaires. Cela occasionne des dommages à l'ADN et aux protéines ainsi que la peroxydation de lipides membranaires pouvant causer la mort de la cellule (Mittal *et al.*, 2014). La production de ROS chez les phagocytes est principalement causée par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase. Cette dernière, également nommée NOX, forme une famille composée de sept membres : NOX1, 2, 3, 4, 5, DUOX1 et 2 (Bedard *et al.*, 2007). Le complexe NADPH oxydase est formé par deux protéines membranaires : le gp91phox (NOX2) et le p22phox qui est elle-même formée par quatre protéines cytosoliques : le Rac, le p47phox, le p67phox et le p40phox (Lapouge *et al.*, 2002). Comparativement au neutrophile, l'éosinophile a une activité NADPH oxydase beaucoup plus puissante, malgré que le niveau d'expression des diverses composantes de NADPH oxydase soit très semblable entre ces deux types cellulaires (DeChatelet *et al.*, 1977, Yagisawa *et al.*, 1996). L'assemblage de la NADPH oxydase se fait à la membrane plasmique chez l'éosinophile alors qu'elle se fait plutôt dans le cytoplasme chez le neutrophile, expliquant en partie la différence d'efficacité observée entre les deux types cellulaires (Lacy *et al.*, 2003). L'assemblage à la membrane chez l'éosinophile permet l'augmentation de sa capacité à sécréter davantage de ROS ce qui lui permet d'attaquer des pathogènes de plus grande taille comme des vers parasites créant ainsi des lésions tissulaires sur le pathogène. Pour sa part, le neutrophile phagocyte principalement de plus petits pathogènes et sa production de ROS intracellulaire contribue à les éliminer efficacement (DeCoursey, 2016). Une étude a démontré que l'éotaxine pouvait augmenter la production de ROS de façon dose-dépendante via l'activation par des protéines G et de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (Honda *et al.*, 1999). La libération de ROS dans le milieu extracellulaire augmente l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'adhérence cellulaire (Cook-Mills *et al.*, 2011). Ceci témoigne de l'utilité de la production de ROS extracellulaire par l'éosinophile dans l'adhérence cellulaire et dans la transmigration endothéliale. En plus de la NADPH oxydase, les phagocytes peuvent aussi produire des ROS en plus faible quantité via leurs mitochondries (Lambert *et al.*, 2009). Enfin, les ROS servent de défense contre les pathogènes, mais aussi de signalisation cellulaire comme messenger

secondaire régulant la production de cytokine et de chimiokine de la cellule (Fialkow *et al.*, 2007).

2.2.5 La survie et la mort cellulaire

L'apoptose est un processus normal et essentiel de mort cellulaire programmée par la cellule. Caractérisée par une diminution du volume cellulaire et par la création du corps apoptotique, la cellule morte par apoptose sera phagocytée par d'autres cellules immunitaires comme les macrophages. L'apoptose empêchera la libération de leur contenu cellulaire dont plusieurs protéines potentiellement cytotoxiques et pro-inflammatoires dans le milieu. Tel que mentionné précédemment, la durée de vie des éosinophiles peut varier dépendamment des signaux présents dans leur environnement. Ainsi, en cas d'infection par un pathogène, différentes molécules présentes au site d'inflammatoire allongeront leur durée de vie. Par exemple, l'IL-5 sécrétée par les cellules T spécifiques en cas d'allergie est le facteur de survie le plus spécifique et important chez l'éosinophile humain. Il existe d'autres facteurs de survie pour cette cellule comme le GM-CSF, l'IL-3, TNF- α , l'IFN- γ et la leptine (Conus *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2010). L'éosinophile peut sécréter le GM-CSF d'une façon autocrine afin de favoriser lui-même sa survie cellulaire au besoin (Anwar *et al.*, 1993). Les cellules épithéliales du milieu inflammatoire produisent aussi l'IL-5 et le GM-CSF, favorisant ainsi la survie de l'éosinophile. Afin d'inhiber l'apoptose des éosinophiles, l'IL-5 active la voie de signalisation des kinases JAK-2 et Lyn, ce qui provoque une diminution de translocation de la protéine BAX, réduisant ainsi leur l'apoptose (Pazdrak *et al.*, 1998). Le TNF- α est surprenamment un agent anti-apoptotique chez l'éosinophile, lui qui normalement est connu pour causer la mort cellulaire. Le rôle anti-apoptotique du TNF- α passe par l'activation de la voie de signalisation de p38 (Kankaanranta *et al.*, 1999). Également, le TNF- α peut uniquement induire l'apoptose des éosinophiles si le facteur nucléaire-kB (NF-kB) est supprimé. Donc, la survie des éosinophiles via le TNF- α est aussi dépendante de l'activation du NF-kB (Fujihara *et al.*, 2002). Pour sa part, la leptine présente lors de maladies allergiques ou parasitaires, permet l'activation de la voie PI3 kinase entraînant ainsi l'inhibition de la voie de mort mitochondriale (Najib *et al.*, 2002). Enfin, les signaux anti-apoptotiques présents aux sites inflammatoires permettent la survie des éosinophiles afin de jouer efficacement leur rôle de défense au tissu cible.

Après avoir joué son rôle de défense au site inflammatoire, la cellule recevra des signaux pro-apoptotiques. L'élimination des cellules apoptotiques par efferocytose modifiera les cytokines présentes au site inflammatoire, passant d'un profile pro à un profil anti-inflammatoire. Ceci

initiera le processus de résolution de l'inflammation et permettra ultimement le retour à l'homéostasie du tissu. Chez l'éosinophile, plusieurs caspases jouent un rôle dans l'apoptose dont les caspases 3, 6, 7, 8 et 9 (Dewson *et al.*, 2001). L'apoptose peut être initiée en activant principalement deux voies distinctes : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est activée par la liaison de certaines molécules à des récepteurs de morts. Par exemple, Fas ligand qui se lie à Fas ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de la pro-caspase 8 (Park *et al.*, 2010). L'activation de la caspase 8 génèrera une cascade d'activation des caspases exécutoires, principalement celle de la caspase-3, qui mènera à l'activation des endonucléases engendrant ainsi l'apoptose de la cellule. Durant le processus d'apoptose, les protéines nucléaires et celles du cytosquelette seront dégradées par les différentes protéines activées. La seconde voie apoptotique est la voie intrinsèque, qui elle est indépendante des récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule. Cette voie est activée lorsque l'équilibre des protéines de la famille Bcl-2 est détruit. Une surexpression de Bcl-xL permet la survie de la cellule tandis que la surexpression de Bax conduit à l'apoptose. L'IL-5 et le GM-CSF augmentent la survie cellulaire principalement en stimulant l'expression de Bcl-xL puisqu'ils ne modulent pas l'expression des récepteurs de mort permettent entre autre d'augmenter la survie cellulaire en augmentant l'expression de Bcl-xL (Dewson *et al.*, 2001, Luttmann *et al.*, 1998). Malgré le peu de mitochondries que possèdent les granulocytes, il a été démontré que la libération du cytochrome C de la mitochondrie pouvait activer la caspase-9, jouant un rôle important dans l'apoptose de l'éosinophile (Peachman *et al.*, 2001). Il est aussi connu que l'IL-5 est assez puissant pour inhiber l'activation des caspases pro-apoptotiques causé par la staurosporine (Dewson *et al.*, 2001). Bref, sans stimulation de cytokine anti-apoptotique lors de l'inflammation, les cellules mourront rapidement par apoptose, les empêchant d'accomplir leur rôle de défense efficacement. Par contre, lorsque celles-ci ont joué leur rôle de défense au site inflammatoire, elles doivent mourir par apoptose afin de résorber l'inflammation du tissu. Cependant, les éosinophiles qui ne meurent pas rapidement sont souvent la grande cause des dommages au niveau des épithéliums bronchiques et de l'œsophage.

L'efferocytose altéré ou incomplète de ces cellules peut contribuer au développement de maladies inflammatoires chroniques (Savill *et al.*, 2000). Donc, la reconnaissance des cellules apoptotiques, par exemple par les macrophages, est essentielle pour le retour à l'homéostasie du tissu cible. Tout est une question d'équilibre entre la survie et la mort cellulaire des éosinophiles.

2.3 Éosinophile et maladie humaine

L'inflammation peut être causée par plusieurs événements. Le recrutement des éosinophiles est souvent un signe d'apparition d'une maladie. Ce recrutement cause souvent une exacerbation de la maladie, appelée l'inflammation éosinophilique. Ils jouent un rôle important dans plusieurs types d'allergies comme l'asthme ou bien l'eczéma atopique. De plus, l'accumulation d'éosinophiles dans le tractus gastro-intestinal peut aussi causer des troubles d'hypersensibilité (Park *et al.*, 2010, Rothenberg, 2004). Dans ce mémoire, seulement deux des maladies les plus importantes associées à l'éosinophile seront abordées, soit les infections aux parasites et l'asthme éosinophilique.

2.3.1 Infection parasitaire

Les éosinophiles sont associés d'emblée à la défense contre les vers parasites. Tel que discuté précédemment, l'éosinophile a la capacité de libérer des ROS extracellulaires, ce qui lui permet ainsi de pouvoir s'attaquer à de gros parasites comme les vers parasites. Ces derniers sont principalement des helminthes regroupés en trois familles distinctes : les trématodes, les cestodes et les nématodes. Les vers parasites, tel que l'Angiostrongyliasis costaricensis, l'ascariasis, les vers ronds, le strongyloïdiosis, le trichinosis, le schistosomiasis, le clonorchiasis, et le paragonimiasis sont tous connus pour leur recrutement des éosinophiles (Park *et al.*, 2010) (Hagan *et al.*, 1985). Bien que l'infection par les vers parasites soit non-mortelle, elle cause souvent une infection chronique. Plus de deux milliards de personnes en sont infectées (Anthony *et al.*, 2007). Lors d'infections par un vers parasite, il y a production d'IL-4, d'IL-13, d'IgE et d'IL-5 par le système immunitaire (Anthony *et al.*, 2007). L'infection par les vers parasites stimule la sécrétion des granules secondaires des éosinophiles *in vivo* (Behm *et al.*, 2000, Ganley-Leal *et al.*, 2006). De plus, l'éosinophile produit des cytokines régulatrices comme l'IL-13 et l'IL-4, en plus de pouvoir présenter l'antigène du vers parasite aux cellules T (Padigel *et al.*, 2006). Plusieurs études sur les souris infectées par des vers parasites ont été effectuées dans les dernières années afin de mieux comprendre la réponse immunitaire. Certaines études démontrent que l'épuisement des éosinophiles ne semble pas nuire significativement à la réponse immunitaire face aux vers parasites *in vivo* (Brunet *et al.*, 1999, Holland *et al.*, 2005). Ces résultats remettent en question l'importance des éosinophiles dans la réponse contre les vers parasites. Toutefois, ces études sont particulières, puisque les souris ne sont pas des hôtes naturels de la plupart des parasites utilisés. Également, il s'agit peut-

être simplement d'un mécanisme différent qui prend le relais en absence d'éosinophiles, témoignant d'une certaine redondance dans la défense contre les vers parasites. Bref, le combat contre les vers parasites semble plus complexe qu'il en avait l'air, rendant le développement d'un vaccin pour lutter contre les vers parasites difficile étant donné le manque de compréhension de la réponse immunitaire dirigée contre eux.

2.3.2 Asthme éosinophilique

L'asthme éosinophilique est causé par un recrutement accru d'éosinophiles dans les voies respiratoires, causant ainsi une inflammation. La réaction allergique des voies respiratoires est causée par une cascade de réponse immunitaire dirigée par les lymphocytes T produisant des cytokines Th2. Cette production de cytokines Th2 favorise le recrutement des éosinophiles vers les voies respiratoires. L'augmentation des éosinophiles dans les tissus ou encore dans le sang est souvent associée au phénotype de l'asthme. De plus, la gravité de la maladie est corrélée avec l'augmentation de la présence des éosinophiles dans le tissu. Les éosinophiles de patients asthmatiques présents dans les voies aériennes ont une capacité accrue à adhérer. La surexpression de certains récepteurs aux intégrines et l'augmentation de la force de liaison entre ces récepteurs (VCAM-1, ICAM-1) et leur ligand (CD11b, CD18) chez les éosinophiles asthmatiques pourrait expliquer cette hausse de l'adhérence (Barthel *et al.*, 2006, Park *et al.*, 2010). Également, la protéine granuleuse MBP, produite par les éosinophiles, est retrouvée à des concentrations suffisantes afin d'induire la cytotoxicité d'un tissu dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des personnes asthmatiques (Frigas *et al.*, 1986, Park *et al.*, 2010). Les MBP ont été identifiés comme étant impliqués dans l'hyperréactivité des voies respiratoires en agissant sur les muscles lisses, provoquant ainsi un désordre du rôle des récepteurs muscariniques vagonaux M2 (Jacoby *et al.*, 1993). De plus, le MBP sert de signal déclencheur de dégranulation des mastocytes et des basophiles causant ainsi encore plus d'inflammation au tissu (Park *et al.*, 2010). La libération de cystéinyl leucotriène (cysLT) par l'éosinophile accroît la perméabilité vasculaire, la production de mucus local et la constriction des muscles lisses. Le tout cause des dommages aux voies respiratoires (Bandeira-Melo *et al.*, 2002). Donc, un traitement inhibant le cysLT sert d'agent thérapeutique contre l'asthme éosinophilique, mais malheureusement, ce n'est pas suffisant pour éliminer complètement tous les symptômes. Plusieurs études démontrent qu'il est possible d'inhiber plusieurs effets de l'asthme en neutralisant l'IL-5 (Foster *et al.*, 1996, Hamelmann *et al.*, 2001). Par conséquent, des études précliniques récentes démontrent que l'utilisation d'un anti-IL-5 permet de diminuer le

recrutement des éosinophiles pulmonaire d'environ 55%. Cela démontre que d'autres molécules régulent le recrutement des éosinophiles aux poumons (Flood-Page *et al.*, 2003). Ainsi, le traitement anti-IL-5 ne permet pas à lui seul de résoudre complètement l'asthme éosinophilique. La prise de corticostéroïde est aussi utilisée en clinique afin de traiter les patients souffrant d'asthme éosinophilique (Alangari, 2014). Les corticostéroïdes sont également largement utilisés dans de nombreuses maladies inflammatoires et immunitaires. Il est aussi connu que l'IL-13 joue un rôle conjoint avec l'IL-5 dans la stimulation des éosinophiles dans l'asthme. De plus, l'éotaxine favorise le recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes (Pope *et al.*, 2001). Des stratégies thérapeutiques visant la signalisation de l'IL-5, de l'IL-13 ou l'éotaxine pourrait s'avérer efficace. Voilà pourquoi aujourd'hui, nous pouvons retrouver le mépolizumab, un anticorps monoclonal humain contre l'IL-5. Ce dernier empêcherait l'activation des éosinophiles par l'IL-5, et donc, diminuerait l'inflammation des voies respiratoires (Powell *et al.*, 2015). Ce traitement a été approuvé le 4 novembre 2015 par la FDA comme antagoniste de l'IL-5 pour les patients âgés de 12 ans et plus (Fala, 2016). À ce jour, plusieurs évidences montrent que les éosinophiles jouent un rôle important dans l'établissement des symptômes liés à l'asthme. Par contre, le recrutement et l'exacerbation des symptômes de l'asthme éosinophilique ne sont pas totalement compris, et davantage de recherche est nécessaire afin d'en élucider les mécanismes précis.

3. LES NANOPARTICULES

3.1 Caractéristiques d'une nanoparticule

La nanoscience est considérée comme l'étude des phénomènes et des manipulations de matériaux à l'échelle atomique, moléculaire ainsi que macromoléculaire, tandis que la nanotechnologie est plutôt définie par la conception, la caractérisation, la production d'un système contrôlant la forme et la taille à l'échelle nanométrique (Aslan *et al.*, 2005). L'intérêt de la nanotechnologie est sans cesse grandissant puisqu'elle peut avoir des avantages importants notamment pour la médecine, pour la protection de l'environnement, pour la production d'énergie et pour l'exploration spatiale (Gatoo *et al.*, 2014). Les nanoparticules (NPs) novatrices sont particulières puisque leur taille nanométrique permet au nanomatériau de posséder des propriétés physico-chimiques et biologiques très différentes de leur propriété conventionnelle. Ces différentes caractéristiques physico-chimiques sont influencées grandement par leur taille, leur surface, leur forme, leur solubilité, leur état d'agglomération, leur morphologie et leur structure cristalline, ce qui influence également leur toxicité (Gatoo *et al.*, 2014).

Les NPs se définissent comme un matériau dont les trois dimensions se situent entre 1 et 100 nanomètres (nm) alors que pour un nanomatériau une seule dimension doit se situer entre 1 et 100 nm. En général, plus la taille des NPs est petite, plus le rapport surface par volume est grand, ce qui leur confère une surface plus réactive. De plus, la taille fait aussi varier la manière dont le corps réagira face à sa distribution (l'endocytose, l'absorption) ainsi que dans son élimination (Aillon *et al.*, 2009, Gatoo *et al.*, 2014). De plus, leur taille peut aussi jouer sur leur comportement pharmacocinétique. Une étude démontre que les NPs d'or de moins de 50 nm peuvent être distribuées dans presque tous les tissus, tandis que ceux de plus de 50 nm sont rapidement séquestrés par le foie ou par la rate, empêchant ainsi sa distribution dans les autres tissus (De Jong *et al.*, 2008). Une étude chez les rongeurs a démontré que la diminution de la taille des NPs augmentaient les dommages à l'ADN et l'oxydation dans la réponse inflammatoire (Risom *et al.*, 2005). Enfin, il a été démontré que plus la taille des NPs était petite, plus celles-ci étaient toxiques au niveau des voies respiratoires humaines (Gatoo *et al.*, 2014). À ce jour, nous savons que la taille des NPs joue un rôle très important sur leur mode d'action et leurs propriétés physico-chimiques.

Les NPs peuvent être produites sous différentes formes, par exemple, en sphère, en fils, ou encore en étoile. La forme des NPs joue aussi un rôle important sur la toxicité qu'elles peuvent avoir. Il a été observé que certains processus, comme la phagocytose, pouvaient être beaucoup plus difficiles à effectuer sur des NPs en forme de tige ou de fibre comparativement aux NPs de forme sphérique (Champion *et al.*, 2006, Verma *et al.*, 2010). Une étude sur le dioxyde de titane (TiO₂) a démontré que cette NP sous forme de fibre était plus cytotoxique que celle-ci sous forme sphérique (Hsiao *et al.*, 2011). Bref, les NPs peuvent être présentes sous différentes formes, ce qui leur permet d'avoir une toxicité différente dans le corps.

Les NPs possèdent également une charge de surface qui leur permet de réagir plus facilement ou non avec d'autres particules du système biologique. Cette charge peut faire varier son absorption, sa liaison aux protéines ainsi que sa capacité à traverser une membrane. Si la NP possède une charge positive à sa surface, elle sera plus facilement opsonisée par les protéines plasmatiques, ce qui lui permettra d'être plus facilement phagocytée (Gatoo *et al.*, 2014). Donc, la charge de surface des NPs leur permet aussi de se lier à d'autres molécules comme des protéines, mais aussi de former des agglomérats de NP, ce qui par conséquent, modifie la forme et la taille de celle-ci. De plus, cette charge de surface peut aussi altérer l'intégrité et la perméabilité de certaines membranes du corps comme la barrière hématoencéphalique. Une étude a démontré que les NPs ayant une charge négative administrées par voie cutanée arrivaient à pénétrer dans la peau, tandis que les NPs chargées positivement ou neutres et de même taille, n'y arrivaient pas (Kohli *et al.*, 2004). Enfin, les interactions des NPs avec le système biologique sont grandement influencées par la charge de surface que peuvent avoir les NPs.

Ainsi, plusieurs autres particularités que possèdent les NPs peuvent faire varier leurs mécanismes d'actions. Des NPs de taille et de forme semblable peuvent donc avoir des effets toxiques très différents. Par exemple, la structure cristalline peut aussi jouer sur le fonctionnement des NPs. Cette structure peut varier dépendamment du milieu dans lequel la NP se retrouve (H. Zhang *et al.*, 2003). Les propriétés physiques et chimiques de surface des NPs, comme la rugosité et la capacité hydrophobe, jouent aussi un rôle important dans le système biologique, par exemple dans l'absorption ou encore dans l'adhérence cellulaire (Nel *et al.*, 2009). Pour conclure, les NPs possèdent plusieurs caractéristiques différentes qui peuvent toutes faire varier leur mode d'action, leur absorbance, leur distribution et leur toxicité. L'étude des NPs est présentement en plein essor, et cela, depuis plusieurs années. La capacité que

celles-ci peuvent avoir dans la médecine d'aujourd'hui ainsi que la diversité et la complexité que peuvent avoir les différentes NPs sur le corps humain sont les deux champs d'intérêts majeurs motivant leur étude.

3.2 La nanotoxicologie

3.2.1 Présence dans l'environnement

Les NPs peuvent se trouver sous forme naturelle ou sous forme synthétique, c'est-à-dire, créée par l'homme. L'environnement lui-même crée naturellement des NPs que l'on retrouve partout. Parmi les NPs naturelles que l'on retrouve dans l'environnement, il y a les NPs minérales et inorganiques qui peuvent être d'origine atmosphérique, géologique ou même biologique. Les NPs de type minéral proviennent principalement du sol ainsi que des systèmes géologiques. Il y a aussi les aérosols présents naturellement dans l'atmosphère qui sont à la base de la chimie atmosphérique (Taghavi *et al.*, 2013). En plus, nous retrouvons des NPs dans les eaux naturelles que nous appelons la matière colloïdale. De plus, la combustion naturelle cause une libération de particules de toutes sortes de tailles, dont celles à l'échelle nanométrique. La suie nanoparticulaire libérée par la combustion se projette dans l'atmosphère et fini par retomber, bien souvent, au sol. La combustion artificielle produit aussi de la suie connue sous le nom de noir de carbone. Celui-ci participe entre autre à la fabrication de caoutchouc pour les pneus (Taghavi *et al.*, 2013). On retrouve aussi naturellement dans l'environnement des NPs de fullerènes et des nanotubes qui peuvent aussi être d'origine synthétique. D'une provenance particulière, les NPs de fullerènes et les nanotubes naturels proviennent de météorites et de comètes provenant de l'espace (Heymann *et al.*, 2003). Donc, nous retrouvons plusieurs catégories de NPs produites naturellement dans notre environnement témoignant de l'importance d'accroître les connaissances en matière de nanotoxicologie.

En plus des NPs artificielles présentes dans notre environnement, nous retrouvons aussi de plus en plus de NPs produites par l'homme. L'homme se sert de certaines NPs dans la confection de divers produits. Par exemple, les fullerènes sont utilisés dans la confection de composite polymère ainsi que dans des dispositifs électro-optiques grâce à leur faible solubilité dans l'eau (Taghavi *et al.*, 2013). Certaines NPs sont aussi utilisées en médecine pour de diverses applications, dont le transport et la délivrance de médicaments. On utilise aussi des NPs de polymère afin d'améliorer le sol ainsi que les eaux souterraines. L'humain produit aussi lui-même des NPs inorganiques servant dans plusieurs matériaux. Par exemple, des NPs d'argent sont utilisées comme agent bactéricide, des NPs d'or sont utilisées dans plusieurs produits pour leurs propriétés catalytiques (Taghavi *et al.*, 2013). Il existe des milliers autres exemples de produits de tous les jours dans lesquels il est possible de retrouver des NPs. Tel

que mentionné précédemment, les NPs possèdent des caractéristiques particulières, ce qui provoque un important engouement dans l'utilisation de celles-ci par l'homme dans le but de remplacer certaines particules plus toxiques. Il est donc très important de bien caractériser chacune des NPs utilisées. Enfin, l'homme est donc responsable en grande partie de la quantité et de la variété des NPs présentes dans l'environnement.

3.2.2 L'exposition humaine

Avec la nanotechnologie sans cesse grandissante, les NPs se retrouvent dans plusieurs domaines, dont la construction, la peinture, la médecine, l'alimentation, les cosmétiques, l'électronique, l'optique, le textile, l'énergie et l'agriculture. Plusieurs centres de recherche et universités, avec l'aide des financements gouvernementaux, ont commencé à faire de plus amples recherches en nanotechnologie (Sajid *et al.*, 2015), ce qui a donc provoqué plusieurs questionnements au sujet de l'impact des NPs sur l'environnement, mais aussi sur la santé humaine. La croissance rapide de produits comportant des NPs crée un besoin urgent à augmenter la recherche de la toxicité potentielle de toutes ces NPs présentes partout autour de nous. Plusieurs travailleurs sont fortement exposés aux NPs, comme les ouvriers en construction, en transport de pétrole, en agriculture ainsi que tous ceux qui travaillent dans les usines de fabrication des NPs (Taghavi *et al.*, 2013). L'impact des NPs en milieu de travail dépend aussi de comment ceux-ci sont utilisés et séparés dans les différents milieux. La manipulation de ceux-ci permet de contrôler leur stabilité et leur capacité volatile. Plusieurs études sont actuellement en cours afin de quantifier le niveau d'exposition de certains travailleurs. En plus de ces recherches, plusieurs autres recherches approfondies sont nécessaires pour évaluer le potentiel toxique sur le système biologique. De plus, le « National science foundation » en 2007 a estimé qu'environ 70 milliards de dollars de produits contenant des NPs ont été vendus en un an uniquement aux États-Unis (Kessler, 2011). Donc, il ne faut surtout pas croire que ce sont seulement les travailleurs qui sont exposés aux NPs, puisque la nourriture ou encore l'emballage des biens achetés en contiennent également (Sajid *et al.*, 2015).

L'exposition humaine aux NPs peut se faire via trois voies : cutanée, respiratoire et digestive. Suivant l'entrée dans le corps, les NPs pourront atteindre le système respiratoire et la circulation sanguine (Pattan *et al.*, 2014). En ce qui concerne la voie cutanée, il est possible de retrouver l'application directe de cosmétiques sur la peau, telles que les crèmes pour la peau ou

bien les crèmes solaires contenant des NPs de TiO_2 et d'oxyde de zinc (ZnO). Plusieurs autres exemples d'une exposition cutanée peuvent être nommés comme le produit de combustion qui retombe sur la peau, les résidus nanoparticulaires lors d'épilation à la cire ou bien des émissions de particules lors du soudage (Sajid *et al.*, 2015). Plusieurs mécanismes de pénétration des NPs à travers la peau existent qui ne seront malheureusement pas abordés dans le présent mémoire. En ce qui a trait à la voie respiratoire, les NPs peuvent se rendre jusqu'à l'épithélium profond dans les poumons et ainsi y déclencher une inflammation dans les poumons. Étant donné qu'il s'agit d'une particule solide qui se loge dans les poumons, la réponse du corps sera différente que s'il s'agit d'un gaz ou bien de liquides volatils (Sajid *et al.*, 2015). L'élimination d'une particule dans les poumons dépend de l'interaction de la particule avec la cellule, ainsi que de la profondeur de cette particule dans les poumons. Leur petite taille leur permet de traverser les barrières tissulaires afin de rejoindre le sang et de se propager vers d'autres organes (Oberdorster *et al.*, 2005). Les NPs peuvent même atteindre les alvéoles où elles entreront en contact avec les molécules d'air (Borm *et al.*, 2006). La voie par ingestion comporte principalement les NPs retrouvées dans la nourriture ainsi que dans les médicaments. On retrouve des NPs dans certains aliments modifiés, par exemple, le NP de TiO_2 sont présents dans le yaourt afin d'y donner sa couleur blanche. Notre nourriture peut également en contenir sans le vouloir, par exemple via l'accumulation de déchets marins menant à la présence de NPs dans nos fruits de mer ou nos poissons (Ward *et al.*, 2009). L'ingestion par le tractus gastro-intestinal permet l'entrée des NPs dans les tissus lymphatiques (Teow *et al.*, 2011). Les caractéristiques physico-chimiques des NPs sont importantes dans l'absorption par cette voie. Bref, l'exposition de l'homme aux NPs est de plus en plus importante, en plus d'avoir des mécanismes d'action, pour la plupart, méconnus. Donc, les études sur l'exposition de l'homme aux NPs, ainsi que l'étude de la toxicité que celles-ci peuvent avoir sur l'homme sont d'une très grande importance.

3.3 Les différentes nanoparticules

On retrouve des milliers de NPs différentes dans notre environnement. Tel mentionné précédemment, certaines parmi celles-ci sont d'origine naturelle et d'autres sont soit créées ou modifiées par l'homme. Nous discuterons alors brièvement de certaines NPs qui sont présentes et largement utilisées dans les industries. Bref, les NPs dont il sera sujet sont toutes soit présentes dans notre environnement, soit qu'elles sont présentement ou ont déjà été en étude toxicologique.

Les NPs d'or (Au⁺, Au⁻) sont présentement à l'étude en tant que produit thérapeutique contre le cancer. Elles pourraient servir de véhicule pour certains médicaments (Arvizo *et al.*, 2010). Leur diamètre peut facilement atteindre jusqu'à 1 nm si désiré. Il est possible de déproportionner les ions d'au avec l'aide de dendrimères, permettant de modifier plus facilement la charge et la taille de ces NPs (Bergamini *et al.*, 2007). Donc, il est fortement pertinent de connaître la toxicité de cette NP avant que celle-ci soit utilisée dans de véritables contextes cliniques. Cette NP a démontré qu'elle pouvait s'introduire à l'intérieur des cellules afin d'interagir avec la membrane, les mitochondries et le noyau des cellules (Pan *et al.*, 2009). Une autre étude démontre que les NPs d'au peuvent induire l'apoptose via un mécanisme capsase-dépendant en plus d'induire la dégradation des protéines du cytosquelette du neutrophile humain (Noel *et al.*, 2016).

L'oxyde de zinc (ZnO) sous forme nanoparticulaire est déjà utilisé dans plusieurs produits tel que le caoutchouc, les cigarettes, la crème solaire à base de zinc, dans plusieurs autres crèmes pour la peau ainsi que dans la nourriture comme les céréales. Il est utilisé principalement pour sa capacité à absorber les rayons UVA et UVB (Song *et al.*, 2011), ainsi que pour son activité antimicrobienne (Reddy *et al.*, 2014). Des études toxicologiques du ZnO ont démontré que celui-ci cause une libération de ROS dépassant la capacité antioxydante, ce qui conduit à la mort des cellules (Rasmussen *et al.*, 2010). En plus, une récente étude dans notre laboratoire a démontré que les NPs de ZnO avaient des effets contraires à ce qui était connu dans la littérature sur la production de ROS, en plus de retarder l'apoptose des éosinophiles humains (Silva *et al.*, 2016). Cela démontre l'importance d'évaluer la toxicité des NPs sur plusieurs types cellulaires, puisque ceux-ci peuvent avoir des effets différents d'une cellule à l'autre.

La NP de dioxyde de cérium (CeO_2) est utilisée dans divers produits, dont les convertisseurs catalytiques, les moteurs diesel et dans certains additifs de carburant (Leung *et al.*, 2015). Son utilisation dans ces produits se veut grâce à sa capacité de redox unique, lui permettant notamment des applications dans l'optoélectronique et la photocatalytique (Mao *et al.*, 2008). Malgré plusieurs études contradictoires sur la toxicité du CeO_2 , celui-ci causerait du stress oxydatif (Eom *et al.*, 2009) ainsi que des lésions membranaires aux cellules qu'il rencontre (I. S. Kim *et al.*, 2010). Ainsi, d'autres études démontrent qu'il peut jouer un rôle d'antioxydant causant des pièges aux radicaux libres (Amin *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2008). Enfin, la panoplie d'études contradictoires entourant la toxicité de la NP de CeO_2 démontre que les NPs peuvent jouer divers rôles qui dépendent de plusieurs facteurs.

Les NPs métalliques comme le platine (Pt) et le palladium (Pd) ont toutes les deux une forte activité catalytique. Celle-ci leur est due grâce à leur forte proportion d'atomes métalliques à leur surface. Cela leur permet d'agir comme antioxydant, ce qui explique ainsi l'intérêt de leur utilisation dans la science médicale et au sein de certaines thérapies (Shibuya *et al.*, 2014, Yoshihisa *et al.*, 2010). En plus, ces NPs sont utilisées dans les convertisseurs d'échappement automobile et comme capteur électrochimique. Cette utilisation dans l'industrie automobile provoque une nette augmentation du taux de ces NPs dans les poussières routières ainsi que sur les sols routiers (Speranza *et al.*, 2010). La NP de platine a démontré une activité inhibitrice de l'apoptose induite par les rayons UV, ainsi qu'une diminution de l'inflammation induite par les UVB (Yoshihisa *et al.*, 2010). Une autre étude a aussi démontré que la NP de Pd pouvait causer l'apoptose par l'activation des caspases des cellules épithéliales bronchiques (Wilkinson *et al.*, 2011). Malgré les études publiées à ce jour, plusieurs informations concernant le mode d'action de ces NPs vis-à-vis la complexité du système biologique humain demeurent tout de même manquantes.

Il existe encore d'autres NPs importantes comme la magnétite (Fe_3O_4) qui elle est utilisée afin d'éliminer les métaux lourds grâce à leur propriété magnétique et leur stabilité chimique (Rajput *et al.*, 2016). La NP d'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) disponible sous différentes tailles a montré qu'elle pouvait s'introduire à l'intérieur de la membrane des cellules humaines sans causer l'augmentation de l'apoptose de celles-ci (Radziun *et al.*, 2011). Nous retrouvons des centaines d'autres NPs dans la littérature qui agissent de différentes manières, que ce soit par leur absorption, leur distribution ou même par leurs niveaux de toxicité. Une des NPs la plus utilisée,

étant aussi une des NPs la plus étudiée à ce jour est sans aucun doute la NP de dioxyde de titane.

3.3.1 Le dioxyde de titane (TiO₂)

Étant le neuvième élément le plus abondant de la croûte terrestre, le titane est lié à d'autres molécules grâce à sa grande affinité de liaison. Absent dans la nature sous forme de titane seul, il peut se lier à d'autres éléments comme l'oxygène (TiO₂) ou encore le chlore (TiCl₄). Le TiO₂ est présent sous forme de poudre blanche inodore et peu soluble. Il est utilisé principalement pour son pigment blanc, dont plus de quatre millions de tonnes sont consommées annuellement. Il fait partie des cinq premières NPs les plus utilisées dans nos produits de consommation, comme dans les peintures, les revêtements, les plastiques, les papiers, les écrans solaires, les cosmétiques, les médicaments et les produits alimentaires (Kaida *et al.*, 2004, Shi *et al.*, 2013, Shukla *et al.*, 2011). Il est aussi utilisé pour son pouvoir catalytique très puissant, sa haute stabilité et sa propriété anticorrosive. Le TiO₂ peut être présent sous trois formes cristallines différentes : l'anastase, le rutile et le brookite. La structure cristalline peut influencer la toxicité des NPs. Elle peut aussi varier dépendamment du milieu dans lequel celle-ci se retrouve (Gatoo *et al.*, 2014). L'anastase est la forme la plus chimiquement réactive des trois. Elle permet une libération de ROS plus élevée lorsque celle-ci est en contact avec une forte lumière UV (Sayes *et al.*, 2006, Warheit *et al.*, 2007). La forme rutile de TiO₂ ne semble pas démontrer d'activité chimique importante. Par contre, le changement physico-chimique en NP de TiO₂ sous forme rutile pourrait faire varier leur effet et devenir néfaste (Andersson *et al.*, 2011). Ainsi, la forme brookite de TiO₂ est la moins utilisée et étudiée des trois formes, puisqu'il est difficile d'obtenir cette forme cristalline pure (Di Paola *et al.*, 2013). Bref, les différentes formes cristallines de TiO₂ sont généralement créées en laboratoire dépendamment de leur utilisation dans certains produits. Leurs effets peuvent être différents selon les matériaux, mais peuvent aussi avoir des effets différents sur la santé chez l'homme.

3.4 Exposition humaine au TiO₂

D'abord, la NP de TiO₂ était considérée comme une molécule de faible toxicité qui était utilisée dans plusieurs études toxicologiques comme contrôle négatif. Cependant, des études ont démontré que celle-ci pouvait causer des tumeurs pulmonaires chez le rat après des expositions prolongées à de fortes concentrations. Ainsi, l'agence internationale de recherche sur le cancer a classé le TiO₂ comme étant cancérigène de groupe 2B (Shi *et al.*, 2013). Malgré les études controversées sur l'effet cancérigène du TiO₂, elle est tout de même largement utilisée aujourd'hui, principalement sous forme nanoparticulaire, entre autre grâce à son activité catalytique puissante. Cette NP peut être rencontrée sous forme d'aérosol, de suspension et d'émulsion, soit dans la fabrication de produits ou dans la consommation de ces produits. La FDA des États-Unis a approuvé le TiO₂ comme additif alimentaire ainsi que dans leur emballage, et ce, avant de savoir que cette particule sous forme de NP pouvait avoir des propriétés physico-chimiques et toxicologiques différentes de sa forme non-nanoparticulaire. Puisque les propriétés des NPs de TiO₂ sont différentes des propriétés de cette particule de plus grande taille, l'intérêt des études de ses conséquences sur la santé humaine est devenu grandissant. Il a été démontré que les NPs de TiO₂ étaient 40 fois plus puissantes pour provoquer une inflammation pulmonaire et des lésions chez le rat comparativement à cette particule de plus grande taille (Shi *et al.*, 2013). Les NPs de TiO₂ sont les nanomatériaux les plus utilisés dans les produits de consommation applicables sur la peau (Shi *et al.*, 2013). Une étude récente a également démontré la présence accrue de NP de TiO₂ dans les bonbons et dans les gommages à mâcher (Weir *et al.*, 2012). Les études disponibles à ce jour ont permis d'établir une limite d'exposition admissible par l'administration de la santé et de la sécurité au travail (OSHA) de 15 mg/m³ pour le TiO₂ en générale et 0,3 mg/m³ pour les NPs de TiO₂. Cette évaluation montre que le TiO₂ nanoparticulaire est dix fois plus toxique que celle-ci de taille plus importante (Shi *et al.*, 2013). Enfin, l'exposition humaine des NPs de TiO₂ est très présente de nos jours, en plus d'être facilement assimilable via l'inhalation et par voie cutanée.

La présence augmentée de produits cosmétiques et d'écran solaire contenant des NPs de TiO₂ démontre bien l'exposition cutanée à laquelle l'homme fait face aujourd'hui. Par contre, il est rassurant de savoir que plusieurs études à ce jour ont montré que la pénétration dermique de NPs de TiO₂ était absente sur la peau saine (Gamer *et al.*, 2006, Newman *et al.*, 2009, Schulz *et al.*, 2002). Grâce à la microscopie électronique à balayage (SEM), il a été possible d'observer que les NPs de TiO₂ se logeaient dans les follicules vides, sans entrer dans le derme ou dans

l'épiderme de la peau en santé (Shi *et al.*, 2013). Cependant, Bennat *et al.* (2000) ont montré que celle-ci pouvait s'introduire dans la peau via les follicules pileux ou les pores lorsqu'elle était sous forme d'émulsion d'huile dans l'eau. De plus, une autre étude prouve que la présence de cette NP dans l'épiderme de porc (avec écran solaire contenant des NPs de TiO₂) était affaiblie par des rayons ultraviolets (UVB), sans y observer une absorption transdermique (Monteiro-Riviere *et al.*, 2011). En général, les études démontrent que les NPs de TiO₂ ne pénètrent pas la partie dermique du tissu vivant.

Dans les milieux industriels, l'inhalation est la voie d'exposition la plus importante des NPs de TiO₂. La limite d'exposition de particules TiO₂ dans l'air a été établie à 50 µg/m³ pour un homme de 70kg (Simko *et al.*, 2010). Dans le tractus respiratoire, plus la particule sera petite, plus elle pourra s'infiltrer jusqu'aux alvéoles et interagir avec l'oxygène directement. Suivant une exposition par inhalation chez le rat, le TiO₂ de taille nanoparticulaire a montré une migration dans les alvéoles beaucoup plus grande que le TiO₂ de plus grande taille (Oberdorster *et al.*, 1994). Une autre étude a su démontrer que les NPs de TiO₂ de 20 nm peuvent être transportées à travers les voies aériennes chez le rat, pour ensuite être libérées dans la circulation systémique (Muhlfeld *et al.*, 2007). De plus, il est possible qu'elles puissent être absorbées par les nerfs sensoriels et pour ensuite être transportées au cerveau lorsque celles-ci sont inhalées par la voie nasale (Wang *et al.*, 2008). Donc, l'inhalation des NPs de TiO₂ suggère qu'elles pourraient passer des poumons au système circulatoire ainsi que dans les tissus, en plus de pouvoir se répandre dans le système nerveux.

Pour conclure, le fait que les propriétés physico-chimiques pouvant être différentes entre les NPs de TiO₂ et les particules de TiO₂ de plus grande taille influence la bioactivité de ces particules. Ainsi, l'information actuellement dans la littérature sur cette NP et sa toxicité est insuffisante afin d'établir une protection adéquate pour les travailleurs et les consommateurs.

3.4.1 Interaction avec les granulocytes

Certaines NPs peuvent s'introduire dans la circulation sanguine afin d'atteindre les organes et les tissus du corps suivant leur absorption initiale. Rendues dans la circulation sanguine, certaines NPs peuvent se lier aux composants plasmatiques, ce qui peut avoir un effet considérable sur leur distribution, leur métabolisme et leur excrétion (Hagens *et al.*, 2007). Par contre, celles-ci peuvent aussi interagir avec les cellules immunitaires. Les cellules immunitaires

ont un rôle très important et jouent un rôle essentiel de défense pour le corps. C'est pourquoi la recherche des effets des NPs sur les leucocytes est en pleine expansion, et ce depuis plusieurs années déjà.

Plusieurs effets des NPs sur les lignées immunitaires sont maintenant connus. Par contre, aucune étude sur les basophiles n'a été réalisée et peu d'études ont été effectuées sur les éosinophiles humains. Ceci dit, plusieurs études sur les effets des NPs ont été réalisées dans notre laboratoire sur un autre granulocyte, soit le neutrophile humain. Il a été rapidement observé qu'une même NP peut avoir différents effets tout dépendant de sa taille et du type de cellule immunitaire. Prenons l'exemple de la NP d'argent à 20 nm et à 70 nm. Les NPs d'argent à 20 nm induisent l'apoptose des neutrophiles humains tandis que l'argent 70 nm retarde plutôt la mort programmée de ces cellules. Contrairement à l'argent 70 nm, l'argent 20 nm cause une libération d'IL-8, d'albumine et de métalloprotéinase-9 (Poirier *et al.*, 2016). Une autre étude a démontré par microscopie électronique que les NPs d'or de 20 nm étaient capables de s'introduire dans les vacuoles cytosoliques tandis que celles de 70 nm étaient seulement retrouvées au niveau de la membrane cellulaire (Noel *et al.*, 2016). Enfin, il n'est pas étonnant de voir des résultats différents pour les NPs de même nature mais de taille différente (Aldossari *et al.*, 2015, Mironava *et al.*, 2010, Pan *et al.*, 2007) puisque la taille et la forme des NPs jouent un rôle important dans l'absorption cellulaire (Miethling-Graff *et al.*, 2014). Cela nous indique que les NPs de différents diamètres peuvent avoir des propriétés biologiques différentes et ainsi jouer un rôle distinct sur les neutrophiles humains.

Comme mentionné plus haut, l'une des NPs les plus utilisées est le TiO₂. Cette NP, en présence de neutrophiles humains, a su démontrer une capacité de modifier leur morphologie cellulaire de manière dose dépendante. Ainsi, il a été observé que chez le neutrophile, elle pouvait activer des voies signalétiques importantes comme les MAPKs (p38 et Erk-1/2) en plus d'augmenter la production de certaines cytokines comme l'IL-8 (Goncalves *et al.*, 2010). Aussi, il est connu que les MAPK p38 et Erk-1/2 sont impliquées dans l'apoptose des neutrophiles (Harter *et al.*, 2002, Klein *et al.*, 2000). Donc, la nanoparticules de TiO₂ pourraient jouer un rôle dans la survie et la mort cellulaire. Dans une autre étude *in vivo* avec des modèles murins d'inflammation aigüe, le TiO₂ nanoparticulaire a provoqué l'augmentation du recrutement des leucocytes ainsi que la production locale de chimiokines et d'analytes (Goncalves *et al.*, 2011). Il est maintenant connu que les NPs d'oxyde de métal comme le TiO₂, le CeO₂ et le ZnO peuvent induire de l'inflammation (Chen *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2012).

L'augmentation de la dégranulation des neutrophiles par les NPs de TiO₂, CeO₂ et ZnO, a été observée par la sécrétion accrue de la myéloperoxydase, de la métalloprotéinase-9 et de l'albumine qui sont généralement stockés dans les granules azurophils. De plus, ces NPs ont su augmenter l'expression de marqueur de surface de granule comme le CD66b et le CD63 (Babin *et al.*, 2013) ce qui témoigne, encore une fois, de la dégranulation du neutrophile. Cela démontre clairement que certaines NPs peuvent directement activer les neutrophiles humains en provoquant la sécrétion de leur granule toxique. La phagocytose est un des principaux rôles du neutrophile. Ainsi, une étude réalisée dans notre laboratoire a permis de démontrer que les NPs de TiO₂, CeO₂ et ZnO, étaient capables d'augmenter la capacité de phagocytose des neutrophiles humains via l'activation de la « spleen tyrosine kinase » (SyK) (Babin *et al.*, 2015). Cela indique clairement que les NPs d'oxyde de métal sont capables d'activer le neutrophile humain de différentes façons.

3.4.1 Interaction avec les éosinophiles

Enfin, il existe plusieurs études dans lesquelles il est question de l'importance des éosinophiles dans l'asthme allergique (Martin *et al.*, 1996). Afin de voir l'effet des NPs sur les éosinophiles, des études ont été faites sur des modèles d'asthme de souris afin de voir l'inflammation produite. Il a été observé que certaines NPs comme le ZnO ou encore le TiO₂ pouvaient induire l'inflammation par les éosinophiles dans les voies aériennes de souris (Huang *et al.*, 2015, B. G. Kim *et al.*, 2017). En plus, des études *in vivo* ont pu démontrer que certaines NPs sont capables de s'introduire à l'intérieur de l'éosinophile de souris (Geiser *et al.*, 2014, Inturi *et al.*, 2015). Par contre, peu d'études à ce jour démontrent les effets directs que peuvent avoir les NPs sur la biologie des éosinophiles. Au meilleur de mes connaissances, seulement deux études traitent des effets des NPs directement sur les éosinophiles : une des études porte sur la lignée cellulaire AML14.3D10 leucémique mimant l'éosinophile et l'autre sur les éosinophiles humains. Ces deux études permettent de voir plusieurs effets de certaines NPs sur les fonctions des éosinophiles. Les résultats sont montrés dans le tableau 1 ci-dessous. Il est possible d'observer que la plupart des résultats des NPs sur la biologie des éosinophiles est concentration-dépendante (Silva *et al.*, 2016, Vallieres *et al.*, 2016). Donc, comme il est possible de constater, peu de faits sont connus sur la toxicité directe des NPs sur les éosinophiles, et encore moins sur les éosinophiles humains. Nous remarquons aussi que les NPs peuvent agir différemment dépendamment du type cellulaire. Par exemple, nous avons vu que la NP de ZnO n'affectait pas la forme ni la taille cellulaire des éosinophiles, tandis qu'à la même concentration, celle-ci

augmente la taille et la forme des neutrophiles (Goncalves *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2016). Pour conclure, connaissant l'importance qu'ont les éosinophiles dans notre défense immunitaire, il est très important d'étudier la toxicité des NPs sur la biologie des éosinophiles afin de mieux comprendre les risques associés, permettant ainsi de mettre en place des limites et des règlements d'exposition à ces NPs.

Tableau 1 : Les effets directs connus des nanoparticules sur la biologie des éosinophiles.

Selon (Silva *et al.*, 2016, Vallieres *et al.*, 2016)

Cellule	Test	Nanoparticules				
		CeO ₂	ZnO	TiO ₂	Ag20	Ag70
AML14.3D10	Viabilité 24h	inchangé	↓	inchangé	↓	inchangé
	Pro-caspase-3,-7		inchangé		↓	
	Lamine B1 clivé	non	↑	non	↑↑	non
	Dégradation vimentine	non	non	non	non	non
	Dégradation gelsoline	non	non	non	non	non
	Dégradation vinculine	non	non	non	non	non
	Production de cytokine	non	↑↑	non	↑	non
Éosinophile humain	Viabilité 24h		inchangé			
	Forme cellulaire 48h		inchangé			
	Granularité		inchangé			
	Apoptose		↓			
	Activation caspase-4		↓			
	Expression Bcl-xL		↑			
	Production de Ros		inchangé			
	Synthèse protéique de novo		↑			
	Production IL-8		↑			
	Production IL-1β		↑			

Tableau représentant les résultats de deux études sur l'interaction des nanoparticules (l'oxyde de cérium (CeO₂), l'oxyde de zinc (ZnO), dioxyde de titane (TiO₂), argent 20nm (Ag20), argent 70nm (Ag70)) sur la biologie des éosinophiles. La première étude sur les cellules AML14.3D10 mimant l'éosinophile et la seconde sur les éosinophiles humains ont pu démontrer que certaines nanoparticules étaient capables de modifier certaines fonctions et même de prolonger la survie cellulaire des éosinophiles.

Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway

Les nanoparticules de dioxyde de titane induisent l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains sur des cellules EA.hy926 endothéliales via l'activation de la voie signalétique phosphoinositide 3-kinase/Akt.

Maxime Murphy-Marion and Denis Girard*

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

Running title: Activation of human eosinophils by TiO₂ nanoparticles

Abbreviations: NP, nanoparticle; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; VAA-I, Viscum album agglutinin-I; DLS, dynamic light scattering; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor.

Journal of Immunobiology (publier le 16 octobre 2017)

ABSTRACT

The use of nanoparticles (NPs) for developing new therapeutic strategies in a variety of diseases is gaining increasing attention. However, NPs could possess undesired effects, including pro-inflammatory activities. Despite the fact that several studies have reported that NPs may induce or exacerbate eosinophilic inflammation *in vivo* in rodents, the information regarding the direct interaction between NPs and human eosinophils is lacking. In the present study, we test the possibility that NPs could alter the capacity of human eosinophils to adhere onto a cellular substratum. Using a panel of NPs, we found that several were able to increase the adhesion of human eosinophil onto endothelial EA.hy926 cells. Among them, TiO₂ NPs were the most potent and we therefore pursue this study with these NPs. TiO₂ NPs were found to increase the adhesion of eosinophils in a concentration dependent fashion. TiO₂ NPs did not alter the cell surface expression of a panel of cellular adhesion molecules, with the exception of CD29. Indeed, a weak to moderate, but significant, decrease of CD29 was observed after 30 min with TiO₂ but returned to normal levels after 90 min. TiO₂ NPs were found to activate Akt, one important target of phosphoinositide 3-kinase (PI3K). However, despite the fact that cells were fully responsive to the cytokine GM-CSF activating both Akt and Erk-1/2, TiO₂ NPs did not activate Erk-1/2. Using a pharmacological approach with the PI3K/Akt inhibitor, wortmannin, the ability of TiO₂ NPs to activate Akt was drastically inhibited and, further, their capacity to increase adhesion of eosinophils to cells was reversed. This study provides insights into the effects of NPs on the biology of human eosinophils indicating that as other agents, NPs, in particular TiO₂ NPs, can induce intracellular events associated with a cellular function, adhesion.

KEYWORDS: nanoparticles, eosinophils, adhesion, cell signalling

INTRODUCTION

Nanoparticles (NPs) are excellent potential candidates to be used for medical diagnosis and therapeutic purposes and research in this area is very dynamic and intensive (Acharya, et al., 2009, Allegra, et al., 2011, Babu, et al., 2010, Chandolu and Dass, 2013, Dolati, et al., 2016, Lu, et al., 2016). In the literature, an incredible number of studies reported or dealt on the potential use of NPs for drug delivery in cancer therapies (Akhtar, et al., 2012, Almeida, et al., 2014, Ma and Yang, 2016). However, despite the fact that NPs are gaining increasing popularity and interest for developing nanotreatments and drug delivery systems, there are some potential toxic risks. Indeed, cytotoxicity (Ahamed, 2013, Lin, et al., 2007), oxidative stress (Ahamed, 2013, Alarifi, et al., 2014), genotoxicity (Ahamed, et al., 2013, AshaRani, et al., 2009), and inflammation (Asharani, et al., 2012) are the most common potential toxic effects reported in the literature. Since inhalation represents one of the major potential routes of human exposure to NPs, it is not surprising to note that several *in vitro* and *in vivo* studies were aimed at investigating the effects of NPs on pulmonary cells and/or lung inflammation (Inoue and Takano, 2011, Lu, et al., 2014, Mohamud, et al., 2014). Although some studies reported data promoting the use of NPs for the treatment of lung diseases (Barreto, et al., 2015, Kim, et al., 2014), several others have demonstrated that NPs could induce/aggravate lung inflammation *in vivo* as evidenced by an increased number of neutrophil or eosinophil granulocytes in the bronchoalveolar lavages and lungs (Anderson, et al., 2014, Brandenberger, et al., 2013, Chen, et al., 2006, Cho, et al., 2012, Haberl, et al., 2013, Huang, et al., 2015).

Despite the above observations, the direct interaction between a given NP and human granulocytes has not been investigated deeply. However, the effects of some NPs on the biology of human neutrophils have been reported, mostly from our laboratory (Babin, et al., 2013, Goncalves, et al., 2010, Goncalves and Girard, 2014, Liz, et al., 2015, Noel, et al., 2016, Poirier, et al., 2014, Poirier, et al., 2015) and others (Abrikossova, et al., 2012, Couto, et al., 2014, Dianza, et al., 2006, Paino and Zucolotto, 2015, Papatheofanis and Barmada, 1991, Soares, et al., 2015, Soares, et al., 2016). In contrast, the literature regarding the direct interaction with NPs and human eosinophils is curiously presently lacking. Therefore, it is completely unclear how NPs can alter the biology of human eosinophils.

Eosinophils represent only less than ~5% of total blood leukocytes in humans by opposition to up to ~70% for neutrophils. However, eosinophils can accumulate in tissues and airways under certain pathological conditions, especially in asthma and allergic diseases where they are known to play important roles (Gleich, 2000, Ilmarinen and Kankaanranta, 2014, Shamri, et al., 2011). Eosinophils are known to undergo spontaneous apoptosis and their elimination by

professional phagocytes (efferocytosis) is of major importance for the resolution of eosinophilic inflammation, including in the airways occurring in asthma (Ilmarinen and Kankaanranta, 2014). During an inflammatory response, eosinophils have to leave blood circulation to migrate to the inflamed site and one of the first major steps involved in this situation is adhesion. Indeed, for example, eosinophils are known to adhere onto airway epithelial cells during the development of asthma and are also known to adhere onto endothelial cells to exit the blood circulation (Johansson, 2014).

Since NPs were previously found to alter the biology of human neutrophils, including their adhesion onto human umbilical vein endothelial cells (Dianzani, et al., 2006), we have decided to investigate here how different engineered NPs will alter the ability of human eosinophils to adhere onto endothelial cells. Among them, titanium dioxide (TiO₂) NPs were found to be the most potent for increasing eosinophil adhesion. Further, we show that this occurs via phosphoinositide 3-kinases/Akt activation, a cell pathway involved in several granulocyte functions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The nanoparticles titanium dioxide (-) (TiO₂), gold⁺ amine-functionalized (Au⁺), gold⁻ carboxy-functionalized (Au⁻), zinc oxide (ZnO), iron oxide or magnetite (Fe₃O₄), cerium (IV) oxide (CeO₂), carboxy-functionalized palladium (Pd), carboxy-functionalized platinum (Pt) were purchased from Sciventions Inc. (Toronto, ON). Aluminium oxide (Al₂O₃) and gold of 70 nm (Au70) were from Nanostructured & Amorphous Materials, Inc. (Houston, TX) and Ted Pella Inc. (Redding, CA), respectively. Recombinant human (rh) granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) was purchased from Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA). The plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I), trypan blue, bovine serum albumin (BSA), phosphate buffered saline solution (PBS), rhTNF- α , and dextran were from Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, MO, USA). The mouse monoclonal anti- GAPDH (FL-335), anti-p38 (C-20), anti-CD62L (L-selectin)-FITC, anti-CD11b- FITC, anti-CD11- FITC, anti-ICAM-3-FITC, anti-IgG2a FITC (normal mouse) and anti-IgG1 FITC (normal mouse) were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa cruz, CA) and anti- Phospho-Akt (D9E), anti-Phospho-Erk- 1/2 (D13.14.4E), anti-Phospho-p38 (D3F9), anti-Erk-1/2 (137F5) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The mouse monoclonal anti-CD49d-PE, anti-CD18-PE, anti-CD54-PE, anti-

IgG1-PE and anti-CD29-PE were obtained from BD Pharmingen (Mississauga, ON). Ficoll-Hypaque was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), HEPES, penicillin, streptomycin, Annexin-V- FITC and Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) were from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). HRP-labeled goat anti-mouse IgG antibody, HRP-labeled goat anti-rabbit IgG antibody and HRP-labeled rabbit anti-goat IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The 30% acrylamide/BIS solution, polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane and Clarity™ Western ECL substrate were purchased for Bio-Rad. Otherwise specified, all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Characterization of NPs by dynamic light scattering

The size distribution and zeta potential of the NPs used in this study were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600) from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements were performed with NPs in suspension in RPMI-1640 + 10% fetal calf serum, according to the tested functions, at a concentration of 50 µg/ml and at 37°C, the temperature at which the experiments were performed. The concentration was selected according to previous publications performed with neutrophil granulocytes (Babin, et al., 2013, Goncalves, et al., 2010, Goncalves and Girard, 2014, Noel, et al., 2016, Poirier, et al., 2014)

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, to obtain neutrophils and eosinophils as previously described (Lavastre, et al., 2005). When >5% of eosinophils were detected in granulocyte enriched preparations, as determined by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ), 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 after eosinophil isolation was routinely >96% and cell viability was always greater than 98%, as determined by trypan blue exclusion before and after treatment with NPs.

EA.hy926 cell culture

The human umbilical vein endothelial cell line, EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) was

purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%.

Cell adhesion

Eosinophils were treated with buffer (as control (Ctrl)) or the indicated agonists (NPs) for 30 min and then labeled for 30 min with 5 μ M calcein-AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Eosinophil adhesion onto EA.hy926 cells was measured essentially as we have previously published using human A549 cells as substrate (Pelletier and Girard, 2005). The number of adherent eosinophils was calculated by counting the number of fluorescent cells from five randomly selected high-power fields (x 400) observed with a photomicroscope Leica DMRE equipped with an ebq 100 dc epifluorescent condenser. Images were taken with a Cooke Sensicam High performance camera coupled to the Image Pro-plus® (version 4.0) program. We used a relative index calculation based on the control equal to one.

Assessment of eosinophil apoptosis

Apoptosis was evaluated by cytology and by flow cytometry. Eosinophils (5×10^5 cells/ml in RPMI-1640 + antibiotics + 10% fetal calf serum) were incubated at 37°C in 5% CO₂ in 48-well plates for 24h in the presence of buffer (Ctrl), the pro-apoptotic plant lectin VAA-I (1 μ g/ml) or the indicated concentrations of TiO₂ NPs. After the incubation, cells were cytocentrifuged on microscope slides and colored with the Hema 3 staining kit according to the manufacturer's instructions and examined by light microscopy at X 400 final magnification. Apoptosis evaluation was based on the nucleus morphology. The results were expressed as the percentage of eosinophils in apoptosis. For the flow cytometry procedures, after the incubation, eosinophils were washed and then resuspended at 2×10^6 cells/mL and incubated with 2 μ L of FITC-annexin-V and 1 μ g/mL of propidium iodine (PI) for 30 min at 4°C (light protected) prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Ten thousand cells were analyzed by FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA) using CellQuest program (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Cell surface expression of adhesion molecules

Freshly isolated eosinophils were treated with buffer (Ctrl) or TiO₂ for 30 or 90 min. Following the incubation period, cells were suspended at 0.5×10^6 cells/ml, washed, and preincubated for 30 min at 4°C with 20% autologous serum to prevent nonspecific binding via Fc receptors. Cells

were then washed and incubated with the different antibodies (1 mg/ml of anti ICAM-1, ICAM-3, CD11a, CD11b, CD18, CD29, CD49d or CD62L) for 1h at 4°C. After two additional washes, cells were incubated for 30 min (4°C, light protected) with 1 mg/ml of the corresponding conjugated secondary antibody (FITC-IgG₁ for ICAM-3, CD62L, CD11b; FITC-IgG_{2a} for CD11a; and PE-IgG₁ for ICAM- 1, CD18, CD29 and CD49d). Cells were washed and flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson).

Western blot experiments

Cells (0.5×10^6 cells/mL in RPMI-1640) were incubated with the indicated NPs for the specified periods of time at 37°C and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 350,000 cells were loaded and subjected to 7.5-10% SDS- polyacrylamide gel electrophoresis and transferred from the gel to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1h at room temperature in 5% BSA in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20). After washing, membranes were incubated with anti-p-Akt 6 (1:1000) or -p-Erk-1/2 (1:1000) in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween, and incubated for 1h at room temperature with HRP-labeled goat anti- mouse IgG antibodies (1:25,000) or HRP-labeled goat anti-rabbit IgG antibodies (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 reprobbed with anti-GAPDH or anti- Erk-1/2 antibodies to confirm equal loading of proteins. Chemiluminescence was revealed with a chemiDoc™ MP Imaging system from Bio-Rad.

Statistical Analyses

When appropriated, statistical analyses were performed using one-way ANOVA and if significance was identified, individual comparisons were subsequently made by Bonferroni test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was established at *, $p < 0.05$; ** $P < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

RESULTS

Tableau 1. Data from de DLS analysis of the different NPs.

NPs	RPMI-C			PDI	Zeta potentiel
	Diameter (nm)				
TiO ₂ (RPMI-C)	77,71 ± 20,94 (90,4%)	7,976 ± 10,35 (9,7%)		0,322 ± 0,108	-11,1 ± 0,351
Or + (RPMI-C)	189 ± 6,854 (99,3%)	7,517 ± 13,02 (0,7%)		0,251 ± 0,008	-5,53 ± 0,374
ZnO (RPMI-C)	70,41 ± 3,5 (66,8%)	11,47 ± 0,278 (26%)	3054 ± 310 (7,2%)	0,512 ± 0,082	-11,3 ± 0,436
Fe ₃ O ₄ (RPMI-C)	767,3 ± 169 (71,6%)	11,2 ± 16,70 (26,4%)	3416 ± 2990 (2%)	0,909 ± 0,158	-17,7 ± 0,95
Or - (RPMI-C)	46,72 ± 0,023 (95,7%)	3033 ± 2623 (4,3%)		0,467 ± 0,120	-9,67 ± 2,33
CeO ₂ (RPMI-C)	90,85 ± 4,629 (83,2%)	10,83 ± 2,207 (16,8%)		0,522 ± 0,003	-15,9 ± 2,06
Pt (RPMI-C)	33,95 ± 2 (99,3%)	1289 ± 2232 (0,7%)		0,370 ± 0,004	-8,79 ± 1,32
Pd (RPMI-C)	277,6 ± 7,788 (83,5%)	31,99 ± 7,025 (12,4%)	7,736 ± 1,117 (4,1%)	0,603 ± 0,041	-8,42 ± 0,242
Al ₂ O ₃ (RPMI-C)	481,2 ± 18,44 (100%)			0,364 ± 0,042	-17,1 ± 0,971
Au70 (RPMI-C)	132,4 ± 1,401 (100%)			0,114 ± 0,005	-9,49 ± 0,769

Characterization of the tested NPs by dynamic light scattering. **Table 1** illustrates the data of the DLS analysis of the NPs in the RPMI-C. From these results, the size distribution of the NPs is not homogenous with diverse degree of polydispersity as judged by the different values of the PDI (polydispersity index). The zeta potential varies from -5.5 ± 0.4 to -17.7 ± 0.9 mV.

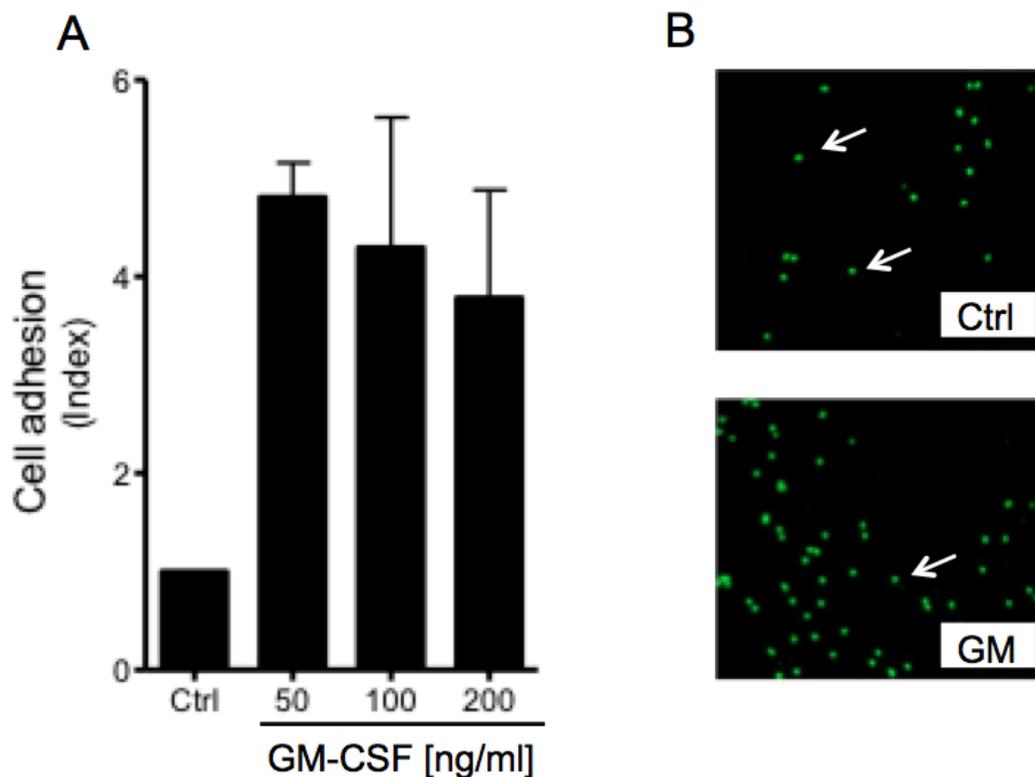


Figure 1. Utilization of EA.hy926 as cell substratum for investigating the adhesive capacity of human eosinophils. Freshly isolated human eosinophils were treated for 30 min with buffer (Ctrl) or the indicated concentrations of GM-CSF (GM), stained with calcein-AM and then incubated onto EA.hy926 cells for determining adhesion as described in Materials and Methods. A, results are expressed as indices (means \pm SEM, n=3). B, representative images obtained where each green dot (point by a arrows) represents one adherent eosinophil.

Using EA.hy926 cells as substrate to determine human eosinophil adhesion. To the best of our knowledge, this is the first time that EA.hy926 cells are used as a cell substrate to determine adhesion of human eosinophils. Therefore, we first performed experiments using GM-CSF as a positive control as it is known to induce adhesion of human eosinophils (Ip, et al., 2005). As illustrated in **Fig. 1**, the assay that we developed here with EA.hy926 cells is suitable to determine adhesion of human eosinophils. Indeed, in this cohort of experiments, GM-CSF was found to increase adhesion of eosinophils onto these cells by an index of more than 4 when tested at 50 ng/ml. As expected with other cell adhesion assays (Pelletier and Girard, 2005), some variability are observed from experiment to experiment using different blood donors as a source of eosinophils, but GM-CSF always increased the basal level of adherent eosinophils.

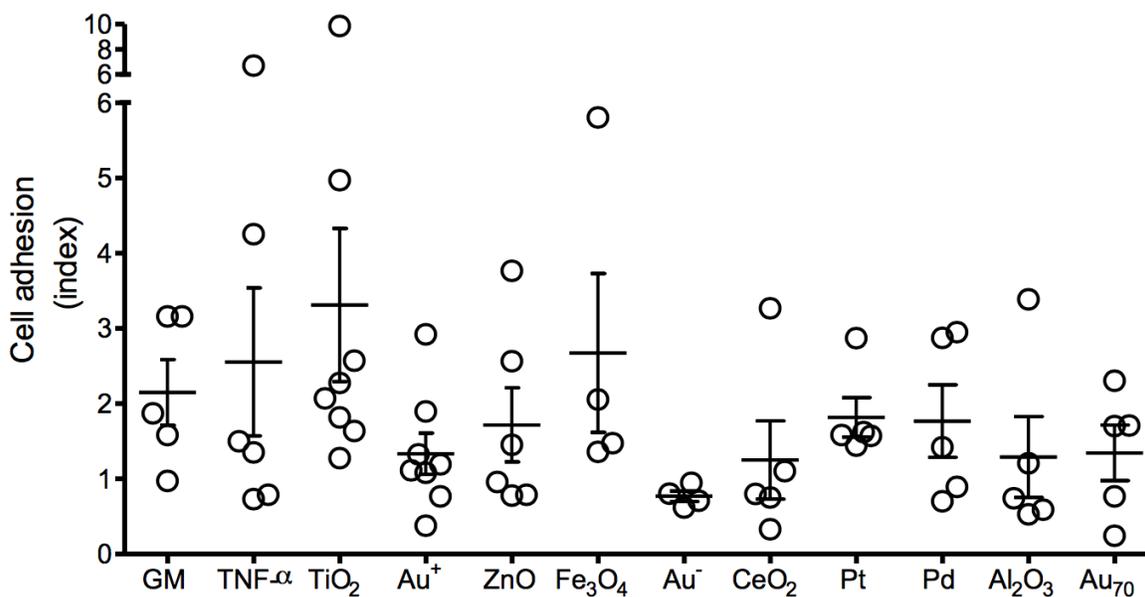


Figure 2. *Effect of different NPs on eosinophil adhesion.* Eosinophils were treated GM-CSF, TNF- α or 50 $\mu\text{g/ml}$ of the indicated NPs for 30 min and adhesion was determined as described in Materials and Methods. Results are expressed as indices (ctrl values were set as 1) and were obtained from at least 4 different blood donors (open circles). The means and SEM are indicated.

Effect of NPs on the capacity of human eosinophils to adhere onto EA.hy926 cells. Then we decided to study the effect of different NPs on the capacity of human eosinophils to adhere onto EA.hy926 cells. Because this set of experiments were aimed for screening purposes, and since this is time-consuming, we have tested all NPs at only one concentration, based on previous studies performed in human neutrophil granulocytes (Babin, et al., 2013, Goncalves, et al., 2010, Goncalves and Girard, 2014, Liz, et al., 2015, Noel, et al., 2016, Poirier, et al., 2014, Poirier, et al., 2015). As illustrated in **Fig. 2**, among ten different tested NPs all, but one (Au^-), increase the basal level of adhesion. As compared to untreated eosinophils (Ctrl), TiO_2 is the most potent with an index of 3.3 ± 1 (mean \pm SEM, $n=8$). In fact, this is the only NP with an index > 3 that is even greater than the two cytokines GM-CSF (2.5 ± 0.4 , $n=5$) and TNF- α (2.6 ± 0.9 , $n=6$) used here as positive controls (Ip, et al., 2005, Matsuda, et al., 2008). The second most potent NP is Fe_3O_4 with an index of 2.7 ± 1 ($n=4$) which is very close to the one obtained for the two cytokines. The indices for all other NPs are, 1.8 ± 0.3 ($n=5$), 1.8 ± 0.5 ($n=5$), 1.7 ± 0.5 ($n=6$), 1.3 ± 0.4 ($n=5$), 1.3 ± 0.3 ($n=8$), 1.3 ± 0.5 ($n=5$), 0.8 ± 0.1 ($n=5$), for Pt, Pd, ZnO, Au_{70} , Au^+ , Al_2O_3 , and Au^- , respectively.

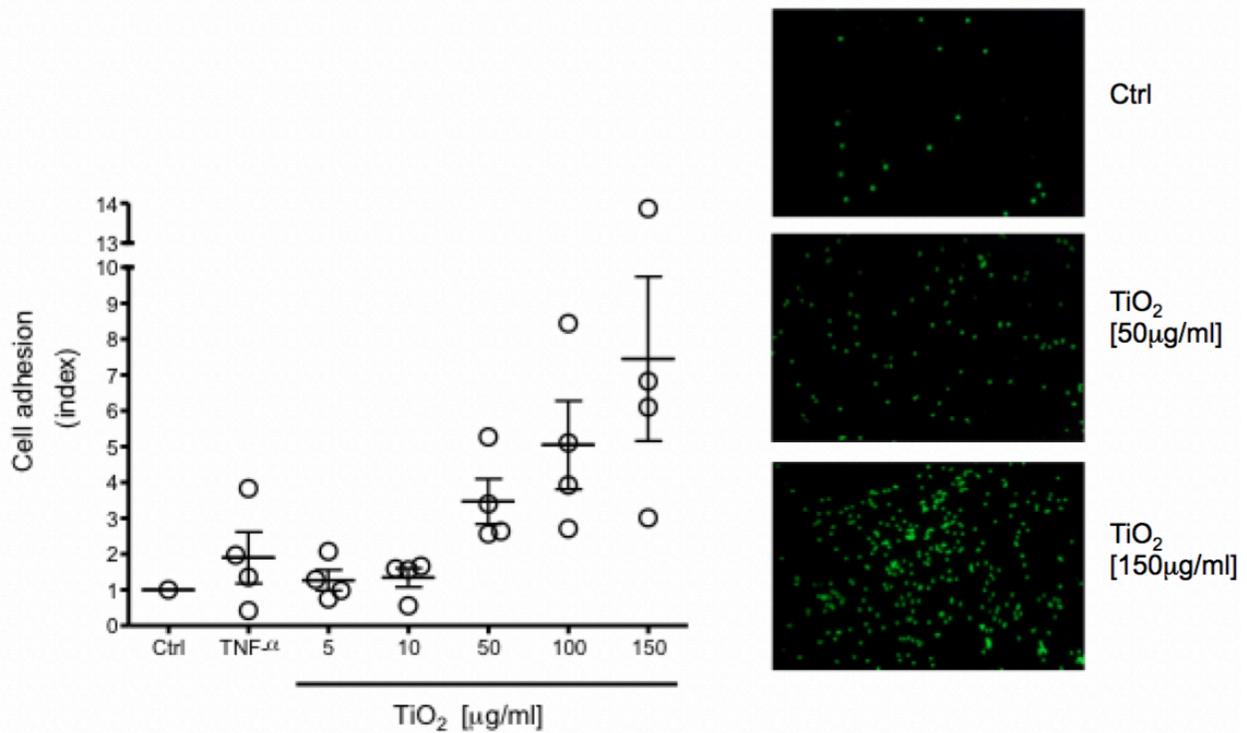


Figure 3. *TiO₂ NPs increase adhesion of eosinophil in a concentration-dependent fashion.* Eosinophils were treated with buffer (Ctrl), TNF- α or the indicated concentrations of TiO₂ NPs for 30 min and adhesion was determined as described in Materials and Methods. Results are expressed as indices (ctrl values were set as 1) and were obtained from 4 different blood donors (open circles). The means and SEM are indicated. Right part of the figure, typical images obtained after the cell adhesion assay.

TiO₂ NPs increase human eosinophil adhesion in a concentration-dependent fashion. After the above screening experiments, we next decided to focus on TiO₂ NPs for the rest of this study. **Fig. 3** illustrates that TiO₂ NPs increase the adhesion of human eosinophils in a concentration-dependent fashion where the indices were 1.27 ± 0.3 (mean \pm SEM, n=4), 1.34 ± 0.3 , 3.5 ± 0.6 , 5.0 ± 1.2 , and 7.5 at a concentration of 5, 10, 50, 100 or 150 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In this cohort of experiments, TNF- α increased the basal level of eosinophil adhesion by an index of 1.9 ± 0.7 .

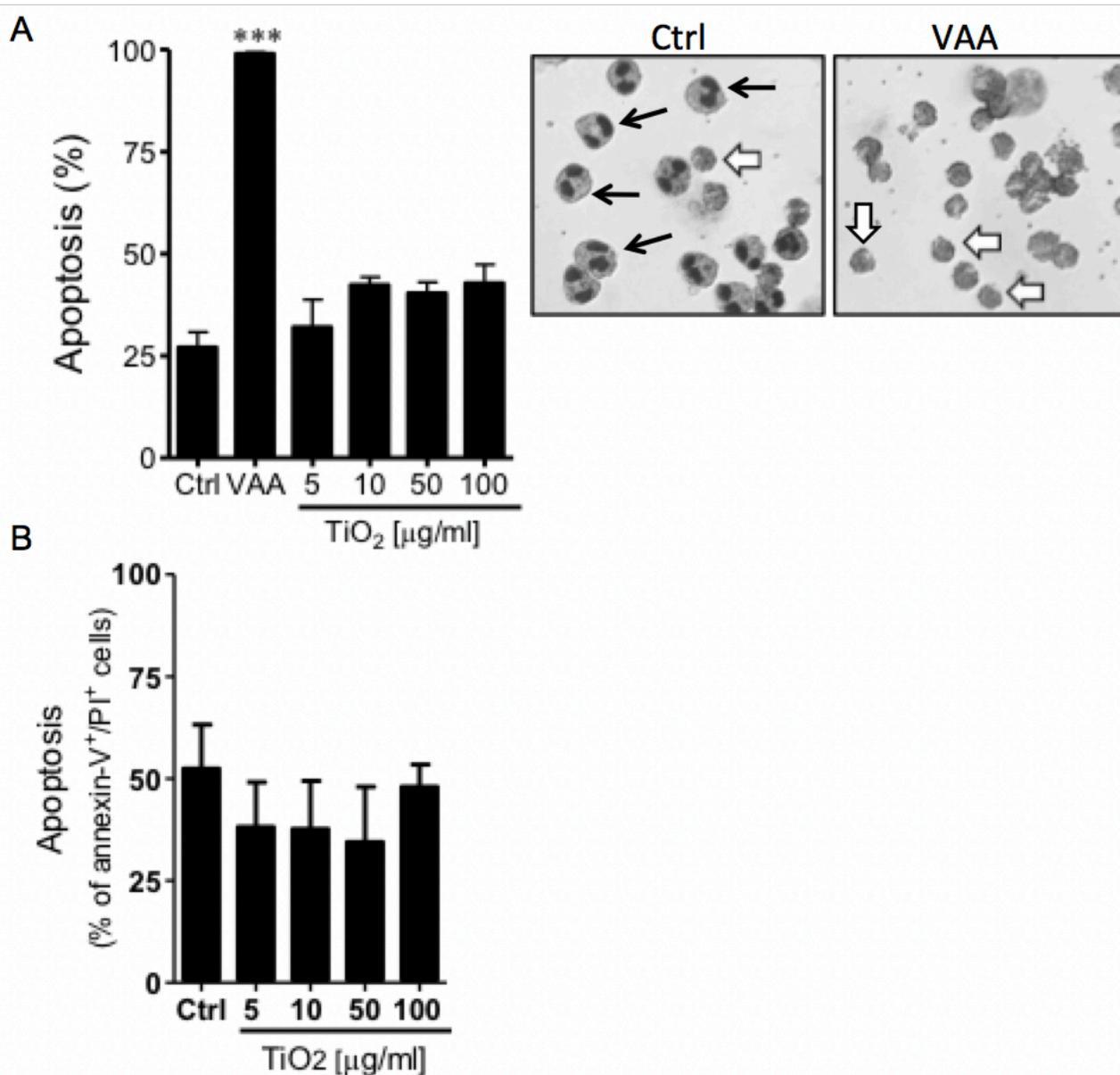


Figure 4. *TiO₂ NPs do not alter the spontaneous apoptotic rate of human eosinophils.* Freshly isolated human eosinophils were treated with buffer (Ctrl), VAA-I (VAA), or the indicated concentrations of TiO₂ NPs for 24h and apoptosis was determined by cytology (A) or by flow cytometry (B) as described in Materials and Methods. Results are expressed as the % of cells in apoptosis (means ± SEM, ≥3). Inset in panel A, typical images illustrating normal (black arrows) and apoptotic (white arrows) eosinophils. ***p<0.001 compare to control.

TiO₂ NPs do not alter the spontaneous apoptotic rate in human eosinophils. Before investigating the mechanism involved in TiO₂ NPs-induced cell adhesion, we verified before if these NPs could alter the spontaneous apoptotic rate of eosinophils. This was performed to

determine if an ongoing process occurs in parallel to induction of cell adhesion in response to TiO₂ NPs, even if this requires a longer period of incubation between TiO₂ NPs and eosinophils (24h). As assessed by cytology (**Fig. 4A**) and 11 flow cytometry (**Fig. 4B**) procedures, TiO₂ NPs do not alter the apoptotic rate of eosinophils, indicating that the pro-adhesive properties of TiO₂ are not associated with signaling events related to the modulation of apoptosis that could occur in the first few minutes of cell activation and observable several hours later, depending on the assay used (24h in our case).

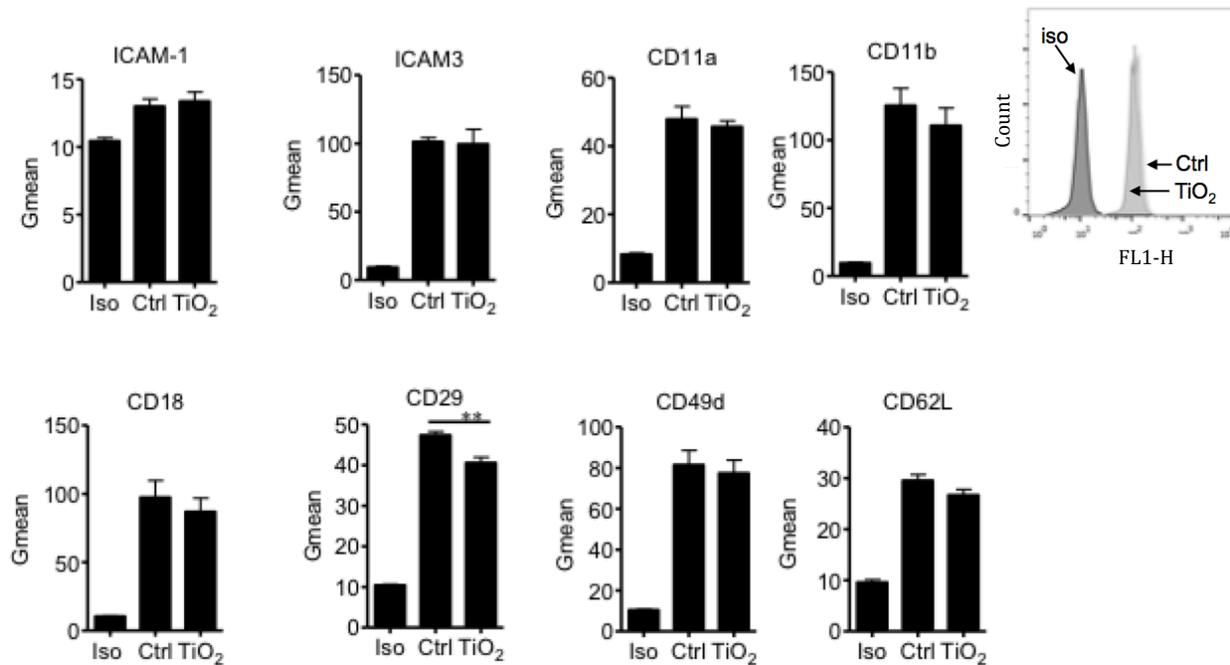


Figure 5. Effect of TiO₂ NPs on the cell surface expression of cellular adhesion molecules in human eosinophils. Human eosinophils were isolated and then treated with buffer (Ctrl) or 50 µg/ml TiO₂ NPs for 30 min and the cell surface expression of the indicated cell adhesion molecules was determined by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are expressed as general means of fluorescence (Gmean) (means ± SEM, n=3). Inset, typical data obtained by FACS; iso, isotypic control. Note that the data obtained after treatment or not with TiO₂ NPs overlap (arrows) and are very similar.

Effect of TiO₂ NPs on the cell surface expression of several molecules involved in human eosinophil adhesion. To further understand how TiO₂ can increase eosinophil cell adhesion, we have investigated their potential modulatory activity on the cell surface expression of ICAM-1, ICAM-3, CD11a, CD11b, CD18, CD29, CD49d and CD62L by flow cytometry. As illustrated in **Fig. 5**, TiO₂ NPs do not significantly alter the cell surface expression of all tested molecules but CD29. Indeed, TiO₂ NPs were found to decrease significantly the cell surface expression of

CD29 after 30 min of treatment. We have also determined the cell surface expression of all these different molecules after 90 min, and no differences were observed when cells were treated or not with TiO₂ NPs, including CD29 (*data not shown*).

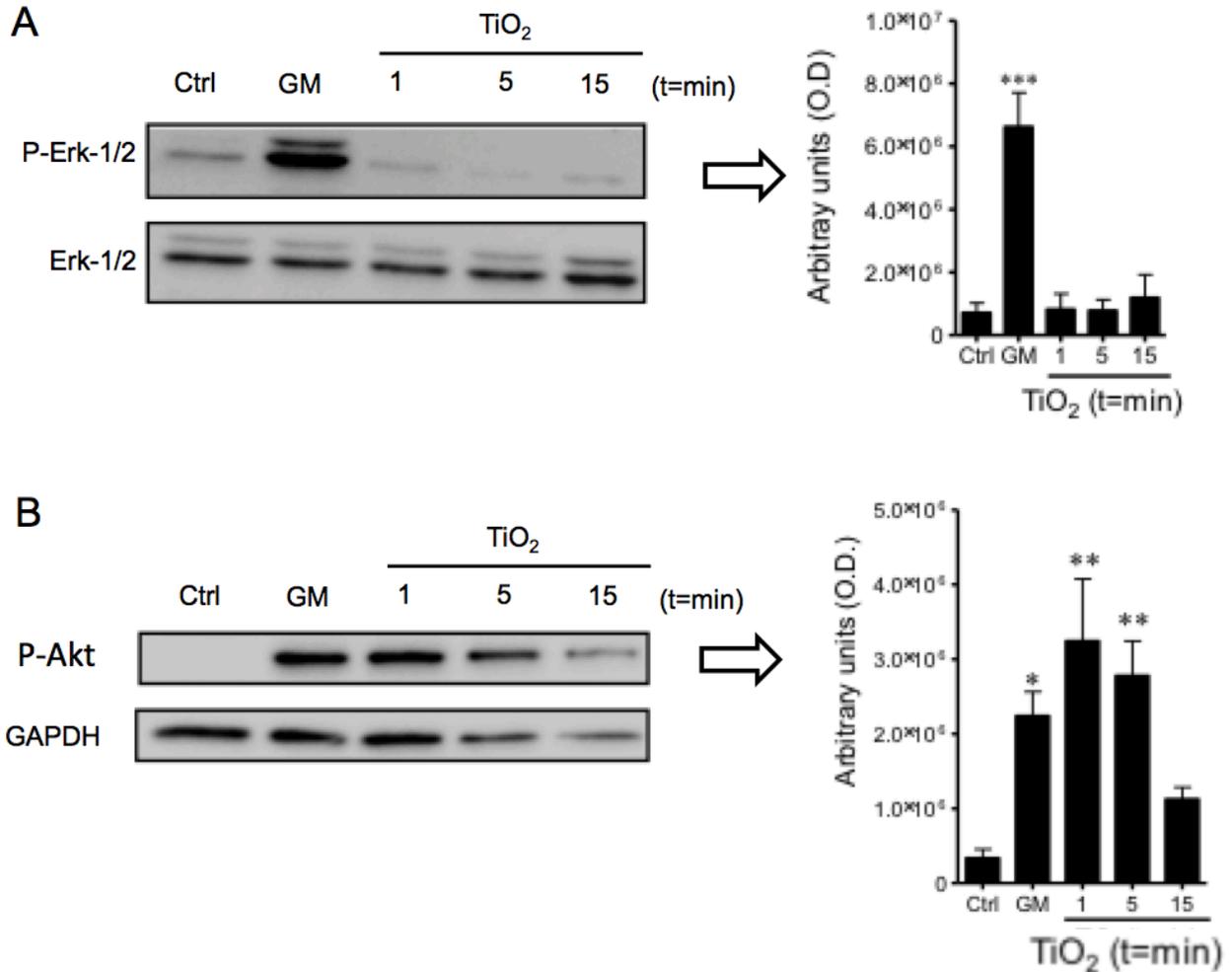


Figure 6. *TiO₂ NPs activate PI3K/Akt signalling pathways but not the MAPK Erk-1/2.* Freshly isolated human eosinophils were treated with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM) or 50 µg/ml TiO₂ NPs for the indicated periods of time and the phosphorylation of Erk-1/2 (A, p-Erk-1/2) or Akt (B, p-Akt) was determined by western blotting as described in Materials and Methods. The densitometry of the different experiments (means ± SEM, n≥3) is illustrated in the bar graph at the corresponding right part of the figure.

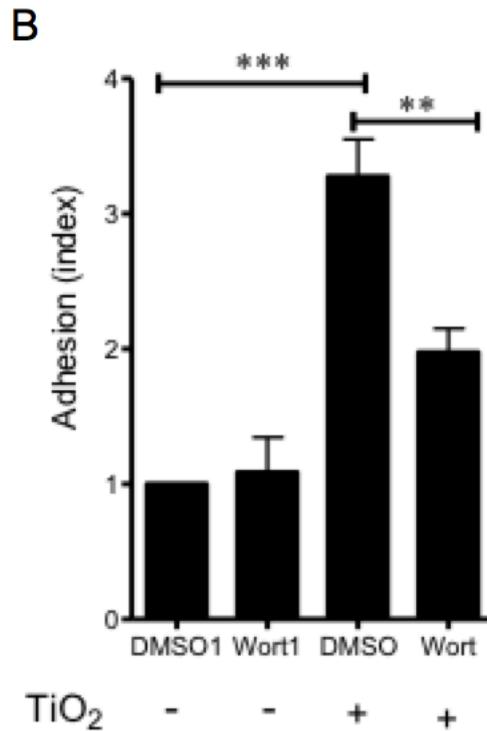
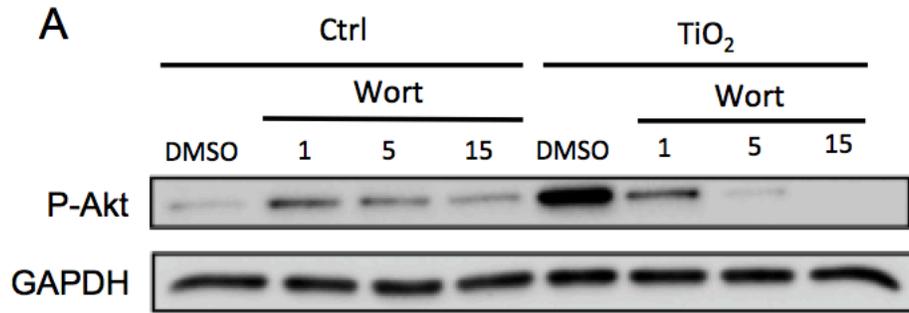


Figure 7. *TiO₂ NPs increase the adhesion of human eosinophils by a PI3K-Akt-dependent mechanism.* Eosinophils were pretreated 30 min with the vehicle (DMSO) or the PI3k/Akt inhibitor wortmannin and then incubated with buffer (Ctrl) or 50 µg/ml TiO₂ NPs and the inhibition of Akt phosphorylation (A) or of the adhesion (B) was determined as described in Materials and Methods. (A) results are from one representative experiments out of 4. (B) Results are mean ± SEM n=5). ***p<0.001 compared to control.

TiO₂ NPs enhance human eosinophil adhesion by a PI3-K/Akt-dependent mechanism. Because some intracellular cell signalling pathways are known to be involved in human eosinophil activation/adhesion, including MAPKs such as Erk-1/2 (Zhu, et al., 2002) and PI3-K/Akt pathway (Saito, et al., 2014), we next determined whether or not TiO₂ NPs could activate Erk-1/2 and/or

Akt. As illustrated in **Fig. 6A**, TiO₂ NPs did not activate Erk-1/2 from 0-15 min when compared with untreated cells whereas, as expected (Yamaguchi, et al., 2008), GM-CSF strongly activated Erk-1/2. In contrast, Akt was strongly activated in TiO₂-induced human eosinophils (**Fig. 6B**). This latter result prompted us to determine if Akt is involved in TiO₂ NPs-induced eosinophil adhesion onto EA.hy926 cells. To do so, we used a pharmacological approach by pre-treating eosinophils with wortmannin, a PI3-K/Akt inhibitor known to be efficient in human eosinophils (Hiraguri, et al., 1997) and then stimulated them with TiO₂ NPs. As illustrated in **Fig. 7A**, wortmannin inhibits drastically Akt phosphorylation induced by TiO₂ NPs. Also, wortmannin was found to markedly decrease the ability of TiO₂ NPs to increase eosinophil adhesion from an index of 3.3 to 1.9 (inhibition of ~60%) (**Fig. 7B**). Of note, the basal adhesion of eosinophils onto EA.hy926 cells was not altered by the addition of wortmannin (index close to 1).

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the capacity of NPs to modulate the adhesion of human eosinophils onto cell substratum. Of note, this is probably the first study investigating the direct activation of human eosinophils in response to a panel of engineered NPs. The human endothelial EA.hy926 cell line was selected as the cell substratum, since these cells are easy to culture, preventing the frequent preparations of human endothelial cells that cannot be used for several passages. Since EA.hy926 cells were established by fusing primary human umbilical vein cells with a thioguanine-resistant clone of the human epithelial lung A549 cells, previously used by us as cell substratum for determining human granulocyte adhesion (Pelletier, et al., 2002), we adapted our technique to EA.hy926. Among the panel of NPs, TiO₂ NPs were found to be the most potent for inducing human eosinophil adhesion. Although there is presently no information available regarding the direct effect of TiO₂ NPs on the biology of human eosinophils, we have previously documented that these NPs, at similar concentrations, can alter the biology of other human granulocytes *in vitro*, namely neutrophils (Goncalves, et al., 2010). Also, TiO₂ NPs can even attract neutrophils *in vivo* in the murine air pouch model of inflammation (Goncalves and Girard, 2011). Although we did not study if TiO₂ NPs could induce neutrophil adhesion onto EA.hy926 cells, these NPs were found to delay human neutrophil apoptosis (Goncalves, et al., 2010). Herein, we rather observed that TiO₂ NPs does not alter the spontaneous apoptotic rate of eosinophils. This is in accordance with the absence of NP cytotoxicity.

It is known that interaction and adhesion of eosinophils with the vascular endothelium require

several cell surface molecules expressed on the cell membrane of eosinophils (Cheung, et al., 2006, Tachimoto and Bochner, 2000), including the integrins very late antigen-4 (VLA-4) and leukocyte function-associated antigen (LFA-1) composed of CD49d/CD29 and CD11a/CD18), respectively. In addition, some members of the selectin family, including L-selectin (CD62L) are also known to be important for eosinophil adhesion and members of the immunoglobulin (Ig) family, including both the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 or CD54) and ICAM-3 (CD50). Despite the fact that TiO₂ NPs induce adhesion of eosinophils, our results regarding the cell surface expression of different molecules involved in adhesion, cannot allow us, at the moment, to identify key molecules involved in this process. Only a significant decrease of the cell surface expression of CD29, also known as β ₁ integrin, was observed after 30 min of treatment with TiO₂ NPs. Therefore, these results, collectively, suggest rather that the mode of action of TiO₂ NPs could involve a change in the affinity of the cell surface molecules that we have tested or involve intracellular events after cell activation. There is also the possibility that other cell surface adhesion molecules that we did not test are involved. Our results demonstrating that TiO₂ NPs induce Akt activation that could be inhibited by the PI3K/Akt inhibitor wortmannin indicate that a change in intracellular events lead to an increase of eosinophil adhesion. In agreement with this, IL-5 was previously found to induce phosphorylation of Akt in human eosinophils (Sano, et al., 2005). However, instead of investigating eosinophil adhesion onto a cell substratum, the authors studied the β ₂ integrin-mediated adhesion using BSA-coated plates. In one other study, IL-5 was found to induce β ₂-integrin adhesion of eosinophils involving activation of Erk-1/2 (Zhu, et al., 2002). Here, TiO₂ NPs were not able to activate Erk-1/2, suggesting that adhesion onto EA.hy926 cells occurs by a β ₂ integrin-independent mechanism. This is agreement with the observation that TiO₂ NPs do not significantly modulate the cell surface expression of CD18 (β ₂ integrin). Interestingly, we have previously reported that TiO₂ NPs can also induce tyrosine phosphorylation events in human neutrophils (Goncalves, et al., 2010). More specifically, we found that TiO₂ NPs activate Erk-1/2 and p38 MAP kinases, two major enzymes involved in different PMNs functions. In contrast, we reported here that TiO₂ NPs do not activate Erk-1/2 in human eosinophils, indicating that cells of similar origin can differently respond to TiO₂ NPs. This is in agreement with the different effects of TiO₂ on the spontaneous apoptotic rate of neutrophils and eosinophils discussed above.

Although we found that TiO₂ NPs were the most potent NPs increasing the basal level of eosinophil adhesion, it is important to mention that other NPs, but not all (e.g. Au⁻), could also induce human eosinophil adhesion, although with different potency. Since the interaction between NPs and human eosinophils is poorly documented, it will be important in future to

determine if Akt is also involved as part of the mechanism involved in the ability of NPs others than TiO₂ to increase adhesion of eosinophils, such as those tested herein, namely ZnO, Au⁺, Fe₃O₄, CeO₂, Pt, Pd, Al₂O₃ and AuNP70. In fact, several different types of NPs should be tested in order to determine whether or not Akt is targeted by some types of NPs or if it is rather a generalized mechanism. With the same idea, it will be interesting to monitor the cell surface expression of adhesion molecules in eosinophils. Although not tested in the present study, it will be helpful also to investigate the interaction of NPs with the cell substratum and then determine the ability of eosinophils to adhere onto these cells (EA.hy926 and/or other types of cells). This will help to better understand how a given NP could possess some pro-inflammatory activity, based on the reported increased number of eosinophils observed in vivo after administration of NPs (Brandenberger, et al., 2013, Cho, et al., 2012, Glista-Baker, et al., 2014, Huang, et al., 2015). Indeed, increased adhesion of leukocytes, including eosinophils, is one important step involved during inflammation.

CONCLUSIONS

Although several studies have reported that some NPs can induce or exacerbate airway inflammation in different in vivo models, our present data indicating that different NPs, including TiO₂ NPs, increase the adhesion of eosinophils fits well with previous studies reporting that TiO₂ NPs induce eosinophil infiltration (Cho, et al., 2010, Larsen, et al., 2010). We have identified that the PI3K-Akt cell signalling pathway is involved in the ability of TiO₂ NPs to induce adhesion of human eosinophils onto a cell substratum. Therefore, targeting this pathway may be a useful approach to improve the therapeutic responsiveness of eosinophil cells, especially if the goal is to inhibit their adhesion. Further, our results indicate the necessity of conducting several studies in order to determine the pro-inflammatory potential of a given NP to better design future nanotherapies, particularly in diseases in which eosinophils may be involved.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en Sécurité du travail.

REFERENCES

- Abrikossova, N., Skoglund, C., Ahren, M., Bengtsson, T., Uvdal, K. 2012. Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology* 23, 0957.
- Acharya, S., Dilnawaz, F., Sahoo, S.K. 2009. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials* 30, 5737.
- Ahamed, M. 2013. Silica nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured A431 and A549 cells. *Hum Exp Toxicol* 32, 186.
- Ahamed, M., Alhadlaq, H.A., Alam, J., Khan, M.A., Ali, D., Alarafi, S. 2013. Iron oxide nanoparticle- induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Curr Pharm Des* 19, 6681.
- 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 Nanomedicine* 7, 845.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Alhader, M.S. 2014. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biol Trace Elem Res* 159, 416.
- Allegra, A., Penna, G., Alonci, A., Rizzo, V., Russo, S., Musolino, C. 2011. Nanoparticles in oncology: the new theragnostic molecules. *Anticancer Agents Med Chem* 11, 669.
- Almeida, J.P., Figueroa, E.R., Drezek, R.A. 2014. Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine* 10, 503.
- Anderson, D.S., Silva, R.M., Lee, D., Edwards, P.C., Sharmah, A., Guo, T., Pinkerton, K.E., Van Winkle, L.S. 2014. Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: Influence of dose, size, and chemical composition. *Nanotoxicology*, 1.
- Asharani, P., Sethu, S., Lim, H.K., Balaji, G., Valiyaveetil, S., Hande, M.P. 2012. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr* 3, 2041.
- AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279.
- Babin, K., Antoine, F., Goncalves, D.M., Girard, D. 2013. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett* 221, 57.
- Babu, S., Cho, J.H., Dowding, J.M., Heckert, E., Komanski, C., Das, S., Colon, J., Baker, C.H., Bass, M., Self, W.T., Seal, S. 2010. Multicolored redox active upconverter cerium oxide

nanoparticle for bio-imaging and therapeutics. *Chem Commun (Camb)* 46, 6915.

Barreto, E., Serra, M.F., Dos Santos, R.V., Dos Santos, C.E., Hickmann, J., Cotias, A.C., Pao, C.R., Trindade, S.G., Schmidt, V., Giacomelli, C., Carvalho, V.F., Rodrigues, E.S.P.M., Cordeiro, R.S., Martins, M.A. 2015. Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma. *J Biomed Nanotechnol* 11, 1038.

Brandenberger, C., Rowley, N.L., Jackson-Humbles, D.N., Zhang, Q., Bramble, L.A., Lewandowski, R.P., Wagner, J.G., Chen, W., Kaplan, B.L., Kaminski, N.E., Baker, G.L., Worden, R.M.,

Harkema, J.R. 2013. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol* 10, 26.

Chandolu, V., Dass, C.R. 2013. Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr Drug Discov Technol* 10, 170.

Chen, H.W., Su, S.F., Chien, C.T., Lin, W.H., Yu, S.L., Chou, C.C., Chen, J.J., Yang, P.C. 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 20, 2393.

Cheung, P.F., Wong, C.K., Ip, W.K., Lam, C.W. 2006. IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation. *Allergy* 61, 878.

Cho, W.S., Duffin, R., Poland, C.A., Duschl, A., Oostingh, G.J., Macnee, W., Bradley, M., Megson, I.L., 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, 22.

Cho, W.S., Duffin, R., Poland, C.A., Howie, S.E., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I.L., Donaldson, K. 2010. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118, 1699.

Couto, D., Freitas, M., Vilas-Boas, V., Dias, I., Porto, G., Lopez-Quintela, M.A., Rivas, J., Freitas, P., Carvalho, F., Fernandes, E. 2014. Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicol Lett* 225, 57.

Dianzani, C., Cavalli, R., Zara, G.P., Gallicchio, M., Lombardi, G., Gasco, M.R., Panzanelli, P., Fantozzi, R. 2006. Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. *Br J Pharmacol* 148, 648.

Dolati, S., Sadreddini, S., Rostamzadeh, D., Ahmadi, M., Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, M. 2016. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. *Biomed Pharmacother* 80, 30.

Gleich, G.J. 2000. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol*

105, 651.

Glista-Baker, E.E., Taylor, A.J., Sayers, B.C., Thompson, E.A., Bonner, J.C. 2014. Nickel nanoparticles cause exaggerated lung and airway remodeling in mice lacking the T-box transcription factor, TBX21 (T-bet). *Part Fibre Toxicol* 11, 7.

Goncalves, D.M., Chiasson, S., Girard, D. 2010. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24, 1002.

Goncalves, D.M., Girard, D. 2011. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol* 21, 21.

Goncalves, D.M., 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.

Haberl, N., Hirn, S., Wenk, A., Diendorf, J., Epple, M., Johnston, B.D., Krombach, F., Kreyling, W.G., Schleh, C. 2013. Cytotoxic and proinflammatory effects of PVP-coated silver nanoparticles after intratracheal instillation in rats. *Beilstein J Nanotechnol* 4, 933.

Hiraguri, M., Miike, S., Sano, H., Kurasawa, K., Saito, Y., Iwamoto, I. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-5 activate mitogen-activated protein kinase through Jak2 21 kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 100, S45.

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.

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

Inoue, K., Takano, H. 2011. Aggravating impact of nanoparticles on immune-mediated pulmonary inflammation. *ScientificWorldJournal* 11, 382.

Ip, W.K., Wong, C.K., Wang, C.B., Tian, Y.P., Lam, C.W. 2005. Interleukin-3, -5, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor induce adhesion and chemotaxis of human eosinophils via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27, 371.

Johansson, M.W. 2014. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy* 44, 482.

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.

- Larsen, S.T., Roursgaard, M., Jensen, K.A., Nielsen, G.D. 2010. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106, 114.
- 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.
- Lin, M., Wang, Z., Zhang, D. 2007. Preparation of orpiment nanoparticles and their cytotoxic effect on cultured leukemia K562 cells. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 490.
- 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.
- Lu, B., Huang, X., Mo, J., Zhao, W. 2016. Drug Delivery Using Nanoparticles for Cancer Stem-Like Cell Targeting. *Front Pharmacol* 7, 84.
- Lu, X., Zhu, T., Chen, C., Liu, Y. 2014. Right or left: the role of nanoparticles in pulmonary diseases. *Int J Mol Sci* 15, 17577.
- Ma, D.D., Yang, W.X. 2016. Engineered nanoparticles induce cell apoptosis: potential for cancer therapy. *Oncotarget*.
- Matsuda, A., Orihara, K., Fukuda, S., Fujinaga, H., Matsumoto, K., Saito, H. 2008. Corticosteroid enhances TNF- α -mediated leukocyte adhesion to pulmonary microvascular endothelial cells. *Allergy* 63, 1610.
- Mohamud, R., Xiang, S.D., Selomulya, C., Rolland, J.M., O'Hehir, R.E., Hardy, C.L., Plebanski, M. 2014. The effects of engineered nanoparticles on pulmonary immune homeostasis. *Drug Metab Rev* 46, 176.
- Noel, C., Simard, J.C., Girard, D. 2016. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro* 31, 12.
- Paino, I.M., Zucolotto, V. 2015. Poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles: activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 39, 614.
- Papatheofanis, F.J., Barmada, R. 1991. Polymorphonuclear leukocyte degranulation with exposure to polymethylmethacrylate nanoparticles. *J Biomed Mater Res* 25, 761.
- Pelletier, M., Girard, D. 2005. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* 141, 315.

- Pelletier, M., Lavastre, V., Girard, D. 2002. Activation of human epithelial lung a549 cells by the pollutant sodium sulfite: enhancement of neutrophil adhesion. *Toxicol Sci* 69, 210.
- 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.
- Poirier, M., Simard, J.C., Girard, D. 2015. Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol*, 1.
- Saito, Y., Takeda, M., Nishikawa, J., Konno, Y., Tamaki, M., Itoga, M., Kobayashi, Y., Moritoki, Y., Ito, W., Chihara, J., Ueki, S. 2014. The effect of pharmacological PI3Kgamma inhibitor on eotaxin-induced human eosinophil functions. *Pulm Pharmacol Ther* 27, 164.
- Sano, M., Leff, A.R., Myou, S., Boetticher, E., Meliton, A.Y., Learoyd, J., Lambertino, A.T., Munoz, N.M., Zhu, X. 2005. Regulation of interleukin-5-induced beta2-integrin adhesion of human eosinophils by phosphoinositide 3-kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 65.
- Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A. 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 343, 57.
- Soares, T., Ribeiro, D., Proenca, C., Chiste, R.C., Fernandes, E., Freitas, M. 2015. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human neutrophils assessed by multiple analytical approaches. *Life Sci*.
- Soares, T., Ribeiro, D., Proenca, C., Chiste, R.C., Fernandes, E., Freitas, M. 2016. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human neutrophils assessed by multiple analytical approaches. *Life Sci* 145, 247.
- Tachimoto, H., Bochner, B.S. 2000. The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol* 76, 45.
- Yamaguchi, T., Kimura, H., Kurabayashi, M., Kozawa, K., Kato, M. 2008. Interferon-gamma enhances human eosinophil effector functions induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-5. *Immunol Lett* 118, 88.
- Zhu, X., Jacobs, B., Boetticher, E., Myou, S., Meliton, A., Sano, H., Lambertino, A.T., Munoz, N.M., Leff, A.R. 2002. IL-5-induced integrin adhesion of human eosinophils caused by ERK1/2-mediated activation of cPLA2. *J Leukoc Biol* 72, 1046.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif principal de ce mémoire consistait à évaluer l'effet direct des NPs sur les éosinophiles humains, plus précisément, sur leur fonction d'adhérence. Il faut d'abord savoir que l'article présenté dans ce mémoire correspond seulement au second article présent dans la littérature scientifique traitant sur le sujet. Étant donné le manque d'information dans ce nouveau créneau de recherche, nous allons, à certains moments, comparer les éosinophiles avec leurs cellules sœurs : les neutrophiles. Il est connu que certaines fonctions du neutrophile sont très similaires à celles des éosinophiles. De plus, ce granulocyte est bien connu dans la littérature et plusieurs études ont évalué l'effet direct des NPs sur leurs différentes fonctions ainsi que sur leur biologie.

Tout d'abord, nous avons commencé par la caractérisation des NPs à l'aide de la technique de diffusion dynamique de la lumière avec un zetasizer. En fait, il aurait été idéal de les caractériser à l'aide d'autres techniques connues, comme la microscopie électronique à balayage ou encore la microscopie électronique en transmission, afin d'augmenter la validité et de compléter cette caractérisation. Bref, une meilleure caractérisation des NPs aurait pu nous apporter d'autres pistes afin d'expliquer nos résultats ou d'en apprendre davantage sur le comportement de ceux-ci. Lors de l'achat des NPs chez le fabricant, celles-ci sont vendues avec une taille et une charge de surface précise. Par contre, il est connu que lorsque les NPs sont diluées dans différents milieux, par exemple, dans un milieu physiologique, elles peuvent s'agglomérer ensemble ou avec d'autres particules du milieu (Jiang *et al.*, 2009). Il est donc très important de les caractériser dans les milieux dans lesquels elles seront retrouvées pendant les expériences. Le milieu utilisé lors de nos expériences incluait du sérum de veau fœtal. Celui-ci contient une grande quantité de protéines qui peuvent se lier à la surface des NPs et ainsi augmenter leur taille ou encore favoriser leur agglomération. Il aurait été intéressant d'évaluer le type d'agglomération de nos NPs, afin de voir si la différence de taille des NPs, suite à leur caractérisations est causée par l'agglomération entre les NPs ou bien si elle est causée par des liens avec d'autres particules/protéines du milieu. De plus, la charge à la surface des NPs joue un rôle important sur la capacité d'une NP à se lier aux différentes protéines et ainsi les porter à sa surface. Cette charge de surface peut aussi varier selon les différents milieux, dépendamment des molécules retrouvées dans le milieu pouvant s'attacher à la NP (Jiang *et al.*, 2009). Nous avons également réalisé la caractérisation des NPs dans l'eau (résultats non présentés) et observé que la charge de surface des NPs varie beaucoup dépendamment du

milieu, renforçant du même coup la nécessité d'effectuer la caractérisation dans le bon milieu physiologique. Idéalement, les expériences et la caractérisation seraient effectuées dans du sérum humain afin de se rapprocher le plus possible de la situation physiologique chez l'Homme. Toutefois, plusieurs contraintes telles que le volume de sérum nécessaire et le coût associé ont fait en sorte que nous avons utilisé le sérum de vœu fœtal dans nos expériences. De plus, il est important d'évaluer l'état de dispersion des NPs étant donné qu'il peut être instable et ainsi augmenter la variabilité des résultats obtenus. Lorsque les NPs sont bien dispersées dans le liquide, elles ont tendance à posséder une taille hydrodynamique plus grande (Buford *et al.*, 2007). La caractérisation des NPs est essentielle puisqu'elle permet d'anticiper les interactions que peuvent avoir les NPs avec les systèmes biologiques, comme l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. Finalement, les études sur la toxicologie des NPs sont complexes étant donné que les NPs sont fabriquées avec des caractéristiques différentes selon leurs utilisations faisant en sorte que l'étude toxicologique d'une NP est seulement précise et valable pour cette NP de même taille, de même charge de surface, de même état de dispersion, de même forme ainsi que de même composition chimique (Jiang *et al.*, 2009). Ceci explique pourquoi la première étape de toutes études toxicologiques utilisant des NPs est d'effectuer la meilleure caractérisation possible des NPs étudiées.

Étant donné l'existence de peu d'études publiées en lien avec l'interaction directe des NPs sur les éosinophiles, il était difficile d'établir les concentrations avec lesquelles effectuer nos expériences qui seraient représentatives d'une concentration physiologique d'une exposition aux NPs. Par conséquent, nous nous sommes basés sur les concentrations connues pouvant causer des effets chez le neutrophile humain (50µg/ml et 100µg/ml) (Goncalves *et al.*, 2011, Noel *et al.*, 2016, Poirier *et al.*, 2016). L'évaluation de la concentration à laquelle l'Homme est exposé aux NPs quotidiennes demeure complexe. En effet, le type de NPs, la dose et la fréquence d'exposition varient d'un individu à l'autre et dépendent de plusieurs facteurs dont l'alimentation, le travail et les habitudes de vie. Toutefois, certaines personnes, notamment les travailleurs œuvrant dans la fabrication des NPs, sont plus à risque. La complexité du système biologique humain ainsi que la connaissance à ce jour des NPs font en sorte que peu d'études ont réellement démontré le niveau d'exposition de l'Homme aux NPs. Cependant, une étude révèle, à l'aide de calculs mathématiques, grâce aux données d'exposition fournies par la compagnie qui produit la NP d'argent (Ag), que les employés travaillant huit heures par jour pendant cinq jours par semaine pouvaient être exposés à une concentration de 10µg/ml de la NP (Gliga *et al.*, 2014). Cela demeure une évaluation arbitraire et mathématique d'une

concentration pouvant être présente chez tout homme travaillant avec les NPs d'argent. Une autre étude portant sur les NPs de nickel a démontré qu'un être humain normal possède environ 10µg/ml de nickel dans son urine (Phillips *et al.*, 2010), ce qui est du même ordre de grandeur. Finalement, les travailleurs exposés au nickel avec une protection respiratoire possédaient seulement le quart de la concentration de nickel dans leur urine comparativement à ceux qui ne portaient aucune protection respiratoire (Morgan *et al.*, 1984). Cela démontre que la voie d'exposition par inhalation est significative. Enfin, cette dernière étude, effectuée il y a déjà plusieurs années, ne faisait toutefois pas la distinction entre les particules et les NPs de nickel. Bref, l'étude des NPs est encore à ses débuts et, à ce jour, aucune étude ne démontre précisément la concentration à laquelle l'homme se voit exposé à ces différentes NPs.

Afin d'évaluer l'adhérence des éosinophiles humains, des cellules EA.hy926 ont été utilisées pour mimer un tapis cellulaire endothélial. Ces cellules proviennent de la fusion entre des cellules primaires de la veine ombilicale et des cellules A549 issues de cellules épithéliales du poumon humain. Des études portant sur l'interaction entre des NPs et les éosinophiles ont démontré que les NPs modifiaient certaines fonctions, ainsi que la biologie des éosinophiles (Silva *et al.*, 2016, Vallieres *et al.*, 2016). Dans notre étude, nous avons observé que les NPs de TiO₂ augmentaient la capacité des éosinophiles humains sur les cellules EA.hy926. Ces résultats sont comparables à ce qui a été vu chez les neutrophiles, où a été observé un changement dans la capacité des neutrophiles à adhérer sur des cellules endothéliales HUVEC induit par une NP (Dianzani *et al.*, 2006). Il semble donc que la modulation de l'adhérence par les NPs peut se généraliser chez différents granulocytes. Dans notre étude, d'autres NPs, mise à part celles de TiO₂, par exemple la magnétite (Fe₃O₄), le platine (Pt) et le palladium (Pd) ont augmenté considérablement l'adhérence des éosinophiles. Par conséquent, l'adhérence est une fonction de l'éosinophile qui est sensible aux NPs. Dans la littérature, il est connu que la NP de TiO₂ peut jouer directement sur la biologie des neutrophiles humains à cette même concentration, notamment sur la morphologie cellulaire et l'induction de certaines voies signalétiques (Goncalves *et al.*, 2010). Par contre, sa capacité à moduler l'adhérence des granulocytes n'avait pas encore fait l'objet d'aucune étude. Cette augmentation considérable de l'adhérence des éosinophiles par les NPs de TiO₂ n'est pas causée par l'activation des voies apoptotiques, puisqu'elles n'induisaient aucune mort cellulaire tel qu'observé en cytologie et en cytométrie en flux suivant 24 heures de stimulation. Ainsi, puisque le test d'adhérence se fait en moins de trois heures, cela démontre que l'activation des voies de mort cellulaire n'est pas en cause. Tel que discuté précédemment dans ce mémoire, l'interaction des molécules d'adhésion

avec leur récepteur présent sur les cellules endothéliales est essentielle au roulement et à l'adhérence ferme de l'éosinophile sur l'endothélium vasculaire. Les intégrines sont les molécules principales permettant l'adhérence ferme aux cellules endothéliales. Chez l'éosinophile, les intégrines CD18, CD29, CD49d, CD11a et CD11b qui ont toutes été évaluées dans notre étude sont connues plus particulièrement pour leur rôle primordial dans l'adhérence (Barthel *et al.*, 2008). Par contre, puisqu'il n'a pas eu de régulation de l'expression de ces molécules d'adhésion par la NP de TiO₂, il aurait été intéressant de vérifier la modulation d'autres intégrines de l'éosinophile tel que CD49f ou bien le CD11c également connu pour sa participation à l'adhérence cellulaire (Barthel *et al.*, 2008). De plus, nous avons évalué ICAM1 et ICAM3 qui sont des récepteurs importants, mais qui sont faiblement exprimés à la surface de l'éosinophile. Puisque le mécanisme d'adhérence ferme utilise aussi, des sélectines exprimées toutefois en moindre quantité, et que les E-selectines peuvent être exprimées par des cellules endothéliales en cas d'inflammation (Ley *et al.*, 2007), il aurait été pertinent d'évaluer le ligand des sélectines, P-sélectine glycoprotéines ligand (PSGL-1) à la surface des éosinophiles. Par contre, le fait d'utiliser des éosinophiles humains fraîchement isolés limite la quantité totale de cellules ainsi que nos choix de conditions. De plus, il aurait été aussi intéressant d'évaluer le changement d'affinité de ces molécules d'adhésion afin de voir si les NPs sont capables de moduler l'affinité de celles-ci. Cela pourrait augmenter la force d'adhérence de chacune des molécules ou même d'augmenter le nombre de molécules attachées à leur récepteur. Bref, pour le moment, les résultats indiquent que la NP de TiO₂ n'affecte pas l'expression des huit différentes molécules importantes dans l'adhérence chez l'éosinophile après 30min (ce travail) et 1h30min (résultats non présentés). Un des aspects de l'adhérence cellulaire qui n'a pas été abordé dans notre étude est la modulation des molécules à la surface des cellules EA.hy926 puisque nous n'avons pas stimulé directement ces cellules avec les NPs. Toutefois, la stimulation des éosinophiles aux NPs de TiO₂ pourrait induire une sécrétion de cytokines qui modulerait l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules EA.hy926, permettant ainsi d'expliquer l'augmentation de l'adhérence des éosinophiles observées. De plus, il est connu que les chimiokines classiques sont des activateurs physiologiques puissants de la liaison des intégrines dans l'adhérence cellulaire (Ley *et al.*, 2007). Donc, l'évaluation de la présence de de chimiokines dans le milieu lors de l'expérience d'adhérence aurait été fort intéressante à réaliser afin d'ouvrir une autre piste d'investigation de l'augmentation de l'adhérence cellulaire par la NP. Également, comme il a été observé que les NPs de TiO₂ augmentent de 140% la production de ROS chez les neutrophiles humains (Masoud *et al.*, 2015). Nous avons également observé une induction de ROS chez les éosinophiles avec

plusieurs NPs (rapport IRSST en annexe). Il a été démontré que les NPs de ZnO stimulent également la sécrétion de ROS chez les éosinophiles (Silva *et al.*, 2016). Les ROS ainsi libérés pourraient être en mesure de modifier l'expression protéique à la surface des cellules endothéliales et favoriser leur adhérence. Enfin, puisque peu d'informations sont connues sur l'interaction entre les éosinophiles et les NPs, d'autres effets cytotoxiques pourraient être causés par les NPs et avoir un impact sur leur fonction d'adhérence. Il serait donc intéressant d'effectuer d'autres tests de cytotoxicité, par exemple la formation d' « éosinophils extracellular traps » chez l'éosinophile face à la NP de TiO₂, puisqu'il a été démontré que certaines NPs pouvaient induire les « neutrophils extracellular traps » par les neutrophiles humains (Hwang *et al.*, 2015).

On remarque aussi que la NP de TiO₂ agit de façon dose-dépendante en augmentant l'adhérence des éosinophiles. D'autres études ont aussi démontré que cette NP était capable d'agir de façon dose-dépendante en augmentant le nombre de leucocytes présents « in vivo » à l'intérieur d'une poche d'air créée artificiellement (Goncalves *et al.*, 2011), et ce, en diminuant l'apoptose, en augmentant la production d'IL-8 chez le neutrophile humain (Goncalves *et al.*, 2010) ainsi qu'en augmentant le stress oxydatif et le dommage à l'ADN (Pakrashi *et al.*, 2014). Enfin, tout comme pour d'autres fonctions et types cellulaires, la NP de TiO₂ est capable d'agir de façon dose-dépendante sur l'augmentation de l'adhérence cellulaire des éosinophiles humains sur un tapis endothélial.

Après avoir investigué différentes voies signalétiques importantes de l'éosinophile face à la NP de TiO₂, nous avons observé une phosphorylation rapide de la protéine Akt. Ainsi, la voie Pi3K/Akt est connue pour être importante dans la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et l'apoptose (Porta *et al.*, 2014). L'activation aberrante de cette voie peut causer la survie prolongée de différentes cellules (Brugge *et al.*, 2007). Donc, il aurait été intéressant de vérifier la viabilité suivant une stimulation de 36 ou même encore 48 heures afin de voir si l'apoptose spontanée des éosinophiles aurait pu être retardée par la NP de TiO₂. Étant une voie connue pour être activée par de nombreux récepteurs de surface cellulaire et de récepteurs intracellulaires (Brugge *et al.*, 2007), la voie Pi3K/Akt possède une bonne sensibilité aux différentes molécules extérieures comme les NPs. De plus, il a été démontré que la voie Pi3K/Akt joue un rôle important dans l'adhérence cellulaire (Diaz-Munoz *et al.*, 2013, Ding *et al.*, 2017). Nous avons d'abord vérifié si cette voie signalétique était activée chez les éosinophiles suivant leurs stimulations par les NP de TiO₂. La stimulation des éosinophiles par les NPs de

TiO₂ induit une activation rapide d'Akt. Ensuite, nous avons donc utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie, soit la wortmannin, afin de vérifier si son activation jouait un rôle dans l'augmentation de l'adhérence cellulaire des éosinophiles causée par la NP de TiO₂. L'inhibiteur wortmannin est un excellent choix et est fréquemment utilisé dans la littérature. Il est spécifique à la voie Pi3K/Akt et il se lie de façon covalente à la protéine Pi3K (Powis *et al.*, 1994). L'utilisation de la wortmannin permet de renverser l'effet du TiO₂ sur l'adhérence cellulaire. En plus, il est possible de voir, grâce au contrôle sans TiO₂, que l'inhibiteur ne renverse pas l'adhérence de base des éosinophiles, mais bien seulement lorsque ceux-ci ont été stimulés à la NP de TiO₂, ce qui confirme l'importance de cette voie dans l'augmentation de l'adhérence des éosinophiles. Par contre, nous avons observé une inhibition partielle suivant l'utilisation de la wortmannin ce qui suggère qu'il y aurait d'autres voies signalétiques impliquées. Nous avons donc évalué l'activation d'autres voies signalétiques telles que la voie des MAPKs Erk1-2 et p38. Tandis que la voie Erk1-2 n'était pas affectée par la stimulation aux NPs de TiO₂, une activation rapide de p38 a été observée. Une diminution non significative de l'adhérence des éosinophiles a été observée suivant le prétraitement des cellules avec un inhibiteur sélectif de la protéine p38, le SB203580. Enfin, il serait très intéressant d'évaluer la combinaison d'inhibiteur afin d'inhiber à la fois la voie du Pi3K Akt et la voie de p38, dans le but de voir si l'adhérence induite par les NPs de TiO₂ pourrait être complètement renversée. D'autres voies signalétiques connues pour être importantes chez l'éosinophile comme la voie Jak-STAT 1 (Pazdrak *et al.*, 1995) ou encore la voie de Lyn (Gorska *et al.*, 2006) seraient intéressantes à investiguer. Bref, il est évident que l'augmentation de l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains par la NP de TiO₂ passe par l'activation de la voie Pi3K/Akt. Cependant, les mécanismes d'action exacts demeurent inconnus.

Enfin, l'utilisation de cellules primaires humaines comporte de réels avantages, par exemple, elles sont plus représentatives que les lignées cellulaires souvent dérivées de cellules cancéreuses. Par contre, cela soulève différentes difficultés de manipulation comparativement à des cellules en culture. D'abord, lorsque l'on isole les cellules d'un donneur sain pour une expérience, nous ne savons jamais combien de cellules seront obtenues, spécifiquement pour les éosinophiles, puisque l'on retrouve normalement seulement 1-3% de ces leucocytes du sang et cela peut varier considérablement d'un donneur à l'autre. Ainsi, il faut souvent limiter le nombre de conditions au minimum puisque la majorité du temps, la quantité de cellules obtenues par donneur est insuffisante. Des choix difficiles s'imposent et certains aspects de notre recherche se voient être retardés. De plus, le coût associé à la technique d'isolement peut

rapidement devenir important et ainsi justifier l'abandon de certaines conditions expérimentales. De surcroît, sachant que les éosinophiles jouent un rôle important dans les allergies, il est facile de remarquer que lors des saisons allergiques, certains donneurs possèdent une concentration d'éosinophiles plus élevée qu'à la normale. Nous pouvons alors nous poser la question suivante : ces éosinophiles sont-ils déjà activés avant même l'expérience? Puisqu'il est maintenant connu que les éosinophiles qui sont activés sont hypodenses, ce qui leur permet d'être perdu lors de la séparation au gradient de Ficoll. De plus, leur activation permet à un certain nombre d'entre eux de devenir CD16B positif, ce qui fait en sorte qu'il sont éliminés avec les neutrophiles lors de la sélection négative en colonne magnétique (Davoine *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant d'investiguer davantage sur ce questionnement. De plus, il a été observé dans notre laboratoire que la réponse entre les différents donneurs varie énormément, ce qui cause souvent de grands écarts-types dans les résultats.

D'année en année, l'utilisation des NPs se voit sans cesse grandissante dans nos produits d'utilisation quotidienne. Voilà pourquoi il est très important de poursuivre les études sur la toxicologie et la recherche fondamentale des NPs. Encore à ce jour, les données ne nous permettent pas d'évaluer précisément l'exposition humaine aux NPs. Pour conclure, l'objectif de ce grand projet sur les NPs et les éosinophiles a pour but d'identifier l'effet que peuvent avoir, chez l'homme, certaines NPs présentes dans notre environnement. Pendant ce travail, nous avons, entre autres, démontré que certaines NPs étaient capables de moduler la fonction d'adhérence cellulaire des éosinophiles humains sur un substrat de cellules endothéliales. De plus, nous avons montré que la NP de TiO₂ était capable d'agir de façon dose-dépendante sur l'augmentation de l'adhérence cellulaire des éosinophiles sans moduler l'expression des huit molécules d'adhésion cellulaire importantes chez l'éosinophile. Aussi, nous avons démontré que la voie Pi3K/AkT était activée par la NP de TiO₂ et qu'elle est d'une grande importance dans l'augmentation de l'adhérence cellulaire chez l'éosinophile humain. Enfin, ce projet demande énormément de temps et de recherche afin d'établir un grand tableau de synthèse des différents effets des NPs.

Afin de créer un tableau complet, il serait indispensable de tester plusieurs NPs de différentes tailles sur davantage de fonctions de l'éosinophile. Il faudra aussi tester ces NPs sur d'autres cellules du système immunitaire qui sont aussi en contact direct avec elles, comme les macrophages, les neutrophiles ou encore les lymphocytes. L'étude sur les différents types cellulaires est aussi importante afin d'avoir un portrait réaliste des effets des NPs sur l'homme,

sachant que ceux-ci ne réagiront pas nécessairement comme les éosinophiles. Cela nous amène à conclure que tout est contexte-dépendant et que chaque facteur ou chaque détail doit être pris en considération: le donneur utilisé, la cellule cible, la taille de la NP, la concentration des cellules, la concentration de la NP, le type de NP ainsi que le milieu dans lequel les NPs seront suspendues. Ainsi, nous retrouvons des effets complètement différents des NPs sur les différents types cellulaires utilisés, ce qui rend l'étude des NPs difficilement extrapolable même entre deux types cellulaires très semblables.

RÉFÉRENCES

- Abtin A, Jain R, Mitchell AJ, Roediger B, Brzoska AJ, Tikoo S, Cheng Q, Ng LG, Cavanagh LL, von Andrian UH, Hickey MJ, Firth N & Weninger W (2014) Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol* 15(1):45-53.
- Aderem A & Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ & Forrest ML (2009) Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 61(6):457-466.
- Alangari AA (2014) Corticosteroids in the treatment of acute asthma. *Ann Thorac Med* 9(4):187-192.
- Aldossari AA, Shannahana JH, Podila R & Brown JM (2015) Influence of physicochemical properties of silver nanoparticles on mast cell activation and degranulation. *Toxicology in Vitro* 29(1):195-203.
- Altstaedt J, Kirchner H & Rink L (1996) Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89(4):563-568.
- Amin KA, Hassan MS, Awad el ST & Hashem KS (2011) The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J Nanomedicine* 6:143-149.
- Andersson PO, Lejon C, Ekstrand-Hammarstrom B, Akfur C, Ahlinder L, Bucht A & Osterlund L (2011) Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO₂ nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small* 7(4):514-523.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ & Gause WC (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7(12):975-987.
- Anwar AR, Moqbel R, Walsh GM, Kay AB & Wardlaw AJ (1993) Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J Exp Med* 177(3):839-843.
- Arviso R, Bhattacharya R & Mukherjee P (2010) Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opin Drug Deliv* 7(6):753-763.
- Aslan K, Gryczynski I, Malicka J, Matveeva E, Lakowicz JR & Geddes CD (2005) Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 16(1):55-62.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO₂, CeO₂ 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. *Bba-Gen Subjects* 1850(11):2276-2282.
- Bainton DF & Farquhar MG (1968) Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. *J Cell Biol* 39(2):286-298.
- Bandeira-Melo C, Woods LJ, Phoofolo M & Weller PF (2002) Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. *J Exp Med* 196(6):841-850.
- Barthel SR, Jarjour NN, Mosher DF & Johansson MW (2006) Dissection of the hyperadhesive phenotype of airway eosinophils in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(3):378-386.
- Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM & Mosher DF (2008) Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol* 83(1):1-12.

- Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C & Lasky LA (1994) Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84(8):2554-2565.
- Bedard K & Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1):245-313.
- Behm CA & Ovington KS (2000) The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 16(5):202-209.
- Bennat C & Muller-Goymann CC (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int J Cosmet Sci* 22(4):271-283.
- Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB & Wardlaw AJ (1993) Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92(6):857-868.
- Bergamini G, Ceroni P, Balzani V, Gingras M, Raimundo JM, Morandi V & Merli PG (2007) Synthesis of small gold nanoparticles: Au(I) disproportionation catalyzed by a persulfurated coronene dendrimer. *Chem Commun (Camb)* 10.1039/b708115d(40):4167-4169.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V & Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19(1):41-52.
- Bloemen PG, Van den Tweel MC, Henricks PA, Engels F, Van de Velde MJ, Blomjous FJ & Nijkamp FP (1996) Stimulation of both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion. *Am J Physiol* 270(1 Pt 1):L80-87.
- Bochner BS (2009) Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy* 39(3):317-324.
- Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D & Schleimer RP (1991) Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 173(6):1553-1557.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D & Oberdorster E (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 3:11.
- Brazil DP & Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26(11):657-664.
- Brugge J, Hung MC & Mills GB (2007) A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 12(2):104-107.
- Brunet LR, Sabin EA, Cheever AW, Kopf MA & Pearce EJ (1999) Interleukin 5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response or host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4-producing non-T, non-B cells. *Infect Immun* 67(6):3014-3018.
- Buford MC, Hamilton RF, Jr. & Holian A (2007) A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 4:6.
- Cadman ET & Lawrence RA (2010) Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunol* 32(1):1-19.
- Campbell KS & Colonna M (1999) DAP12: a key accessory protein for relaying signals by natural killer cell receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 31(6):631-636.
- Cannon GJ & Swanson JA (1992) The macrophage capacity for phagocytosis. *J Cell Sci* 101 (Pt 4):907-913.

- Capron M, Soussi Gounni A, Morita M, Truong MJ, Prin L, Kinet JP & Capron A (1995) Eosinophils: from low- to high-affinity immunoglobulin E receptors. *Allergy* 50(25 Suppl):20-23.
- Carman CV & Springer TA (2004) A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167(2):377-388.
- Casali P & Schettino EW (1996) Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 210:167-179.
- Champion JA & Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13):4930-4934.
- Chang JT, Wherry EJ & Goldrath AW (2014) Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 15(12):1104-1115.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S3-23.
- Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJW & Yang PC (2006) Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J* 20(13):2393-+.
- 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.
- Choi EN, Choi MK, Park CS & Chung IY (2003) A parallel signal-transduction pathway for eotaxin- and interleukin-5-induced eosinophil shape change. *Immunology* 108(2):245-256.
- Conesa A, Tassinari P, Rivera H, De Sanctis JB, Bianco N & Aldrey O (2002) Hypodense eosinophils: characterization of surface molecule expression. *Allergy Asthma Proc* 23(2):117-124.
- Conus S, Bruno A & Simon HU (2005) Leptin is an eosinophil survival factor. *J Allergy Clin Immunol* 116(6):1228-1234.
- Cook-Mills JM, Marchese ME & Abdala-Valencia H (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 15(6):1607-1638.
- Coutinho A, Kazatchkine MD & Avrameas S (1995) Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7(6):812-818.
- Czech W, Krutmann J, Budnik A, Schopf E & Kapp A (1993) Induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in normal human eosinophils by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 100(4):417-423.
- Davoine F, Lavigne S, Chakir J, Ferland C, Boulay ME & Laviolette M (2002) Expression of FcγRIII (CD16) on human peripheral blood eosinophils increases in allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 109(3):463-469.
- de Bruin AM, Buitenhuis M, van der Sluijs KF, van Gisbergen KP, Boon L & Nolte MA (2010) Eosinophil differentiation in the bone marrow is inhibited by T cell-derived IFN-γ. *Blood* 116(14):2559-2569.
- de Chastellier C & Thilo L (1997) Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol* 74(1):49-62.
- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ & Geertsma RE (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29(12):1912-1919.
- DeChatelet LR, Shirley PS, McPhail LC, Huntley CC, Muss HB & Bass DA (1977) Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood* 50(3):525-535.
- Decot V & Capron M (2006) [Eosinophils: structure and functions]. *Presse Med* 35(1 Pt 2):113-124.

- DeCoursey TE (2016) The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase. *Immunol Rev* 273(1):194-218.
- Delves PJ & Roitt IM (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343(1):37-49.
- Dent LA, Strath M, Mellor AL & Sanderson CJ (1990) Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* 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 Paola A, Bellardita M & Palmisano L (2013) Brookite, the Least Known TiO₂ Photocatalyst. *Catalysts* 3(1):36-73.
- Dianzani C, Cavalli R, Zara GP, Gallicchio M, Lombardi G, Gasco MR, Panzanelli P & Fantozzi R (2006) Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. *Br J Pharmacol* 148(5):648-656.
- Diaz-Munoz MD, Osma-Garcia IC, Iniguez MA & Fresno M (2013) Cyclooxygenase-2 deficiency in macrophages leads to defective p110gamma PI3K signaling and impairs cell adhesion and migration. *J Immunol* 191(1):395-406.
- Ding L, Shen Y, Ni J, Ou Y, Ou Y & Liu H (2017) EphA4 promotes cell proliferation and cell adhesion-mediated drug resistance via the AKT pathway in multiple myeloma. *Tumour Biol* 39(3):1010428317694298.
- Du J, Stankiewicz MJ, Liu Y, Xi Q, Schmitz JE, Lekstrom-Himes JA & Ackerman SJ (2002) Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 277(45):43481-43494.
- Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F & Maxfield FR (2000) Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci* 113 (Pt 7):1287-1298.
- Edwards BS, Curry MS, Tsuji H, Brown D, Larson RS & Sklar LA (2000) Expression of P-selectin at low site density promotes selective attachment of eosinophils over neutrophils. *J Immunol* 165(1):404-410.
- Eom HJ & Choi J (2009) Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. *Toxicol Lett* 187(2):77-83.
- Fala L (2016) Nucala (Mepolizumab): First IL-5 Antagonist Monoclonal Antibody FDA Approved for Maintenance Treatment of Patients with Severe Asthma. *Am Health Drug Benefits* 9(Spec Feature):106-110.
- Fialkow L, Wang Y & Downey GP (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42(2):153-164.
- Fitzharris P, Cromwell O, Moqbel R, Hartnell A, Walsh GM, Harvey C & Kay AB (1987) Leukotriene B₄ generation by human neutrophils following IgG-dependent stimulation. *Immunology* 61(4):449-455.
- Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D & Kay AB (2003) Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 112(7):1029-1036.
- Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI & Young IG (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183(1):195-201.
- Frigas E & Gleich GJ (1986) The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 77(4):527-537.
- Fujihara S, Ward C, Dransfield I, Hay RT, Uings IJ, Hayes B, Farrow SN, Haslett C & Rossi AG (2002) Inhibition of nuclear factor-kappaB activation un-masks the ability of TNF-alpha to induce human eosinophil apoptosis. *Eur J Immunol* 32(2):457-466.

- Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ & Abraham D (2006) Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval strongyloides stercoralis in mice. *Infect Immun* 74(10):5730-5738.
- Gamer AO, Leibold E & van Ravenzwaay B (2006) The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol In Vitro* 20(3):301-307.
- Ganley-Leal LM, Mwinzi PN, Cetre-Sossah CB, Andove J, Hightower AW, Karanja DM, Colley DG & Secor WE (2006) Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans. *Infect Immun* 74(4):2169-2176.
- Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, Dar AM, Qasim K & Zubair S (2014) Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *Biomed Res Int* 2014:498420.
- Geiser M, Wigge C, Conrad ML, Eigeldinger-Berthou S, Kunzi L, Garn H, Renz H & Mall MA (2014) Nanoparticle uptake by airway phagocytes after fungal spore challenge in murine allergic asthma and chronic bronchitis. *BMC Pulm Med* 14:116.
- Germain RN (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2(5):309-322.
- Gluga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B & Karlsson HL (2014) Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 11:11.
- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *International Immunopharmacology* 11(8):1109-1115.
- 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. *Toxicol In Vitro* 28(5):926-931.
- Gorska MM, Cen O, Liang Q, Stafford SJ & Alam R (2006) Differential regulation of interleukin 5-stimulated signaling pathways by dynamin. *J Biol Chem* 281(20):14429-14439.
- Hagan P, Wilkins HA, Blumenthal UJ, Hayes RJ & Greenwood BM (1985) Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol* 7(6):625-632.
- Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR & Sips AJAM (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharm* 49(3):217-229.
- Hamelmann E & Gelfand EW (2001) IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev* 179:182-191.
- Hansel TT, De Vries IJ, Carballido JM, Braun RK, Carballido-Perrig N, Rihs S, Blaser K & Walker C (1992) Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J Immunol* 149(6):2130-2136.
- Harding CV & Geuze HJ (1992) Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells. *J Cell Biol* 119(3):531-542.
- Harter L, Keel M, Steckholzer U, Ungethuem U, Trentz O & Ertel W (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. *Shock* 18(5):401-406.
- He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D & Yang PC (2013) Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacol Sin* 34(10):1270-1283.

- 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.
- Heymann D, Jenneskens LW, Jehlicka J, Koper C & Vlietstra E (2003) Terrestrial and extraterrestrial fullerenes. *Fuller Nanotub Car N* 11(4):333-370.
- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S & Nagata K (2001) Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193(2):255-261.
- 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.
- Hoffman W, Lakkis FG & Chalasani G (2016) B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 11(1):137-154.
- 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.
- Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, Johansson M, Salcedo M, Ohlen C, Ljunggren HG, Sentman CL & Karre K (1997) Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol Rev* 155:11-28.
- Holland MJ, Harcus YM, Balic A & Maizels RM (2005) Th2 induction by *Nippostrongylus* secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors. *Immunol Lett* 96(1):93-101.
- Holling TM, Schooten E & van Den Elsen PJ (2004) Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* 65(4):282-290.
- Honda K & Chihara J (1999) Eosinophil activation by eotaxin--eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* 54(12):1262-1269.
- Hsiao IL & Huang YJ (2011) Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ* 409(7):1219-1228.
- Huang KL, Lee YH, Chen HI, Liao HS, Chiang BL & Cheng TJ (2015) Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *Journal of Hazardous Materials* 297:304-312.
- Hudson SA, Bovin NV, Schnaar RL, Crocker PR & Bochner BS (2009) Eosinophil-selective binding and proapoptotic effect in vitro of a synthetic Siglec-8 ligand, polymeric 6'-sulfated sialyl Lewis x. *J Pharmacol Exp Ther* 330(2):608-612.
- Hwang TL, Aljuffali IA, Hung CF, Chen CH & Fang JY (2015) The impact of cationic solid lipid nanoparticles on human neutrophil activation and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). *Chem Biol Interact* 235:106-114.
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-687.
- Inturi S, Wang G, Chen F, Banda NK, Holers VM, Wu L, Moghimi SM & Simberg D (2015) Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano* 9(11):10758-10768.
- 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.
- Jacoby DB, Gleich GJ & Fryer AD (1993) Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest* 91(4):1314-1318.

- Jiang JK, Oberdorster G & Biswas P (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 11(1):77-89.
- Jin T, Xu X & Hereld D (2008) Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44(1):1-8.
- Johnson JL & Newby AC (2009) Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 20(5):370-378.
- Kaida T, Kobayashi K, Adachi M & Suzuki F (2004) Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *J Cosmet Sci* 55(2):219-220.
- Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E & Schroder JM (1992) Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176(2):587-592.
- Kankaanranta H, De Souza PM, Barnes PJ, Salmon M, Giembycz MA & Lindsay MA (1999) SB 203580, an inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, enhances constitutive apoptosis of cytokine-deprived human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2):621-628.
- Kessler R (2011) Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environ Health Perspect* 119(3):a120-125.
- Kim BG, Lee PH, Lee SH, Park MK & Jang AS (2017) Effect of TiO₂ Nanoparticles on Inflammasome-Mediated Airway Inflammation and Responsiveness. *Allergy Asthma Immunol Res* 9(3):257-264.
- Kim IS, Baek M & Choi SJ (2010) Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells. *J Nanosci Nanotechnol* 10(5):3453-3458.
- Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A & McLeish KR (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Journal of Immunology* 164(8):4286-4291.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B & Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170(3):827-845.
- Kohli AK & Alpar HO (2004) Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int J Pharm* 275(1-2):13-17.
- Kolaczkowska E & Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(3):159-175.
- 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.
- Lambert AJ & Brand MD (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* 554:165-181.
- Lammermann T & Germain RN (2014) The multiple faces of leukocyte interstitial migration. *Semin Immunopathol* 36(2):227-251.
- Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y & Rittinger K (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277(12):10121-10128.
- Lee BJ, Naclerio RM, Bochner BS, Taylor RM, Lim MC & Baroody FM (1994) Nasal challenge with allergen upregulates the local expression of vascular endothelial adhesion molecules. *J Allergy Clin Immunol* 94(6 Pt 1):1006-1016.

- Leung YH, Yung MM, Ng AM, Ma AP, Wong SW, Chan CM, Ng YH, Djuricic AB, Guo M, Wong MT, Leung FC, Chan WK, Leung KM & Lee HK (2015) Toxicity of CeO₂ nanoparticles - the effect of nanoparticle properties. *J Photochem Photobiol B* 145:48-59.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9):678-689.
- Lichtenstein LM, Marone G, Thomas LL & Malveaux FJ (1978) The role of basophils in inflammatory reactions. *J Invest Dermatol* 71(1):65-69.
- Liu K & Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234(1):45-54.
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu FF, Randolph GJ, Rudensky AY & Nussenzweig M (2009) In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324(5925):392-397.
- Lloyd CM & Rankin SM (2003) Chemokines in allergic airway disease. *Curr Opin Pharmacol* 3(4):443-448.
- Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, Wagtmann N & Winter CC (1997) Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* 155:135-144.
- Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, Gillis D, Ireland R, Olwell E & Park LS (1991) Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol Chem* 266(36):24741-24747.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD & Xia B (2012) CD4(+)T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* Artn 925135
10.1155/2012/925135.
- Luttmann W, Opfer A, Dauer E, Foerster M, Matthys H, Eibel H, Schulze-Osthoff K, Kroegel C & Virchow JC (1998) Differential regulation of CD95 (Fas/APO-1) expression in human blood eosinophils. *Eur J Immunol* 28(7):2057-2065.
- Ma JY, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Scabillon J, Ma JK & Castranova V (2012) Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicol Appl Pharm* 262(3):255-264.
- Machida K, Inoue H, Matsumoto K, Tsuda M, Fukuyama S, Koto H, Aizawa H, Kureishi Y, Hara N & Nakanishi Y (2005) Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(5):L860-867.
- MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK & Hazen SL (2001) Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* 166(9):5763-5772.
- Mansson A & Cardell LO (2009) Role of atopic status in Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated activation of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 85(4):719-727.
- Mao C, Zhao Y, Qiu X, Zhu J & Burda C (2008) Synthesis, characterization and computational study of nitrogen-doped CeO₂ nanoparticles with visible-light activity. *Phys Chem Chem Phys* 10(36):5633-5638.
- Martin LB, Kita H, Leiferman KM & Gleich GJ (1996) Eosinophils in allergy: Role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Imm* 109(3):207-215.
- Masoud R, Bizouarn T, Trepout S, Wien F, Baciou L, Marco S & Houee Levin C (2015) Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Superoxide Anion Production by Acting on NADPH Oxidase. *PLoS One* 10(12):e0144829.
- Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P & Claesson-Welsh L (2002) p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 156(1):149-160.

- Mattes J & Foster PS (2003) Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by IL-5 and eotaxin. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2(2):169-174.
- Mayadas TN, Cullere X & Lowell CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9:181-218.
- McNagny K & Graf T (2002) Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *Journal of Experimental Medicine* 195(11):f43-f47.
- 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. *Lab Invest* 89(7):769-781.
- Miethling-Graff R, Rumpker R, Richter M, Verano-Braga T, Kjeldsen F, Brewer J, Hoyland J, Rubahn HG & Erdmann H (2014) Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro* 28(7):1280-1289.
- Min B (2008) Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol* 9(12):1333-1339.
- Min B, Brown MA & Legros G (2012) Understanding the roles of basophils: breaking dawn. *Immunology* 135(3):192-197.
- Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V & Rafailovich MH (2010) Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4(1):120-137.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP & Malik AB (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20(7):1126-1167.
- Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO & Riviere JE (2011) Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicol Sci* 123(1):264-280.
- Morgan LG & Rouge PJ (1984) Biological monitoring in nickel refinery workers. *IARC Sci Publ* (53):507-520.
- Moser R, Fehr J & Bruijnzeel PL (1992a) IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 149(4):1432-1438.
- Moser R, Fehr J, Olgiati L & Bruijnzeel PL (1992b) Migration of primed human eosinophils across cytokine-activated endothelial cell monolayers. *Blood* 79(11):2937-2945.
- Muhlfeld C, Geiser M, Kapp N, Gehr P & Rothen-Rutishauser B (2007) Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Part Fibre Toxicol* 4:7.
- Munitz A & Levi-Schaffer F (2007) Inhibitory receptors on eosinophils: a direct hit to a possible Achilles heel? *J Allergy Clin Immunol* 119(6):1382-1387.
- Munitz A, McBride ML, Bernstein JS & Rothenberg ME (2008) A dual activation and inhibition role for the paired immunoglobulin-like receptor B in eosinophils. *Blood* 111(12):5694-5703.
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K & Hirai K (2003) Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 171(8):3977-3982.
- Naik SH, Proietto AI, Wilson NS, Dakic A, Schnorrer P, Fuchsberger M, Lahoud MH, O'Keeffe M, Shao QX, Chen WF, Villadangos JA, Shortman K & Wu L (2005) Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174(11):6592-6597.

- Najib S & Sanchez-Margalet V (2002) Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell Immunol* 220(2):143-149.
- Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V & Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8(7):543-557.
- Nerlov C, McNagny KM, Doderlein G, Kowenz-Leutz E & Graf T (1998) Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev* 12(15):2413-2423.
- Newman MD, Stotland M & Ellis JI (2009) The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *J Am Acad Dermatol* 61(4):685-692.
- Nichols BA, Bainton DF & Farquhar MG (1971) Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol* 50(2):498-515.
- Noel C, Simard JC & Girard D (2016) Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro* 31:12-22.
- O'Flaherty JT, Showell HJ, Becker EL & Ward PA (1979) Neutrophil aggregation and degranulation. Effect of arachidonic acid. *Am J Pathol* 95(2):433-444.
- Oberdorster G, Ferin J & Lehnert BE (1994) Correlation between Particle-Size, in-Vivo Particle Persistence, and Lung Injury. *Environ Health Persp* 102:173-179.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
- Owen WF, Rothenberg ME, Petersen J, Weller PF, Silberstein D, Sheffer AL, Stevens RL, Soberman RJ & Austen KF (1989) Interleukin 5 and phenotypically altered eosinophils in the blood of patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J Exp Med* 170(1):343-348.
- 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.
- Pakrashi S, Jain N, Dalai S, Jayakumar J, Chandrasekaran PT, Raichur AM, Chandrasekaran N & Mukherjee A (2014) In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. *PLoS One* 9(2):e87789.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA & Horwitz AF (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385(6616):537-540.
- Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U & Jahnen-Dechent W (2009) Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small* 5(18):2067-2076.
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W & Jahnen-Dechent W (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3(11):1941-1949.
- Panda S & Ding JL (2015) Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol* 194(1):13-20.
- Park YM & Bochner BS (2010) Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2(2):87-101.
- Parkin J & Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270):1777-1789.
- Pattan G & Kaul G (2014) Health hazards associated with nanomaterials. *Toxicol Ind Health* 30(6):499-519.
- Pazdrak K, Olszewska-Pazdrak B, Stafford S, Garofalo RP & Alam R (1998) Lyn, Jak2, and Raf-1 kinases are critical for the antiapoptotic effect of interleukin 5, whereas only Raf-1

- kinase is essential for eosinophil activation and degranulation. *J Exp Med* 188(3):421-429.
- Pazdrak K, Stafford S & Alam R (1995) The activation of the Jak-STAT 1 signaling pathway by IL-5 in eosinophils. *J Immunol* 155(1):397-402.
- Peachman KK, Lyles DS & Bass DA (2001) Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1717-1722.
- Pease JE (2006) Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets* 7(1):3-12.
- Perussia B (1996) The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells. *Methods* 9(2):370-378.
- Peterson AP, Altman LC, Hill JS, Gosney K & Kadin ME (1981) Glucocorticoid receptors in normal human eosinophils: comparison with neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 68(3):212-217.
- Phillips JI, Green FY, Davies JC & Murray J (2010) Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles. *Am J Ind Med* 53(8):763-767.
- Poirier M, Simard JC & Girard D (2016) Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol* 13(3):375-385.
- Pope SM, Brandt EB, Mishra A, Hogan SP, Zimmermann N, Matthaei KI, Foster PS & Rothenberg ME (2001) IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 108(4):594-601.
- Pope SM, Fulkerson PC, Blanchard C, Akei HS, Nikolaidis NM, Zimmermann N, Molkentin JD & Rothenberg ME (2005a) Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J Biol Chem* 280(14):13952-13961.
- Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML & Rothenberg ME (2005b) The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 175(8):5341-5350.
- Porta C, Paglino C & Mosca A (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 4:64.
- Powell C, Milan SJ, Dwan K, Bax L & Walters N (2015) Mepolizumab versus placebo for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 10.1002/14651858.CD010834.pub2(7):CD010834.
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G & et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54(9):2419-2423.
- Procaccini C, Pucino V, De Rosa V, Marone G & Matarese G (2014) Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol* 5:143.
- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC & Pear WS (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11(3):299-308.
- Radziun E, Dudkiewicz Wilczynska J, Ksiazek I, Nowak K, Anuszevska EL, Kunicki A, Olszyna A & Zabkowski T (2011) Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicol In Vitro* 25(8):1694-1700.
- Rajput S, Pittman CU, Jr. & Mohan D (2016) Magnetic magnetite (Fe₃O₄) nanoparticle synthesis and applications for lead (Pb²⁺) and chromium (Cr⁶⁺) removal from water. *J Colloid Interface Sci* 468:334-346.
- Rasmussen JW, Martinez E, Louka P & Wingett DG (2010) Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv* 7(9):1063-1077.
- Reddy LS, Nisha MM, Joice M & Shilpa PN (2014) Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. *Pharm Biol* 52(11):1388-1397.

- Risom L, Moller P & Loft S (2005) Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 592(1-2):119-137.
- Rodriguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano MM, Lopez-Villegas EO & Sanchez-Garcia FJ (2015) Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology* 145(2):213-224.
- Rosenberg HF, Dyer KD & Foster PS (2013) Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 13(1):9-22.
- Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ & Dahinden CA (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176(6):1489-1495.
- Rothenberg ME (2004) Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 113(1):11-28; quiz 29.
- Rothenberg ME & Hogan SP (2006) The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174.
- Sajid M, Ilyas M, Basheer C, Tariq M, Daud M, Baig N & Shehzad F (2015) Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(6):4122-4143.
- Sallusto F, Geginat J & Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.
- Sallusto F & Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4):1109-1118.
- Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S & Zamoyska R (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 228(1):9-22.
- Sanderson CJ (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79(12):3101-3109.
- Savill J & Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-788.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB & Colvin VL (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 92(1):174-185.
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2):7-25.
- Schulz J, Hohenberg H, Pflucker F, Gartner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Barlag H & Wittern KP (2002) Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev* 54 Suppl 1:S157-163.
- Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN & Luscinskas FW (2001) Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* 167(4):2323-2330.
- Sheikh Bahaie N, Rao SP, Massoud A & Sriramarao P (2010) GM-CSF differentially regulates eosinophil and neutrophil adhesive interactions with vascular endothelium in vivo. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 9(4):207-217.
- Shi H, Magaye R, Castranova V & Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 10:15.
- Shibuya S, Ozawa Y, Watanabe K, Izuo N, Toda T, Yokote K & Shimizu T (2014) Palladium and platinum nanoparticles attenuate aging-like skin atrophy via antioxidant activity in mice. *PLoS One* 9(10):e109288.
- Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S & Dhawan A (2011) ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol In Vitro* 25(1):231-241.

- Silva LR & Girard D (2016) Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and IL-8. *Toxicol Lett* 259:11-20.
- Simko M & Mattsson MO (2010) Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Part Fibre Toxicol* 7:42.
- Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM & Artis D (2013) Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 132(4):789-801; quiz 788.
- Solaroglu I, Jadhav V & Zhang JH (2007) Neuroprotective effect of granulocyte-colony stimulating factor. *Front Biosci* 12:712-724.
- Song Z, Kelf TA, Sanchez WH, Roberts MS, Ricka J, Frenz M & Zvyagin AV (2011) Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport. *Biomed Opt Express* 2(12):3321-3333.
- Speranza A, Leopold K, Maier M, Taddei AR & Scoccianti V (2010) Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd(II). *Environ Pollut* 158(3):873-882.
- Sprent J (2001) Burnet oration. T-cell survival and the role of cytokines. *Immunol Cell Biol* 79(3):199-206.
- Sriramarao P, DiScipio RG, Cobb RR, Cybulsky M, Stachnick G, Castaneda D, Elices M & Broide DH (2000) VCAM-1 is more effective than MAdCAM-1 in supporting eosinophil rolling under conditions of shear flow. *Blood* 95(2):592-601.
- Sriramarao P, Norton CR, Borgstrom P, DiScipio RG, Wolitzky BA & Broide DH (1996) E-selectin preferentially supports neutrophil but not eosinophil rolling under conditions of flow in vitro and in vivo. *J Immunol* 157(10):4672-4680.
- Steinman RM & Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449(7161):419-426.
- Sugiyama T & Nagasawa T (2012) Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 11(3):201-206.
- Sung KL, Li Y, Elices M, Gang J, Sriramarao P & Broide DH (1997) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates the functional adhesive state of very late antigen-4 expressed by eosinophils. *J Immunol* 158(2):919-927.
- Taghavi SM, Momenpour M, Azarian M, Ahmadian M, Souri F, Taghavi SA, Sadeghain M & Karchani M (2013) Effects of Nanoparticles on the Environment and Outdoor Workplaces. *Electron Physician* 5(4):706-712.
- Taub DD (2008) Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunol* 252(1-2):1-6.
- Teow Y, Asharani PV, Hande MP & Valiyaveetil S (2011) Health impact and safety of engineered nanomaterials. *Chem Commun (Camb)* 47(25):7025-7038.
- Tosi MF, Stark JM, Smith CW, Hamedani A, Gruenert DC & Infeld MD (1992) Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(2):214-221.
- Valent P, Gleich GJ, Reiter A, Roufosse F, Weller PF, Hellmann A, Metzgeroth G, Leiferman KM, Arock M, Sotlar K, Butterfield JH, Cerny-Reiterer S, Mayerhofer M, Vandenberghe P, Haferlach T, Bochner BS, Gotlib J, Horny HP, Simon HU & Klion AD (2012) Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol* 5(2):157-176.
- Vallieres F, Simard JC, Noel C, Murphy-Marion M, Lavastre V & Girard D (2016) Activation of human AML14.3D10 eosinophils by nanoparticles: Modulatory activity on apoptosis and cytokine production. *J Immunotoxicol* 13(6):817-826.
- van Furth R & Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128(3):415-435.
- Verma A & Stellacci F (2010) Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6(1):12-21.

- Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z & Chen C (2008) Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 254(1-2):82-90.
- Ward JE & Kach DJ (2009) Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar Environ Res* 68(3):137-142.
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S & Sayes CM (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230(1):90-104.
- Warringa RA, Koenderman L, Kok PT, Kreukniet J & Bruijnzeel PL (1991) Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* 77(12):2694-2700.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K & von Goetz N (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 46(4):2242-2250.
- Wilkinson KE, Palmberg L, Witasp E, Kupczyk M, Feliu N, Gerde P, Seisenbaeva GA, Fadeel B, Dahlen SE & Kessler VG (2011) Solution-engineered palladium nanoparticles: model for health effect studies of automotive particulate pollution. *ACS Nano* 5(7):5312-5324.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, Madler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI & Nel AE (2008) Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2(10):2121-2134.
- Yagisawa M, Yuo A, Yonemaru M, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yazaki Y & Takaku F (1996) Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 228(2):510-516.
- Yamamoto H, Sedgwick JB & Busse WW (1998) Differential regulation of eosinophil adhesion and transmigration by pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* 161(2):971-977.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E & Jung S (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38(1):79-91.
- Yoshihisa Y, Honda A, Zhao QL, Makino T, Abe R, Matsui K, Shimizu H, Miyamoto Y, Kondo T & Shimizu T (2010) Protective effects of platinum nanoparticles against UV-light-induced epidermal inflammation. *Exp Dermatol* 19(11):1000-1006.
- Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y & Orkin SH (2002) Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* 195(11):1387-1395.
- Yuen MF & Norris S (2001) Expression of inhibitory receptors in natural killer (CD3(-)CD56(+)) cells and CD3(+)CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Immunol* 101(3):264-269.
- Zhang CC & Lodish HF (2008) Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* 15(4):307-311.
- Zhang H, Gilbert B, Huang F & Banfield JF (2003) Water-driven structure transformation in nanoparticles at room temperature. *Nature* 424(6952):1025-1029.
- Zhu J, Yamane H & Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489.
- Zhu X, Jacobs B, Boetticher E, Myou S, Meliton A, Sano H, Lambertino AT, Munoz NM & Leff AR (2002) IL-5-induced integrin adhesion of human eosinophils caused by ERK1/2-mediated activation of cPLA2. *J Leukoc Biol* 72(5):1046-1053.
- Zurier RB, Hoffstein S & Weissmann G (1973) Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. I. Effect of cyclic nucleotides and colchicine. *J Cell Biol* 58(1):27-41.

ANNEXE

Dans ce mémoire, nous avons principalement discuté de la fonction d'adhérence cellulaire de l'éosinophile humain avec les différentes NPs. Sachant aussi que peu d'information son connue des effets des NPs sur les éosinophiles humains et leurs différentes fonctions, il me semblait intéressant d'ajouter le rapport IRSST que nous avons réalisé et récemment publier sur l'activation des éosinophiles humains par des NPs. Cela vous donnera une meilleure idée des effets que peuvent avoir les NPs sur les différentes fonctions des éosinophiles humains.

1. Rapport IRSST

Activation des éosinophiles humains par des nanoparticules

Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier

Maxime Marion-Murphy, INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Nous désirons remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'avancement de cette étude, particulièrement les étudiants gradués dont leur projet de recherche en nanotoxicologie portait entièrement ou partiellement sur l'effet des nanoparticules sur la biologie des éosinophiles humains. Nous exprimons donc notre gratitude envers les étudiants au second cycle, Luis Rafael Silva et Yannick Samson.

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

SOMMAIRE

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

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

En utilisant une approche expérimentale, il a été possible de dresser un tableau démontrant les effets différentiels des NP sur la biologie des ÉO humains. Ainsi, par exemple, les NP de dioxyde de cérium (CeO₂) sont celles qui induisent le plus fortement la production de ROS alors

qu'elles ne modulent pas l'apoptose. Ajoutons que les NP de dioxyde de titane (TiO₂) sont celles qui augmentent le plus la capacité des ÉO à adhérer à un substrat cellulaire alors qu'elles n'ont pas ou peu d'effets sur la production de ROS et l'apoptose.

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

Les retombées de ce projet effectué avec des cellules isolées d'individus sains sont multiples. Les résultats permettront, par la suite, de justifier l'utilisation de cellules de travailleurs potentiellement exposés aux NP, incluant les chercheurs, les étudiants et le personnel technique, afin d'étudier les fonctions des ÉO qui pourraient avoir des réponses fonctionnelles disproportionnées ou, à l'inverse, très faibles. Les résultats et les observations de cette étude, combinés à ceux qui seront décrits par d'autres équipes étudiant différentes facettes de la toxicité des NP, permettront d'aider à la prise de certaines décisions sur le plan de la gestion des risques reliés à une exposition des travailleurs aux NP.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	XI
1.INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique	1
1.2 État des connaissances.....	2
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	5
2.1 Hypothèse.....	5
2.2 Objectifs	5
3. MÉTHODOLOGIE	7
3.1 Choix des nanoparticules	7
3.2 Isolement des cellules.....	8
3.3 Traitement des cellules	8
3.4 Vérification de l'interférence des NP dans les diverses techniques employées	8
3.5 Localisation des NP dans les cellules par cytométrie en flux et microscopie électronique à transmission.....	9
3.6 Fonctions étudiées	9
3.6.1 Production des dérivés réactifs de l'oxygène	9
3.6.2 Migration/chimiotactisme	10
3.6.3 Adhésion sur un substrat cellulaire	10
3.6.4 Apoptose	10
3.6.5 Production d'analytes (cytokines et chimiokines)	10
3.7 Analyse statistique	11

4. RÉSULTATS.....	13
4.1 Viabilité cellulaire	13
4.2 Localisation des NP dans les cellules ÉO.....	14
4.3 Altération des fonctions des ÉO.....	16
4.4 Production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)	18
4.5 Effet des NP sur le chimiotactisme des ÉO.....	20
4.6 Capacité des NP à induire l'adhésion des ÉO	21
4.7 Modulation de l'apoptose par les NP.	22
4.8 Production d'analytes par les ÉO en réponse aux NP	24
5. DISCUSSION.....	27
6. CONCLUSION	29
7. BIBLIOGRAPHIE	31

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Nanoparticules étudiées dans ce projet.....	7
Tableau 2	Caractérisation de différentes nanoparticules utilisées dans cette étude.....	13
Tableau 3	Synthèse des résultats portant sur les effets différentiels des NP sur la biologie des éosinophiles humains	16

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium sur la viabilité cellulaire des éosinophiles humains.....	14
Figure 2	Ingestion des NP chez les éosinophiles humains déterminée par cytométrie en flux.....	15
Figure 3	Absence de NP à l'intérieur des éosinophiles humains par microscopie électronique à transmission	15
Figure 4	Effet de certaines nanoparticules sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....	19
Figure 5.	Production de superoxyde (O_2^-) en réponse à certaines nanoparticules.....	20
Figure 6	Effet de certaines nanoparticules sur le chimiotactisme.....	20
Figure 7	Capacité de certaines nanoparticules à augmenter l'adhésion des éosinophiles sur les cellules EA.hy926.....	22
Figure 8	Modulation de l'apoptose des éosinophiles humains par les NP.....	23
Figure 9	Détermination de l'effet anti-apoptotique des nanoparticules de ZnO par cytologie et par cytométrie en flux.....	24
Figure 10	Criblage de la production de cytokines par les éosinophiles en réponse aux nanoparticules.....	25
Figure 11	Quantification de la production des cytokines IL-8, RANTES et IL-1β par les éosinophiles humains en réponse à certaines nanoparticules.....	26

LISTE DES ACRONYMES, SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

Ag: Argent

Al₂O₃: Alumine ou oxyde d'aluminium

Au: Or

CeO₂: Dioxyde de cérium

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

Dendrimère G0-3: Dendrimère de génération 0 à 3

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

ÉO: .éosinophile

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

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HBSS: Hank's balanced salt solution

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

INRS: Institut national de recherche scientifique

LPS: Lipopolysaccharide

MPOC: Maladie pulmonaire obstructive chronique

MFI : «Mean fluorescence intensity»

NP: Nanoparticule

NPx: Nanoparticule ayant un diamètre x (nm)

PBS: Phosphate buffered saline

PMA: Phorbol myristate acetate

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

ROS: Reactive oxygen species pour dérivés réactifs de l'oxygène

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TiO₂: Dioxyde de titane

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

VAA-I: Viscum album agglutinine-I

ZnO: Oxyde de zinc

1. INTRODUCTION 1.1 Problématique

Les nanotechnologies bouleversent de plus en plus notre quotidien. En effet, l'utilisation croissante des nanomatériaux dans le secteur industriel et en médecine ne fait qu'augmenter l'exposition potentielle aux NPs non seulement chez un bon nombre de travailleurs, mais également dans la population en générale. Étant donné que leurs développements représentent un potentiel économique indéniable pour les pays industrialisés, incluant le Canada, l'engouement à développer de nouveaux procédés par des moyens nano-technologiques dans divers secteurs ne fera qu'amplifier l'implantation d'entreprises de production de NP au pays. De plus, il est fort à parier que plusieurs compagnies achèteront des NP afin de les introduire dans leurs lignes de production sans nécessairement connaître exactement les risques que cela puisse représenter pour leurs employés. Mises ensemble, ces observations ne feront qu'augmenter le potentiel d'exposition aux NP chez les travailleurs.

Le Québec ne fait pas exception et bien qu'un nombre restreint d'entreprises de production de NP soit implanté, il est plausible d'imaginer que ce nombre augmentera dans les années à venir. Il devient donc d'une extrême importance de prévenir des accidents et/ou développements de maladies liés aux NP qui, dans bien des cas, possèdent à la base une composante inflammatoire. En effet, bien que les dangers potentiels d'une exposition aux NP puissent résulter en des effets cytotoxiques, génotoxiques, et même des cancers, les maladies inflammatoires sont les plus probables sachant que le système respiratoire représente une cible importante d'exposition aux NP chez des travailleurs exposés. De plus, il est hautement probable que les NP constituent un facteur dans l'environnement de travail, aggravant certaines maladies pulmonaires déjà existantes comme l'asthme. Il n'est donc pas étonnant que des données scientifiques s'accumulent et démontrent des effets toxiques de certaines NP dont nous connaissons mal la toxicité et le mode d'action ainsi que l'efficacité des moyens pour les contenir¹⁻⁴. De fait, une bonne partie des études rapportées dans la littérature scientifique traitent du rôle potentiel des NP en relation avec des désordres/maladies inflammatoires pulmonaires, incluant les MPOC, l'asthme, et la fibrose kystique^{5,6}. Par exemple, il a été démontré que des NP de dioxyde de titane (TiO₂) induisent des symptômes de l'emphysème et qu'elles stimulent directement la sécrétion de mucine (protéine entrant dans la composition de mucus) par des cellules bronchiales⁷. Également, il a été démontré que des NP comme les oxydes de zinc (ZnO) et de cuivre⁸ induisent un recrutement d'ÉO au niveau des poumons chez les rongeurs⁹. Une autre étude démontre que le TiO₂ et des NP d'or aggravent l'inflammation pulmonaire dans un modèle d'asthme induit par les isothiocyanates chez la

souris¹⁰. Paradoxalement, certaines études, toutefois en nombre plus restreint, proposent des effets plutôt bénéfiques en diminuant les symptômes de l'asthme allergique dans un modèle murin, tel que rapporté pour le TiO₂¹¹. Ceci témoigne donc de la grande complexité à laquelle nous sommes confrontés pour étudier et déterminer la toxicité des NP. Le présent projet est axé sur l'étude des interactions entre les NP et les ÉO humains, des cellules grandement impliquées dans l'asthme et autres désordres pulmonaires¹²⁻¹⁵. Il serait important de connaître davantage la toxicité de certaines NP chez des cellules humaines primaires les mieux connues pour exercer un rôle pathogénique dans le développement ou exacerbation de l'asthme ou autres désordres inflammatoires pulmonaires. Ces connaissances nous permettraient de dresser une liste des NP en fonction de leur potentiel à activer ou non les fonctions cellulaires des ÉO qui pourraient être d'une utilité dans plusieurs secteurs, incluant l'évaluation de risque pour la santé des travailleurs exposés aux NP.

1.2 État des connaissances

Les ÉO sont des cellules bien connues pour leur rôle important de défense de l'organisme contre les helminthes (vers parasites). Cependant, des données plus récentes indiquent que ces cellules sont extrêmement importantes dans la régulation de l'inflammation, principalement dû au fait que les ÉO ont la capacité d'emmagasiner de puissants modulateurs inflammatoires préformés, comme certaines cytokines et facteurs chimioattractants (chimiokines), disponibles pour une libération extrêmement rapide pouvant agir sur différentes cellules^{12,13,16,17}. Chez l'animal, un nombre plus élevé d'ÉO a été observé dans les poumons à la suite de traitements avec différentes NP d'oxyde de cuivre et d'oxyde de zinc⁹. Dans cette dernière étude, un fait très intéressant a été observé; les NP de zinc et cuivre, mais pas les ions, ont induit une infiltration éosinophilique dans les poumons. Une étude récente démontre également qu'une administration intratrachéale de NP d'oxyde de nickel chez des rats provoque une arrivée massive d'ÉO observée dans les lavages broncho-alvéolaires associée à une production d'éotaxine, une chimiokine jouant un rôle de tout premier plan dans l'inflammation allergique¹⁸. L'équipe de Gustafsson et coll. (2011), a étudié les effets inflammatoires de NP de TiO₂ administrées de façon intratrachéale chez le rat sur une période allant jusqu'à 90 jours¹⁹. Les auteurs rapportent une présence accrue de diverses cytokines, incluant IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF et la chimiokine CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) dans les voies respiratoires au jour 1 et 2 suivant l'instillation des NP, qui était accompagnée d'un influx d'ÉO et de neutrophiles. Alors que le nombre de neutrophiles demeurait élevé jusqu'au jour 30 post-instillation, celui des ÉO revenait au niveau de base après 8 jours. À l'inverse, une étude a

démontré qu'une administration sous-cutanée de NP de type fullerène (nC60) dans un modèle d'inflammation de la peau par traitement à l'ovalbumine causait plutôt un effet anti-inflammatoire incluant une diminution du nombre de ÉO dans les échantillons de peau²⁰. Il devient intéressant de constater, par ces observations, que les réponses aux NP sont complexes et que le dénombrement des ÉO est couramment utilisé comme marqueur de l'inflammation. Toutefois, nos connaissances concernant les effets directs des NP sur les ÉO sont peu ou pas complètes et se limitent principalement aux types d'observation mentionnées ci-dessus. Ces dernières ne nous informent nullement sur les effets potentiels des NP sur la biologie des ÉO.

Chez certains travailleurs développant des symptômes allergiques, il est bien documenté que le retrait ou relocalisation de leur milieu de travail résulte bien souvent en une diminution et/ou disparition desdits symptômes. Plus précisément pour les ÉO, une étude récente de suivi, effectuée avec des individus souffrant d'asthme occupationnel ou professionnel, démontre une baisse rapide de l'inflammation après le retrait de l'exposition²¹. Bien que dans ce cas les individus ne semblent pas être exposés à des NP, l'engouement que représentent les nanotechnologies et l'utilisation grandissante des NP, il est fort probable que, dans un avenir rapproché, les mêmes observations soient rapportées dans la littérature chez des travailleurs exposés aux NP. Pour l'instant, ceci demeure encore purement spéculatif. Toutefois, au moins deux études rapportent des troubles inflammatoires observés chez un travailleur exposé à des NP de nickel²² et un autre exposé plutôt à des NP de carbone²³. Dans la première étude, un homme âgé de 38 ans, sans historique de maladies, a inhalé les NP de nickel durant son travail alors qu'il en aspergeait des pièces composantes une turbine; il est décédé 13 jours après cette exposition. La conclusion de l'autopsie a révélé que la cause du décès était le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, et des NP de nickel dont le diamètre était en deçà de 25 nm ont été observées par microscopie électronique à transmission dans les macrophages alvéolaires de l'individu. Alors que les taux normaux de nickel dans les urines sont de l'ordre 0.25-5.0 µg/L, ceux mesurés chez le travailleur exposé étaient de 780 µg/L²². De plus, ses reins présentaient des évidences de nécrose tubulaire aiguë. Dans l'autre étude, une employée de bureau présentait une perte de poids et des diarrhées sévères. Bien qu'une endométriose fût suspectée, les résultats de laparoscopie révélaient la présence de nombreux points noirs au niveau du péritoine. Des agrégats de NP de carbone ayant un diamètre de 31-67 nm furent observés dans ses tissus par microscopie électronique à balayage et à transmission. Des biopsies du colon témoignaient d'une maladie inflammatoire de l'intestin avec des signes de la maladie de Crohn, mais sans dépôt des NP. Bien qu'aucun trouble respiratoire n'ait été rapporté

par cette employée, il a été conclu que les NP de carbone, utilisées dans les cartouches d'encre d'imprimante au laser, ont été véhiculées par les vaisseaux sanguins suite à l'inhalation des poussières par les poumons. Bien que dans ces deux études des individus présentent des troubles inflammatoires associés à une exposition à des NP, aucune allusion aux ÉO n'a été faite. Toutefois, ensemble, ces deux études supportent le scénario probable que les expositions potentielles grandissantes des travailleurs aux NP, prévues dans le futur, pourront générer plusieurs problèmes inflammatoires, incluant une participation des ÉO.

Curieusement, bien que les ÉO sont des cellules importantes dans l'asthme et autres désordres pulmonaires, ainsi que des cancers²⁴ et maladies inflammatoires de l'intestin¹⁶, il existe une carence majeure dans la littérature quant aux interactions entre les ÉO humains et les NP. En fait, nos connaissances quant au mode d'action des NP sont quasi inexistantes. Pourtant, le modèle le plus accepté présentement pour l'initiation de mécanismes pathogéniques induits par les NP est clairement celui des effets engendrés par l'inflammation, faisant de cette dernière la cible parfaite pour évaluer la toxicité des NP^{25,26}. Actuellement, la majorité des études *in vitro* effectuées en laboratoire consistent en l'incubation de cellules de lignées immortalisées d'origine animale (la majeure partie) ou humaine. Très peu d'études ont eu recours à des cellules humaines primaires et aucune étude approfondie ne traite de l'effet des NP sur les ÉO humains. Toutefois, des résultats obtenus principalement par notre équipe avec des neutrophiles humains, cellules importantes en inflammation, indiquent clairement que ces dernières représentent une cible importante pour les NP²⁷⁻³⁷.

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

2.1 Hypothèse

Dans un projet de recherche précédent, subventionné par l'IRSST³⁸, il a été démontré que les neutrophiles humains peuvent répondre différemment à certaines NP, témoignant d'une certaine sélectivité initiée par l'interaction NP-neutrophiles. Partant de ce fait, l'hypothèse voulant que les ÉO humains soient susceptibles de répondre différemment à certaines NP a été émise.

2.2 Objectifs

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

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

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Choix des nanoparticules

Nous avons présentement plusieurs types de NP à notre disponibilité dans le laboratoire. Pour le présent projet, le choix des NP présentées dans le **Tableau 1** s'est principalement basé sur plusieurs travaux antérieurs^{27-34,39-41} et sur le fait qu'elles sont parmi les NP les plus étudiées en nanotoxicologie. De plus, ces NP sont parmi celles dont les travailleurs de plusieurs secteurs risquent d'être exposés, ici ou ailleurs dans le monde. Finalement, notons que ces NP sont largement utilisées en industrie et se retrouvent dans plusieurs produits faisant partie de notre quotidien. Bien que le présent rapport soit axé sur les résultats de nos premières études concernant les propriétés pro-inflammatoires des NP les plus susceptibles d'être utilisées au Québec, nous avons étudié en parallèle des NP connues également pour être largement employées au niveau mondial, comme le dioxyde de titane (TiO₂) et divers NP d'argent^{28,32,42}. Malgré le fait que plusieurs de ces substances aient déjà fait l'objet d'études portant sur leurs différents effets sur la santé^{6,43,44}, leurs mécanismes d'action et leurs effets sur la biologie des ÉO humains sont encore largement inconnus.

Tableau 1. Nanoparticules étudiées dans ce projet

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

*chargé positivement ou négativement

Au préalable, chacune des NP en suspension dans l'eau ultra-pure, à une concentration de 50 µg/mL, a été caractérisée par diffusion dynamique de la lumière à l'aide d'un appareil de type Nanosizer (Malvern). Ceci permet d'obtenir la distribution de la taille, le potentiel zêta ainsi que l'index de polydispersité. Il est à noter que toutes les expériences effectuées pour étudier les fonctions rapportées dans le **Tableau 3** ont été faites en traitant les ÉO à cette concentration de 50 µg/mL.

3.2 Isolement des cellules

Pour cette étude, les ÉO ont été fraîchement isolés à partir du sang d'individus sains faisant partie d'une banque de donneurs consentants, que nous utilisons depuis plusieurs années. Les prises de sang ont été effectuées par une infirmière au bureau de santé localisé dans notre centre de recherche. Suite à l'isolation des granulocytes (fraction contenant principalement des neutrophiles + ÉO), nous avons évalué la pureté des cellules, chez un donneur donné, par cytologie, suite à une coloration. En général, nous observons la présence d'ÉO variant grossièrement entre 0-10%, le reste étant des neutrophiles. Lorsque la présence d'au moins 2%

d'ÉO a été observée, la suspension cellulaire a été reprise. Elle a été traitée pour purifier les ÉO et éliminer les neutrophiles par la technique de séparation négative, à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques, une technique régulièrement utilisée dans le laboratoire⁴⁵.

3.3 Traitement des cellules

Les ÉO ont été traités in vitro avec des concentrations croissantes d'une NP donnée (en général 0-500 µg/ml), pour différentes périodes de temps allant de 0-120 min pour les fonctions de production de radicaux libres, chimiotactisme et adhésion (voir plus bas), ou pendant 24h pour les fonctions d'apoptose et production de cytokines. En tout temps, des témoins négatifs (milieu de culture dans lequel les NP sont en suspension) et positifs ont été utilisés, incluant le phorbol-12-myristate-13-acétate ou PMA (radicaux libres); les cytokines IL-5 (chimiotactisme), GM-CSF et TNF- α (adhésion) et la lectine de plante *Viscum album* agglutinine-I ou VAA-I (apoptose). Les effets des NP sur la viabilité cellulaire ont été vérifiés par la technique d'exclusion au bleu de trypan).

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

Certaines NP ont la capacité d'interférer avec des techniques utilisées en toxicologie permettant de mesurer différentes fonctions cellulaires^{46,47}. Par exemple, certaines techniques requièrent l'utilisation de fluorochromes pour obtenir des mesures d'intensité de fluorescence permettant d'évaluer une fonction cellulaire donnée. Dans la présente étude, pour chacune des NP étudiées ici, il a été vérifié qu'en aucun cas ces dernières n'interféraient avec les intensités des signaux obtenus par les différentes techniques utilisées (voir section 3.6). Pour ce faire, au préalable, certaines mesures/lectures ont été effectuées dans des conditions expérimentales ne contenant que les suspensions des différentes NP étudiées en absence de cellules. En aucun cas, une telle interférence a été notée, pouvant diminuer ou augmenter l'intensité des signaux mesurés en laboratoire.

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

La capacité des NP à pénétrer à l'intérieur des ÉO a été déterminée par cytométrie en flux. En effet, cette technologie peut être utilisée pour déterminer si un type de NP pénètre à l'intérieur des cellules en évaluant les niveaux de fluorescence d'un paramètre, la granularité/complexité

(SSC pour 'side scatter'); plus la fluorescence est élevée plus la complexité des cellules est grande⁴⁸. Toutefois, cette méthode doit être utilisée principalement pour les premiers moments de contact entre les NP et les cellules, c.-à-d. dans les premières 30-60 minutes. Par la suite, les résultats peuvent devenir difficiles à interpréter générant des 'faux positifs'. Pour ce faire, les ÉO ont été incubés pendant 1-60 minutes avec 100 µg/ml d'une NP donnée. Au moment désiré, les tubes contenant les cellules et les NP ont été plongés dans la glace pour ensuite être centrifugés. Les surnageants ont été éliminés puis les culots ont été défaits et mis en suspension avec du tampon PBS frais. Cette opération a été répétée trois fois afin d'éliminer les NP libres. À la fin, l'intensité de la fluorescence des cellules (paramètre ssc) a été déterminée à l'aide d'un cytomètre en flux (BD FACSCalibur™).

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

3.6 Fonctions étudiées

Étant donné que, dans son ensemble, la présente étude portant sur les interactions ÉO-NP représente un créneau de recherche pouvant s'échelonner sur plusieurs années, les résultats présentés dans ce rapport découlent des recherches effectuées sur les fonctions suivantes.

3.6.1 Production des dérivés réactifs de l'oxygène

La production des dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais «reactive oxygen species, ROS») peut être mesurée par différentes techniques. Dans le cas présent, nous avons mesuré la production de radicaux libres totaux intracellulaire par cytométrie en flux à l'aide de la sonde CM-H₂DCFDA, comme nous l'avons préalablement détaillé²⁹, et la production spécifique du superoxyde (O₂⁻) extracellulaire par la technique de réduction du ferrocyclochrome c, mesurée

par spectrophotométrie⁴⁹. Pour ce faire, les ÉO (5×10^5 cellules/mL) en solution dans du HBSS supplémenté avec du CaCl_2 (1,6 mM), contenant ou non la superoxyde dismutase (10 $\mu\text{g/mL}$) et du ferrocyclochrome *c* (130 μM), sont incubés en présence des NP indiquées (50 $\mu\text{g/mL}$) ou du PMA (0,05 μM) pendant 24h à 37°C. La réduction du cytochrome *c* a été suivie à 550 nm et la concentration d'ions superoxydes produits a été calculée en soustrayant les puits correspondants avec et sans SOD, en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 21,1.

3.6.2 Migration/chimiotactisme

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

3.6.3 Adhésion sur un substrat cellulaire

Nous avons utilisé la lignée de cellules endothéliales humaines, les EA.hy926 (American Type Culture Collection American Type, ATCC) qui, contrairement à des cellules endothéliales primaires ou de type HUVEC, peuvent être utilisées pour plusieurs passages. Ces cellules ont donc été utilisées comme substrat sur lesquelles nous y avons déposé les ÉO préalablement marqués pendant 30 min avec 5 μM de calcéine-AM (Molecular Probes, Inc.) et préalablement traitées avec un témoin négatif (milieu de culture), un témoin positif (cytokine GM-CSF ou TNF- α) ou une NP donnée comme nous l'avons déjà publié⁵⁰. Par la suite, après trois lavages, les ÉO adhérents ont été dénombrés par microscopie à fluorescence.

3.6.4 Apoptose

Deux méthodes que nous utilisons de façon routinière dans le laboratoire ont été utilisées^{28,45,49}. La première, utilisée pour un premier criblage, consiste à dénombrer le nombre d'ÉO par cytologie, en microscopie optique; les cellules en apoptose sont aisément reconnaissables puisque leur noyau bilobé caractéristique change complètement de forme pour devenir pycnotique et la cellule rapetisse. La seconde technique consiste à déterminer le nombre de cellules qui sont positives à l'annexine-V couplée à un fluorochrome, l'isothiocyanate

de fluorescéine (FITC-Annexin-v) (FITC, «fluorescein isothiocyanate»), à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (BD Biosciences).

3.6.5 Production d'analytes (cytokines et chimiokines)

Les analytes présents dans les surnageants d'ÉO ayant été traités ou non avec une NP donnée ont été analysés par une approche utilisant une trousse nommée ELISArray (Multi-Analyte ELISArray Kits, Qiagen), nous permettant de détecter plusieurs analytes simultanément présents ou non dans un même échantillon. Pour les expériences de criblage, nous avons utilisé différents surnageants de donneurs que nous mixons ensemble (3-5 donneurs différents) afin de nous donner une bonne idée de la modulation ou non d'un analyte donnée (cytokine, chimiokines). Par la suite, la concentration des analytes dont la production a été plus importante est confirmée et quantifiée pour chaque donneur séparément par technique ELISA.

3.7 Analyse statistique

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

4. RÉSULTATS

4.1 Viabilité cellulaire

Après avoir caractérisé chacune des NP par diffusion dynamique de la lumière à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ (moyenne \pm SEM, $n=3$) (**Tableau 2**), des tests de viabilité cellulaire ont été effectués afin de déterminer les concentrations idéales à utiliser pour étudier les fonctions cellulaires des ÉO. Les concentrations de NP utilisées étaient normalement comprises entre 0 et 500 $\mu\text{g/mL}$. Lorsque non spécifiée, la concentration des NP utilisée dans cette étude est de 50 $\mu\text{g/ml}$, soit dans la majorité des cas. En général, moins de 10% de nécrose a été observée pour toutes les NP testées, jusqu'à des concentrations $>200 \mu\text{g/mL}$, pour une période de traitement allant jusqu'à 24h. Basé sur la littérature et pour fin de comparaison et standardisation, la majorité des tests ont été effectués avec des concentrations de 50 $\mu\text{g/mL}$, parfois en incluant en parallèle des concentrations moindres ou plus élevées. La **Figure 1** illustre des résultats typiques obtenus suite à l'évaluation de la viabilité cellulaire des ÉO traités avec des NP dioxyde de cérium selon la technique d'exclusion au bleu de trypan, où il est aisé de constater que les NP

ne sont pas très nécrotoques pour les cellules avec un pourcentage de viabilité de plus de 90%.

Tableau 2. Caractérisation des nanoparticules utilisées dans cette étude

NP	Diamètre (nm)	% de NP dans la suspension	Index de polydispersion	Potentiel zêta
Al ₂ O ₃	481,2 ± 18,4	100	0,4 ± 0,04	-17,1 ± 0,9
Au ⁺	189 ± 6,9 7,5 ± 13,0	99,3 ± 1,3 0,7 ± 1,3	0,3 ± 0,008	- 5,5 ± 0,4
Au ⁻	46,7 ± 0,02 3033 ± 2623	95,7 ± 4,1 4,3 ± 4,1	0,5 ± 3,6	-9,7 ± 2,3
Au ₇₀	132,4 ± 1,4	100	0,1 ± 0,005	-9,5 ± 0,8
CeO ₂	90,9 ± 4,6 10,8 ± 2,2	83,2 ± 4,2 16,8 ± 4,2	0,5 ± 0,003	-15,9 ± 2,1
Fe ₃ O ₄	767,3 ± 169 11,2 ± 16,7 3416 ± 2990	71,6 ± 5,5 26,4 ± 4,3 2 ± 2,6	0,9 ± 0,2	-17,7 ± 0,9
Pd	277,6 ± 7,8 32,0 ± 7,0 7,7 ± 1,1	83,5 ± 2,1 12,4 ± 1,3 4,1 ± 1,1	0,6 ± 0,04	-8,4 ± 0,2
Pt	34,0 ± 2,0 1289 ± 2232	99,3 ± 1,2 0,7 ± 1,2	0,4 ± 0,004	-8,8 ± 1,3
TiO ₂	77,7 ± 20,9 8,0 ± 10,4	90,4 ± 2,8 9,7 ± 7,4	0,3 ± 0,1	-11,1 ± 0,4
ZnO	70,4 ± 3,5 11,5 ± 0,3 3054 ± 310	66,8 ± 3,6 26,0 ± 1,7 7,2 ± 2	0,5 ± 0,08	-11,3 ± 0,4

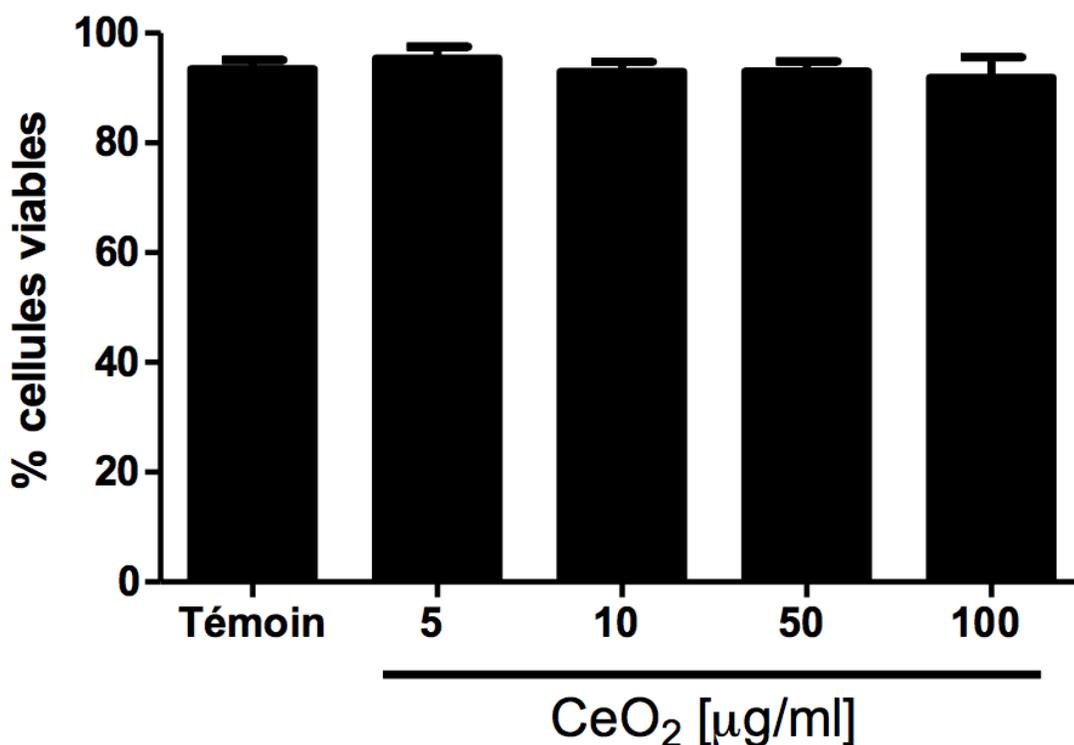


Figure 1. Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium sur la viabilité cellulaire des éosinophiles humains. Les ÉO humains ont été incubés pendant 24 heures en présence d'un milieu de culture (témoin) ou aux concentrations indiquées de CeO₂ préparées avec le même milieu de culture. La viabilité cellulaire a été déterminée par la technique d'exclusion au bleu de trypan visant à dénombrer le nombre de cellules mortes ou nécrotiques apparaissant bleues sous le microscope. Les résultats (moyenne ± SEM, n=5) sont exprimés en pourcentage de cellules viables.

4.2 Localisation des NP dans les cellules ÉO.

Nous avons utilisé la cytométrie en flux afin de cribler les NP susceptibles de pénétrer à l'intérieur des ÉO pour ensuite confirmer ou non leur présence dans les cellules par microscopie électronique. La **Figure 2** illustre le type de résultats obtenus. Selon cette technique, les NP d'argent (AgNP15, AgNP20, mais pas AgNP70) seraient à l'intérieur des ÉO. Toutefois, nous avons été dans l'incapacité d'observer ces dernières (AgNP15 et AgNP20) à l'intérieur des ÉO par microscopie électronique (**Figure 3**). Cependant, dans un projet antérieur, il avait été possible de confirmer la présence de AgNP20 à l'intérieur des neutrophiles humains³². Également, il est à noter que les présentes données obtenues par cytométrie en flux indiquent que les AgNP de plus gros diamètre, les AgNP70, ne semblent pas pénétrer à l'intérieur des

ÉO. Dans le même ordre d'idée, nous avons également rapporté, chez les neutrophiles, que ces AgNP70 avaient plutôt tendance à demeurer près de la membrane cytoplasmique sans toutefois pénétrer à l'intérieur des cellules après quelques heures d'incubation³³. Ce n'est qu'après environ 24h que nous avons été en mesure d'observer quelques AgNP70 à l'intérieur des cellules. Toutefois, plusieurs des fonctions étudiées ici nécessitent de courts temps d'incubation avec les NP. Pour conclure sur ce point, il est préférable de véhiculer l'idée qu'il n'est pas nécessaire que les NP pénètrent à l'intérieur des cellules pour induire des effets biologiques.

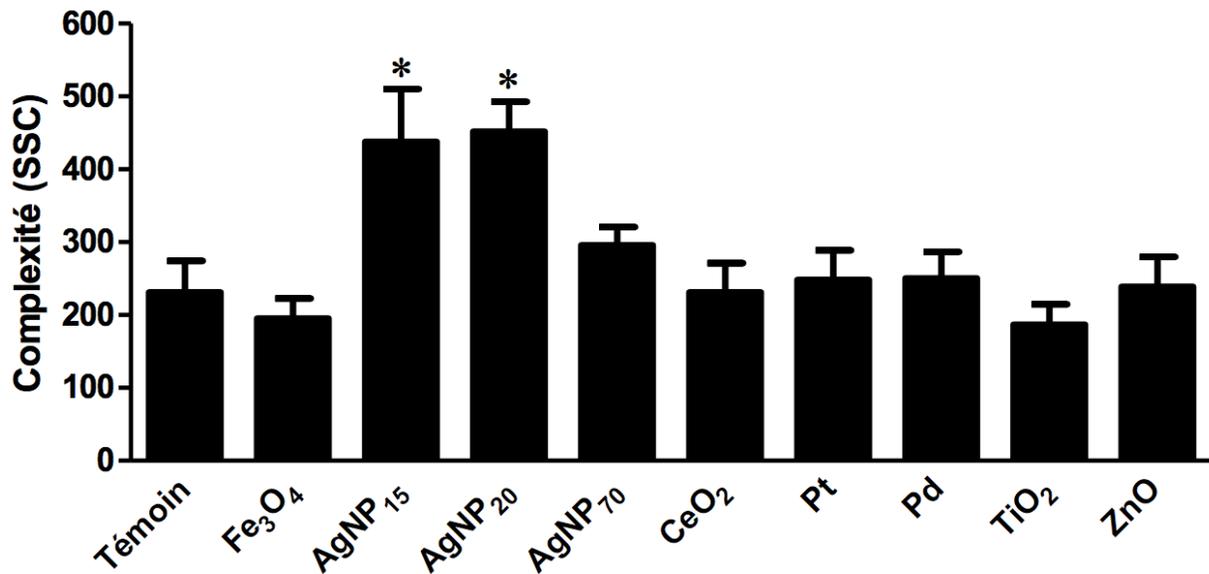


Figure 2. Ingestion des NP par les ÉO humains, déterminée par cytométrie en flux.

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

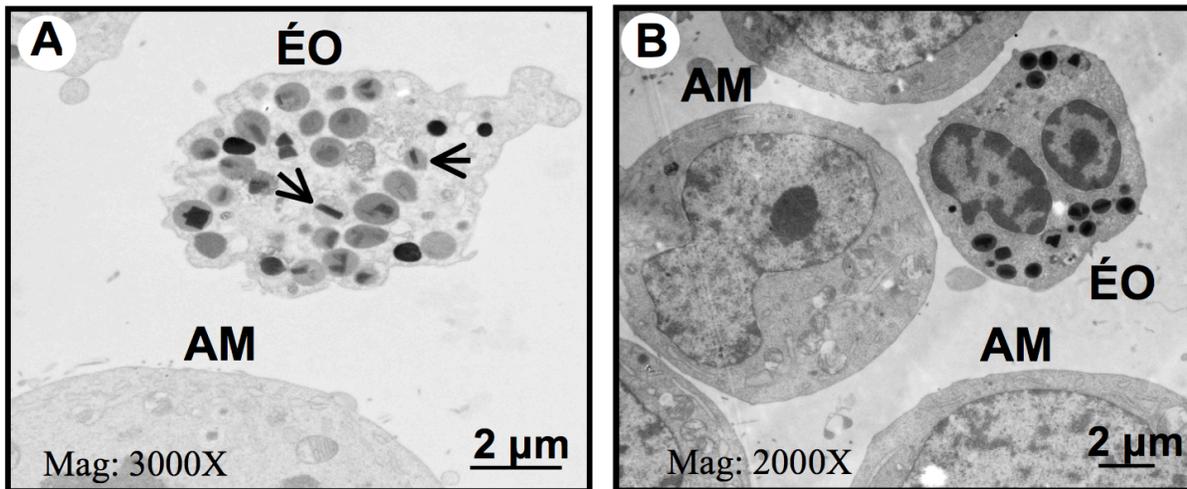


Figure 3. Absence de nanoparticules à l'intérieur des éosinophiles humains par microscopie électronique à transmission.

Les ÉO ont été incubés en présence de 50 µg/mL de AgNP (15, 20 ou 70 nm) pour une période de 2h et ont ensuite été récupérés puis lavés trois fois avant d'être mélangés avec des cellules AML14.3D10 (rapport 1:5) afin d'obtenir un meilleur support pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Cette étape était importante étant donné le nombre limité d'ÉO qu'un individu sain possède dans le sang. Le panneau A montre un ÉO plus ou moins bien conservé, mais ayant les granules caractéristiques des ÉO, alors que celui en B montre un ÉO possédant un beau noyau. Dans les deux cas, aucune nanoparticule n'est observable à l'intérieur des cellules. ÉO, éosinophiles; AML, lignée cellulaire AML14.3D10; flèches, granules caractéristiques des ÉO; Mag, grossissement («magnification»).

4.3 Altération des fonctions des ÉO

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

Tableau 3. Résultats portant sur les effets différentiels des NP sur la biologie des éosinophiles humains

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

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

NP ^a	Test effectué	Effet ^b	Commentaire
TiO ₂	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↑	
	Adhésion	↑↑↑↑	Les NP de TiO₂ sont celles qui induisent le plus l'adhésion des ÉO.
	Apoptose	Aucun	
	Cytokines	Aucun	
ZnO	ROS	Aucun	Très légère baisse lorsqu'il y a un effet
	Chimiotactisme	↓	
	Adhésion	↑	
	Apoptose	↓↓	
	Cytokines	↑↑ IL-1β et IL-8	Augmentation non significative de IL-1α et MIP-1β

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

b ↑, augmentation; ↓, diminution. Le nombre de flèches indique l'intensité de la réponse étudiée.

c Dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*)

d Les résultats des cytokines présentées ont tous été obtenus par la technique ELISA. Vert : Les effets les plus marquants sur la biologie des ÉO.

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

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

La **Figure 4** illustre le fait que peu de NP possède la capacité à augmenter la production de ROS par les ÉO. Cependant, les NP CeO₂ s'avèrent être de puissants inducteurs de cette fonction. Le mécanisme impliqué demeure toutefois encore inconnu. Il est intéressant de constater que parmi toutes les NP testées, les NP CeO₂ sont les plus puissantes pour induire la production de ROS (**Tableau 3**).

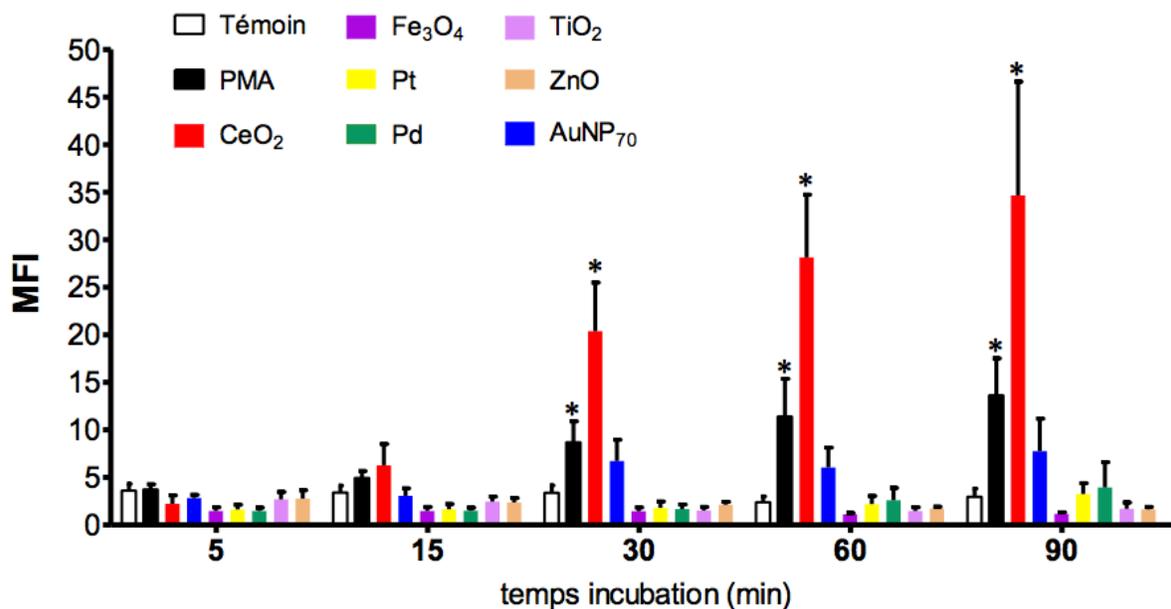


Figure 4. Effet de certaines nanoparticules sur la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

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

En plus de la production totale de ROS, la capacité des NP à augmenter spécifiquement la production d'O₂⁻ a été étudiée en parallèle. Les résultats présentés dans la **Figure 5** montrent qu'aucune NP ne possède cette capacité et même que certaines (AgNP₂₀ et Pd) diminuent les niveaux de bases observés chez les cellules témoins non traitées. Étant donné qu'aucune des NP étudiées dans cette étude ne module la production d'O₂⁻, les résultats ne sont pas inclus dans la production de ROS présentée au **Tableau 2**. Ces expériences ont leur importance. En effet, elles nous permettent de conclure que la production totale de ROS observée en réponse aux CeO₂ n'est pas liée à une production spécifique d'O₂⁻.

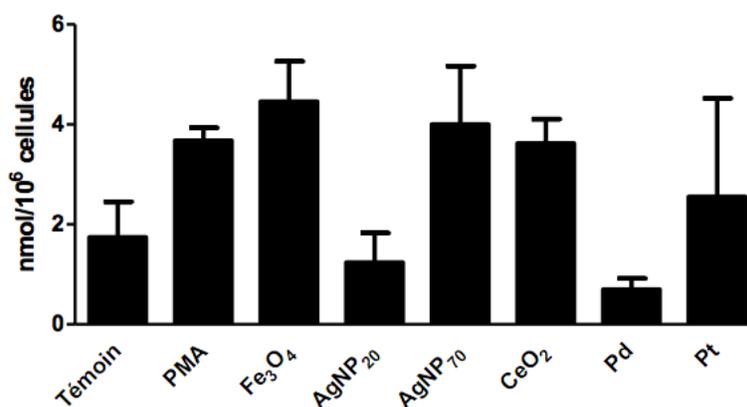


Figure 5. Production de superoxyde (O_2^-) en réponse à certaines nanoparticules.

Les ÉO (5×10^5 cellules/mL) ont été incubés en présence des NP indiquées (50 μ g/ml) ou du PMA (0,05 μ M) pendant 24h à 37°C. La production de superoxyde (O_2^-) basée sur la réduction du cytochrome c a été mesurée telle que décrite dans la section Méthodologie (section 3.6.1).

4.5 Effet des NP sur le chimiotactisme des ÉO

Contrairement à la production de ROS, plusieurs NP ont la capacité d'augmenter l'adhésion des ÉO. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 6**. Il est intéressant de constater que ce ne sont pas les NP CeO₂ qui possèdent le plus grand effet, mais plutôt celles de Pd. Ceci indique qu'il n'y a probablement aucun lien entre la capacité à induire une production de ROS et celle à augmenter l'adhésion.

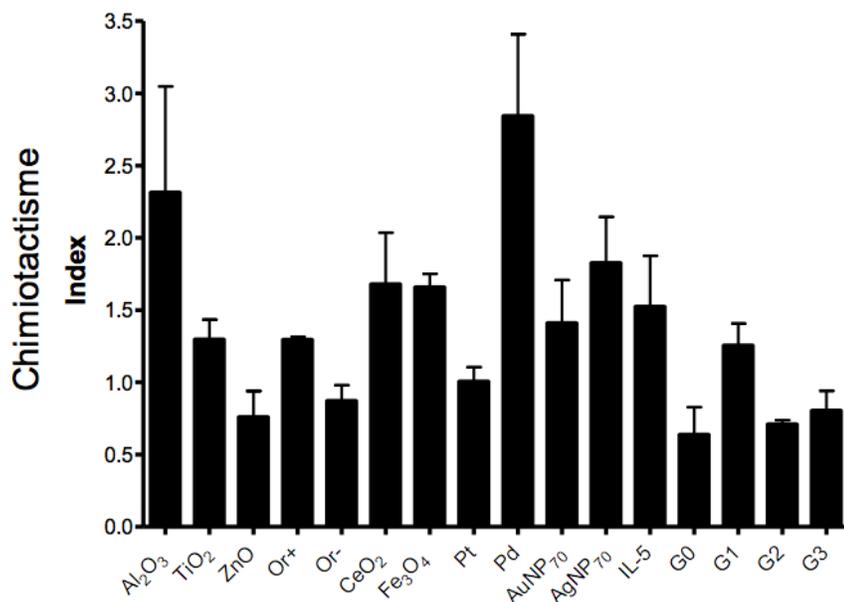


Figure 6. Effet de certaines nanoparticules sur le chimiotactisme

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

4.6 Capacité des NP à induire l'adhésion des ÉO

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

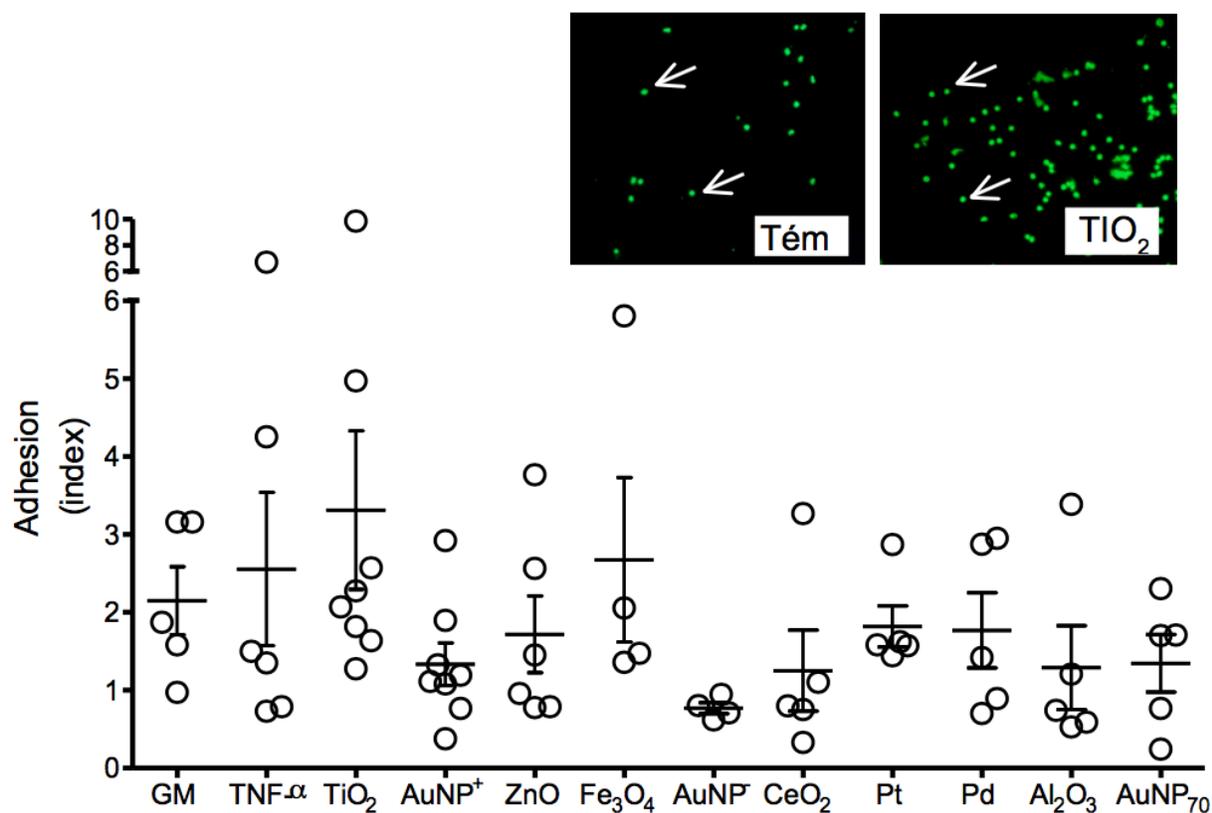


Figure 7. Capacité de certaines nanoparticules à augmenter l'adhésion des éosinophiles sur les cellules EA.hy926

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

4.7 Modulation de l'apoptose par les NP.

Comme discuté auparavant, l'apoptose peut être évaluée par différentes techniques en laboratoire. La première technique utilisée dans le passé, dans notre laboratoire, pour évaluer les effets d'un nouvel agent sur l'apoptose est basée sur des observations morphologiques en microscopie optique. Ceci est particulièrement important lorsqu'il s'agit de tester des NP pouvant

interférer avec certaines techniques comme discuté auparavant, ce qui n'est pas vraiment le cas par observations cytologiques. La **Figure 8** illustre que ce ne sont pas la majorité des NP testées qui peuvent altérer les niveaux de base de l'apoptose spontanée des ÉO humains. De plus, deux images contenues dans cette figure montrent la morphologie de cellules normales et apoptotiques, facilement distinguable l'une de l'autre. Une autre technique couramment utilisée pour étudier l'apoptose est basée sur l'utilisation de sondes/marqueurs émettant un signal de fluorescence pouvant être déterminé à l'aide d'un cytomètre en flux. Les résultats présentés dans la **Figure 9** démontrent une bonne corrélation entre ces deux techniques en ce qui concerne les effets anti-apoptotiques des NP de ZnO, lorsque testées à plusieurs concentrations.

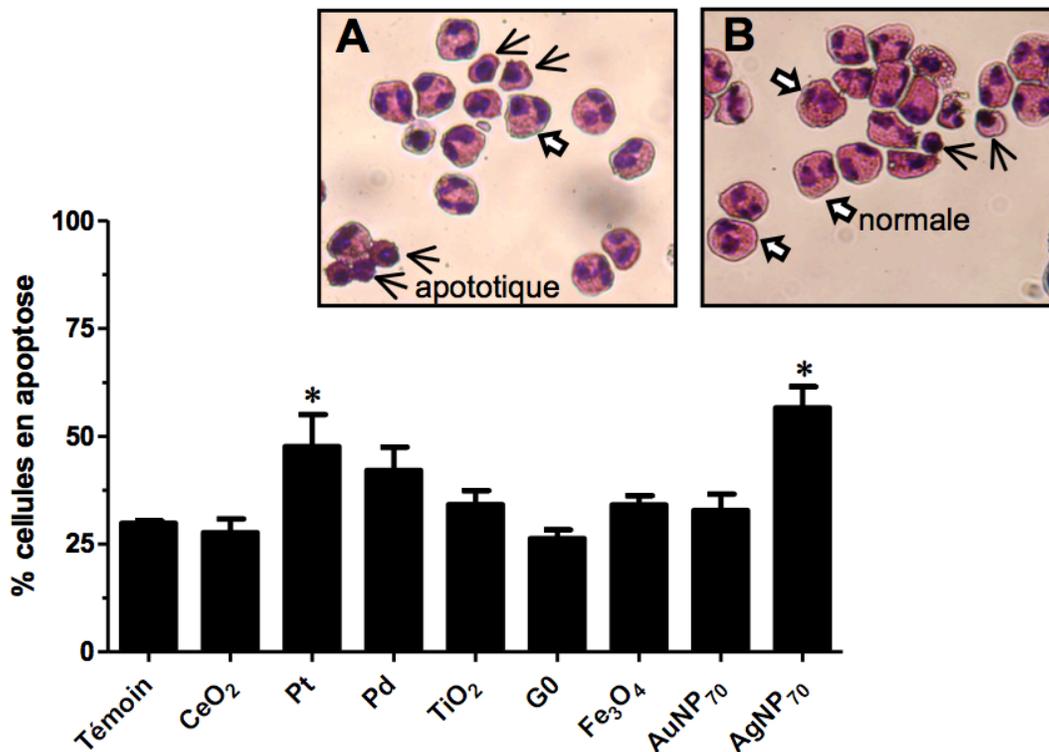


Figure 8. Modulation de l'apoptose des éosinophiles humains par les nanoparticules.

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

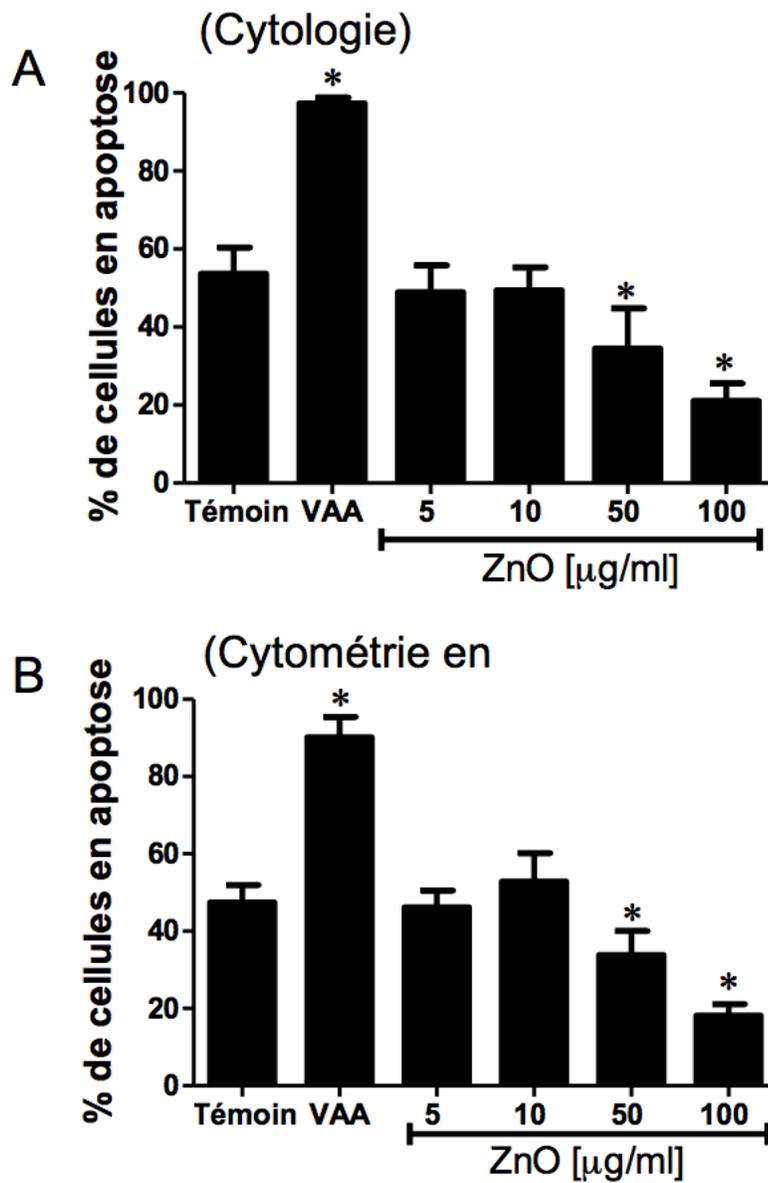


Figure 9. Détermination de l'effet anti-apoptotique des nanoparticules de ZnO par cytologie et par cytométrie en flux.

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

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

Dans la présente étude, la technique utilisée permettait de déterminer si une NP donnée pouvait augmenter la production de plusieurs analytes simultanément pour fin de criblage. Il s'agit d'une technique semi-quantitative. Les résultats présentés dans la **Figure 10** sont un exemple de l'utilisation de cette technique où il est aisé de constater que les NP agissent de façon différente témoignant de la complexité de leur mode d'action. Après criblage, la technique ELISA a été utilisée pour permettre de quantifier la concentration d'un analyte spécifique. La **Figure 11** illustre les résultats obtenus à l'aide de trousse commerciales permettant de mesurer spécifiquement les concentrations d'IL-8, RANTES et IL-1 β dans les surnageants.

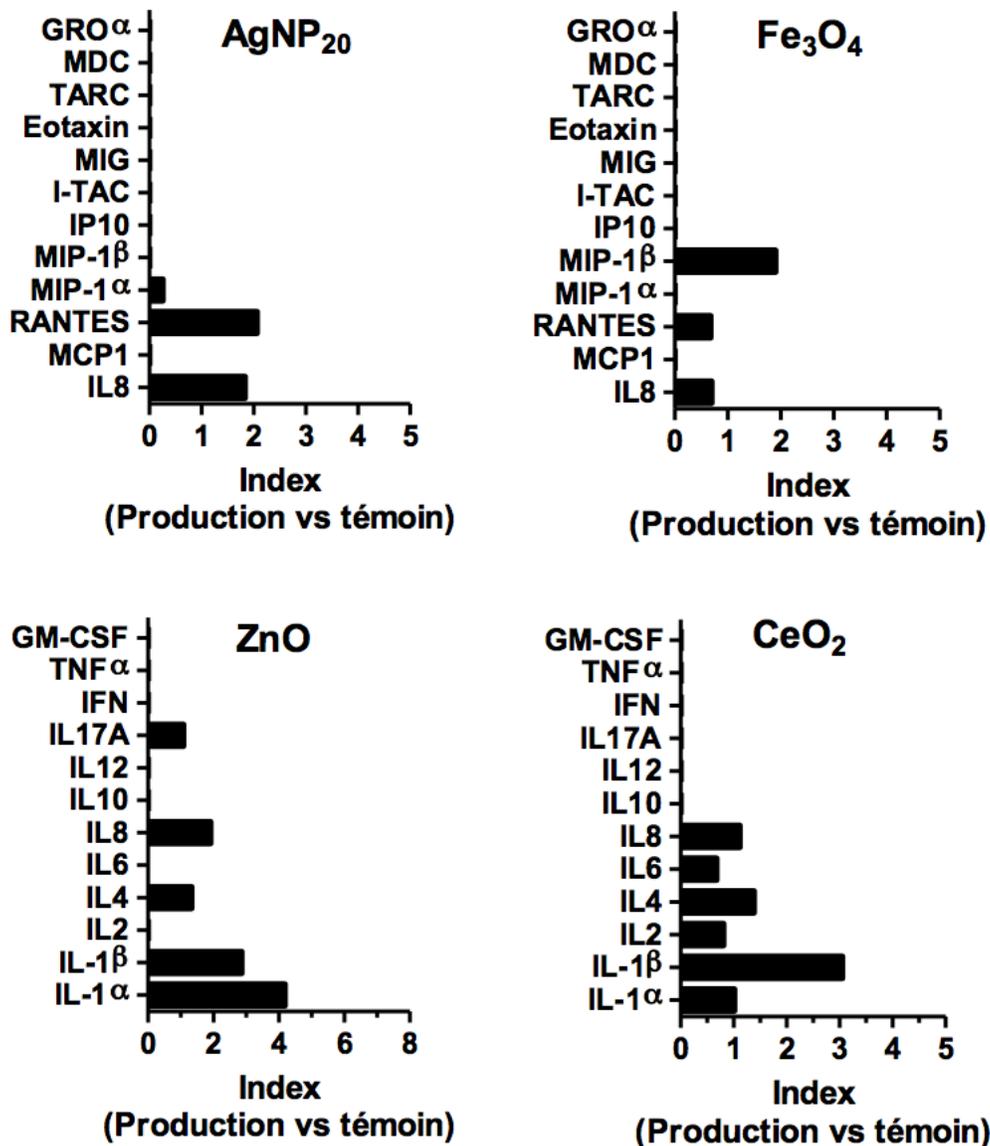


Figure 10. Criblage de la production de cytokines par les éosinophiles en réponse aux NP.

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

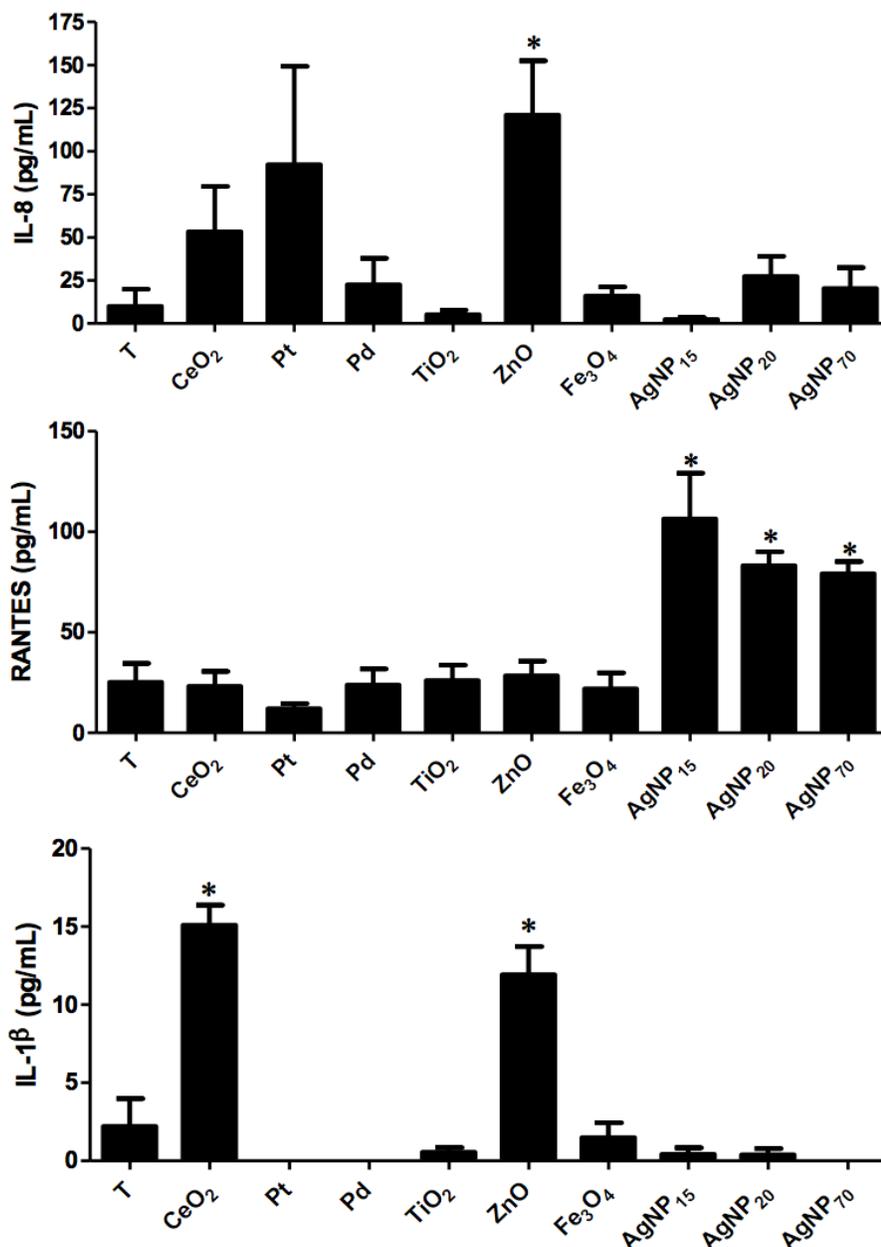


Figure 11. Quantification de la production des cytokines IL-8, RANTES et IL-1 β par les ÉO humains en réponse à certaines NP.

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

5. DISCUSSION

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux interactions directes entre différentes NP et les ÉO humains afin de mieux comprendre comment peut en être affectée leur biologie et ainsi augmenter nos connaissances dans ce domaine de recherche très peu documenté. En effet, avant d'initier ce projet, aucune donnée scientifique n'était disponible. Pourtant, la littérature scientifique comprend plusieurs études démontrant que le nombre d'ÉO augmente au niveau des poumons et dans les lavages broncho-alvéolaires chez les rongeurs suite à des expositions aux NP *in vivo*. Notons que dans ces études, les NP sont administrées par inhalation, instillation nasale ou intratrachéale, la voie respiratoire étant l'une des plus probables pour une exposition aux NP chez les travailleurs^{9,18,51-53}. En fait, le nombre d'ÉO est grandement utilisé comme marqueur d'inflammation; plus le nombre est élevé, plus l'effet inflammatoire est prononcé.

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

Les exemples de données obtenus par analyses DLS présentant les diamètres, l'index de polydispersion et les valeurs du potentiel zêta (**Tableau 2**) ne nous permettent pas de faire de corrélation entre l'un ou l'autre de ces paramètres et un effet donné d'une NP. Les expériences effectuées à l'aide de la cytométrie en flux (**Figure 2**) et par TEM (**Figure 3**) ne nous permettent pas de conclure si les NP pénètrent ou non à l'intérieur des ÉO. Toutefois, nous ne voulons pas

véhiculer l'information qu'il faut absolument que les NP soient à l'intérieur d'une cellule pour induire ou moduler une action biologique quelconque, incluant une cytotoxicité. Par contre, il est vrai qu'en médecine il devient important de savoir si les NP pénètrent ou non dans certains types cellulaires ciblés pour la livraison de drogue via les NP. Par exemple certaines cellules cancéreuses pourraient être la cible d'une drogue pouvant les tuer, cette dernière étant véhiculée par une NP donnée. Présentement, les techniques se raffinent de plus en plus pour déterminer si une NP pénètre à l'intérieur d'une cellule. Par exemple, des techniques de systèmes d'imagerie en 3D («3D Enhanced Darkfield Imaging System») par la compagnie CytoViva seraient certes d'une utilité dans ce domaine. Dans notre cas portant sur la toxicité potentielle des NP, que ces dernières pénètrent ou non à l'intérieur d'une cellule cible devient une information moins importante. En ce sens, nos tests de viabilité cellulaire démontrent très bien qu'aucune des NP étudiées ici ne présentait une capacité à induire de façon significative la nécrose cellulaire dans les conditions expérimentales utilisées. Il est bien de rappeler ici que les cellules apoptotiques sont considérées 'viables' lorsque nous évaluons la viabilité cellulaire par la technique d'exclusion au bleu de trypan.

Dans ce projet, nous voulions déterminer si le diamètre d'une même NP pouvait avoir des effets différents. En effet, il est connu que les propriétés physicochimiques des NP, incluant le diamètre initial, peut modifier largement les effets biologiques observés suite aux expositions aux NP, *in vitro* et *in vivo*⁵⁴⁻⁵⁷. En général, les NP ayant un plus petit diamètre sont plus toxiques⁵⁵, principalement lorsque l'administration cible la voie pulmonaire; les NP ayant un plus petit diamètre pouvant se localiser au plus profond de l'arbre respiratoire^{58,59}. Avant cette étude, les effets différentiels des NP reliés au diamètre initial sur la biologie des ÉO n'avaient jamais été étudiés. Pour Les NP d'argent, en comparant par exemple les AgNP20 avec les AgNP70 provenant de la même compagnie (Ted Pella Inc.) nous avons observé que les AgNP70 étaient de puissants accélérateurs d'apoptose alors que les AgNP20 avaient plutôt tendance à retarder le phénomène. Pourtant, ces deux NP augmentaient la production de ROS et celle de la cytokine RANTES, à des niveaux légèrement différents. Il est intéressant de constater que dans des travaux antérieurs effectués chez les neutrophiles humains, nous avons démontré que ces mêmes NP avaient des effets différentiels selon le diamètre, mais différents de ce que nous avons observé dans le cas présent avec les ÉO. En effet, chez les neutrophiles, AgNP20 sont de très puissants accélérateurs de l'apoptose³² alors que les AgNP70 retardent significativement ce processus biologique³³. C'est donc dire que pour compliquer davantage le mode d'action des NP, le diamètre n'est qu'une variable parmi d'autres et que les effets biologiques sont même différents d'un type cellulaire à un autre. Pourtant, les ÉO et les

neutrophiles sont des cellules très voisines issues d'une cellule commune de la lignée myéloïde toutes deux connues pour exercer des rôles dans l'inflammation. Nous avons également étudié quatre types de NP d'une même classe, les dendrimères PAMAM G0, G1, G2 et G3. Ces NP sont toutes très petites, ayant un diamètre <5 nm. C'est justement à cause de leur petit diamètre que nous n'avons pas procédé aux analyses DLS puisque le seuil limite de notre appareil est ≥ 10 nm. Ces NP ont toutes les mêmes effets sur la biologie des ÉO. Elles n'ont aucune capacité à moduler les niveaux d'apoptose des ÉO ni leur production d'analytes. Toutefois, nous avons observé de légères différences en ce qui concerne la capacité des dendrimères PAMAM à augmenter l'adhésion et à induire le chimiotactisme (**Tableau 3**).

Une des limites de cette présente étude est le fait qu'il est difficile, voire impossible, de reproduire l'inflammation *in vitro* en y étudiant, par exemple, un seul type cellulaire. Bien que plusieurs modèles inflammatoires *in vivo* utilisés pour déterminer les effets pro-inflammatoires des NP ont été développés chez les rongeurs, il est connu que les ÉO de souris sont fonctionnellement différents des éosinophiles humains⁶⁰. Conscient de ce fait, il est donc important de poursuivre à étudier directement les interactions entre les NP et les ÉO humains *in vitro*.

6. CONCLUSION

Cette étude nous a permis de combler, du moins partiellement, une lacune dans la littérature scientifique concernant les effets biologiques que pourraient avoir des NP sur la biologie des ÉO humains. En effet, l'ensemble des résultats présentés ici nous a permis d'augmenter nos connaissances dans un domaine peu étudié. Il devient clair que les ÉO réagissent différemment d'une NP à l'autre témoignant de la grande complexité des études portant sur le mode d'action des NP. De plus, en comparaison avec des travaux antérieurs^{27-29,34,38}, nos résultats nous démontrent ici que les effets des NP peuvent même être à l'opposé d'un type cellulaire comme les ÉO en comparaison avec des neutrophiles. Sachant maintenant que certaines NP possèdent, à divers degrés, la capacité d'activer des ÉO isolés à partir d'individus sains, il serait intéressant d'étudier la biologie des ÉO isolés de travailleurs potentiellement exposés aux NP, en les activant avec des agonistes classiques comme les cytokines IL-5, GM-CSF, etc., afin de les comparer avec des ÉO d'individus non exposés.

De plus, ce projet démontre que des NP dont seulement le diamètre diffère possèdent des effets biologiques très distincts et même opposés. Également, les résultats de la présente étude permettent de conclure que des NP d'une même catégorie possèdent des effets divers. Le mode d'action des NP est extrêmement complexe et diversifié et peut varier selon la concentration étudiée. Des expériences additionnelles permettront de contribuer à l'avancement des connaissances en regard des effets des NP sur l'inflammation et pourraient nous aiguiller vers une meilleure compréhension des risques pour la santé des travailleurs, mais également pour le grand public de plus en plus exposé aux NP par diverses voies, incluant inhalation, ingestion (NP dans nourriture et emballages), et exposition via la peau (cosmétiques/crèmes solaires), par exemple^{4,43}.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236(3):310-318.
2. Bartneck M, Keul HA, Zwadlo-Klarwasser G, Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett*. 2010;10(1):59-63.
3. Chen D, Tang Q, Li X, et al. Biocompatibility of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4973-4982.
4. Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi Bidgoli S, Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:855-862.
5. Sethi S. New developments in the pathogenesis of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(2):113-119.
6. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1818-1825.
7. Chen HW, Su SF, Chien CT, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *Faseb J*. 2006;20(13):2393-2395.
8. Sevier CS, Cuzzo JW, Vala A, Aslund F, Kaiser CA. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol*. 2001;3(10):874-882.
9. Cho WS, Duffin R, Poland CA, et al. Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*. 2012;6(1):22-35.
10. Hussain S, Vanoirbeek JA, Luyts K, et al. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *Eur Respir J*. 2011;37(2):299-309.
11. Rossi EM, Pylkkanen L, Koivisto AJ, et al. Inhalation exposure to nanosized and fine TiO2 particles inhibits features of allergic asthma in a murine model. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:35.
12. Amini-Vaughan ZJ, Martinez-Moczygamba M, Huston DP. Therapeutic strategies for harnessing human eosinophils in allergic inflammation, hypereosinophilic disorders, and cancer. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(5):402-412.

13. Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* 2009;101:81-121.
14. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):57-83.
15. Watt AP, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):415-423.
16. Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29(1):7-14.
17. Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir Res.* 2013;14(34):1465-9921.
18. Lee S, Hwang SH, Jeong J, et al. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13(1):30.
19. Gustafsson A, Lindstedt E, Elfsmark LS, Bucht A. Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat. *J Immunotoxicol.* 2011;8(2):111-121.
20. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology.* 2016;14:8.
21. Lemiere C, Chaboillez S, Welman M, Maghni K. Outcome of occupational asthma after removal from exposure: A follow-up study. *Can Respir J.* 2010;17(2):61-66.
22. Phillips JI, Green FY, Davies JC, Murray J. Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles. *Am J Ind Med.* 2010;53(8):763-767.
23. Theegarten D, Boukercha S, Philippou S, Anhenn O. Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report. *Diagn Pathol.* 2010;5:77.
24. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):3831-3852.
25. Lu S, Duffin R, Poland C, et al. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ Health Perspect.* 2009;117(2):241-247.
26. Cho WS, Duffin R, Poland CA, et al. Metal oxide nanoparticles induce unique

- inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect.* 2010;118(12):1699-1706.
27. Babin K, Antoine F, Goncalves DM, Girard D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett.* 2013;221(1):57-63.
 28. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(3):1002-1008.
 29. Goncalves DM, Girard D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(5):926-931.
 30. Liz R, Simard JC, Leonardi LB, Girard D. Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(1):616-625.
 31. Noel C, Simard JC, Girard D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro.* 2016;31:12-22.
 32. Poirier M, Simard JC, Antoine F, Girard D. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol.* 2014;34(4):404-412.
 33. Poirier M, Simard JC, Girard D. Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol.* 2015:1-11.
 34. Babin K, Goncalves DM, Girard D. Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(11):2276-2282.
 35. Abrikossova N, Skoglund C, Ahren M, Bengtsson T, Uvdal K. Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology.* 2012;23(27):0957-4484.
 36. Couto D, Freitas M, Vilas-Boas V, et al. Interaction of polyacrylic acid coated and non-coated iron oxide nanoparticles with human neutrophils. *Toxicol Lett.* 2014;225(1):57-65.
 37. Moeller S, Kegler R, Sternberg K, Mundkowski RG. Influence of sirolimus-loaded

- nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. *Nanomedicine*. 2012;8(8):1293-1300.
38. Lavastre V, Goncalves DM, Girard D. Procédures et évaluation du potentiel pro-inflammatoire des nanoparticules. *IRSST*. 2015;Rapport 886:1-32.
 39. Durocher I, Girard D. In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflamm Res*. 2016;65(9):745-755.
 40. Simard JC, Durocher I, Girard D. Silver nanoparticles induce irremediable endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response dependent apoptosis in breast cancer cells. *Apoptosis*. 2016;21(11):1279-1290.
 41. Simard JC, Vallieres F, de Liz R, Lavastre V, Girard D. Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2015;290(9):5926-939.
 42. Goncalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2011;21:21.
 43. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(2):151-165.
 44. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Nanoparticle toxicology: measurements of pulmonary hazard effects following exposures to nanoparticles. *Methods Mol Biol*. 2011;726:313-324.
 45. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. Viscum album agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol*. 2005;130(4):527-535.
 46. Holder AL, Goth-Goldstein R, Lucas D, Koshland CP. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(9):1885-1892.
 47. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol*. 2012;86(7):1123-1136.
 48. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol*. 2007;41(8):3018-3024.

49. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol*. 2011;186(6):3622-3631.
50. Pelletier M, Girard D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):315- 325.
51. Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10(1):26.
52. Huang KL, Lee YH, Chen HI, Liao HS, Chiang BL, Cheng TJ. Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. *J Hazard Mater*. 2015;297:304-312.
53. Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(2):114-117.
54. Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, et al. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7(1):37.
55. Kim IY, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine*. 2015;11(6):1407-1416.
56. Braakhuis HM, Gosens I, Krystek P, et al. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:49.
57. Zhao W, Lu X, Yuan Y, et al. Effect of size and processing method on the cytotoxicity of realgar nanoparticles in cancer cell lines. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1569-1577.
58. Anderson DS, Silva RM, Lee D, et al. Persistence of silver nanoparticles in the rat lung: Influence of dose, size, and chemical composition. *Nanotoxicology*. 2014:1-12.
59. Mohamud R, Xiang SD, Selomulya C, et al. The effects of engineered nanoparticles on pulmonary immune homeostasis. *Drug Metab Rev*. 2014;46(2):176-190.
60. Lee JJ, Lee NA. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin Exp Allergy*. 2005;35(8):986-994.