

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

# ACTIVATION DES ÉOSINOPHILES HUMAINS PAR DES NANOPARTICULES DENDRIMÈRES PAMAM ET DE PALLADIUM

Par  
Yannick Samson

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

## Jury d'évaluation

Président du jury et  
Examineur interne

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

Examineur externe

Mme Gilbert Caroline, PhD  
Département de microbiologie,  
d'infectiologie et immunologie.  
Faculté de médecine, Université Laval

Directeur de recherche

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



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps mon directeur de recherche Denis Girard qui m'a accueilli au sein de son équipe. Il m'a offert cette enrichissante expérience et m'a permis d'entreprendre ce travail librement. Ce travail a pu répondre à un certain nombre de questions et comme bien souvent il en a suscité bien d'autres. Je suis reconnaissante d'avoir pu faire partie de cette équipe « Les girards » dynamique, curieuse et surtout d'une entraide et d'un partage des connaissances de la part de chacun.

Dans un deuxième temps, je remercie l'équipe au complet, pour m'avoir guidé, enseigner, et corriger, ça a été très enrichissant de pouvoir profiter de l'expérience de chacun, notamment à Jean-Christophe Simard et Francis Vallière. Également un grand merci à Rafael Luis Silva pour son entraide, la bande des éosinophiles finissant très souvent la journée en dernier.

Je souhaite aussi remercier Valérie Lavastre qui s'est chargée de mon accueil dans cette grande équipe, qui m'a appris beaucoup et guidée pendant mes premières semaines, et avec qui la route semblait moins longue.

Et bien évidemment merci aussi à l'équipe du laboratoire Bernier, Bruno et Marie-Noëlle qui été toujours présent pour répondre à mes interrogations, et à m'aider avec le FACS quand il faisait des siennes. Et pour la perpétuelle bonne humeur de Marie-Noëlle qui était très appréciable.

Un merci bien spécial à Isabelle Durocher qui l'a première m'a parlé de cette superbe équipe, de la bonne ambiance, et des sujets de recherche passionnants.

Je vous souhaite bonne chance et réussite à tous dans votre vie tant professionnelle que personnelle.

Je tiens à remercier également le comité de correction de mémoire,

Pour finir, je tiens particulièrement à remercier mes parents qui m'ont toujours encouragé et à mon mari qui m'a soutenue en tout temps, et de l'aide inestimable qu'il m'a apportée.

## RÉSUMÉ

Les nanoparticules se retrouvent dans une variété de produits, incluant les cosmétiques, les vêtements et la nourriture. En nanomédecine, les dendrimères polyamines suscitent l'attention, car elles sont utilisées comme vecteur de médicaments et le palladium en imagerie médicale. Les dendrimères sont connus pour s'accumuler dans les voies respiratoires et peuvent exacerber l'inflammation éosinophilique dans des modèles *in vivo*. Considérant que les éosinophiles sont des cellules ayant un rôle dans la régulation des réponses inflammatoires et que les nanoparticules comme les dendrimères influencent les fonctions des neutrophiles. Les dendrimères et le palladium ont-ils la capacité de moduler les fonctions d'un autre type de granulocytes, comme les éosinophiles ? Notre hypothèse est que les fonctions cellulaires des éosinophiles vont être influencé par leur action réciproque avec les nanoparticules dendrimères et palladium. Et ce de manière identique à ce qui a déjà été examiné chez le neutrophile. Ce mémoire présente les effets de deux nanoparticules différentes, les dendrimères et le palladium sur les éosinophiles humains. Nous avons déterminé que ces nanoparticules n'endommagent pas la membrane des éosinophiles, mais que les dendrimères induisent l'apoptose à 24 heures. De plus, les éosinophiles démontrent une meilleure adhésion et chimiotactisme en présence de ces nanoparticules. Par contre, la production d'espèces réactives de l'oxygène n'est pas influencée par ces dernières. Ces connaissances viennent compléter le travail déjà entrepris concernant les nanoparticules.

## ABSTRACT

Nanoparticles are found in a variety of products, including cosmetics, clothing and food. In nanomedicine, polyamine dendrimers are attracting attention because they are used as a drug vector and palladium in medical imaging. Dendrimers are known to accumulate in the airways and may exacerbate eosinophilic inflammation in in vivo models. Considering that eosinophils are cells that have a role in the regulation of inflammatory responses and that nanoparticles such as dendrimers influence the functions of neutrophils. Do dendrimers and palladium have the ability to modulate the functions of another type of granulocyte, such as eosinophils. Our hypothesis is that the cellular functions of eosinophils will be influenced by their interaction with nanoparticles dendrimers and palladium. And this is identical to what has already been examined in neutrophils. This thesis presents the effects of two different nanoparticles, dendrimers and palladium on human eosinophils. We determined that these nanoparticles do not damage the membrane of eosinophils, but that dendrimers induce apoptosis at 24 hours. In addition, eosinophils demonstrate better adhesion and chemotaxis in the presence of these nanoparticles. On the other hand, the production of reactive species of oxygen is not influenced by these nanoparticles. This knowledge complements the work already undertaken on nanoparticles.

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES.....	4
1.1 Définition et applications.....	4
1.2 Voies d'exposition.....	9
1.3 Toxicologie.....	10
1.3.1 Distribution des NPs dans l'organisme .....	12
1.3.2 Mode d'internalisation.....	12
1.3.3 Effets toxiques.....	13
1.4 Les dendrimères.....	14
1.4.1 Propriétés des PAMAM et méthode de synthèse.....	15
1.4.2 Domaines d'applications.....	18
1.4.3 Toxicologie.....	19
1.5 Palladium.....	20
1.5.1 Caractéristiques.....	20
1.5.2 Secteurs d'utilisation.....	21
1.5.3 Toxicologie.....	22
CHAPITRE 2 : LES ÉOSINOPHILES.....	24
2.1 Découverte et morphologie.....	24
2.2 Les granules.....	25
2.2.1 Les effecteurs des granules.....	26
2.2.2 Mécanisme de dégranulation.....	27
2.2.3 Les espèces réactives de l'oxygène.....	28
2.3 Ontogénie et localisation.....	28
2.4 Recrutement des éosinophiles.....	30
2.4.1 Recrutement des éosinophiles en période d'homéostasie.....	31
2.4.2 Recrutement des éosinophiles en situation inflammatoire.....	32
2.5 L'éosinophile une cellule aux multiples capacités.....	32
2.5.1 Chimioquinas et cytokines.....	33
2.5.2 Présence des éosinophiles dans les pathologies.....	35
2.5.3 Capacités immunorégulatrices.....	36
CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	38
3.1 Mesure de la taille et du potentiel zêta.....	38
3.2 Réactifs.....	38
3.3 Nanoparticules.....	38
3.4 Isolation et incubation des éosinophiles .....	39
3.5 Viabilité cellulaire et cytologie.....	39
3.6 Évaluation de l'apoptose des éosinophiles .....	40

3.7 Adhésion cellulaire.....	40
3.8 Chimiotaxie.....	41
3.9 Les ROS.....	41
3.10 Analyses statistiques.....	41
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....	42
4.1 Caractérisation du Pd.....	42
4.2 Effet des dendrimères PAMAM sur la viabilité des éosinophiles humains.....	42
4.3 Effet du Pd sur la viabilité des éosinophiles humains.....	44
4.4 Effet des dendrimères PAMAM sur la morphologie cellulaire des éosinophiles humains.....	45
4.5 Effet des dendrimères PAMAM sur l'apoptose des éosinophiles humains.....	47
4.6 Effet du Pd sur l'apoptose des éosinophiles humains.....	49
4.7 Influence des dendrimères PAMAM sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.....	50
4.8 Influence du Pd sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.....	51
4.9 Impact des dendrimères PAMAM sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.....	52
4.10 Impact du Pd sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.....	53
4.11 Incidence des dendrimères PAMAM sur la production de ROS chez les éosinophiles humains.....	54
4.12 Incidence du Pd sur la production de ROS chez les éosinophiles humains.....	55
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	56
RÉFÉRENCES.....	62

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1.1</u> : Schématisation de la production des NPs selon les deux méthodes existantes, la voie ascendante et descendante.....	8
<u>Figure 1.4</u> : Représentation schématique de la structure d'un dendrimère.....	15
<u>Figure 1.4.3</u> : Représentation schématique des méthodes convergente et divergente de la synthèse des dendrimères.....	17
<u>Figure 2.1</u> : Photographie d'un polynucléaire éosinophile humain coloré au May Grünwald Giemsa en microscopie optique.....	25
<u>Figure 2.3</u> : Représentation schématique de la maturation et du recrutement tissulaire des éosinophiles (inspiré de Driss V., 2008) .....	30
<u>Figure 4.2</u> : Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM de G0 à G3 sur la viabilité des éosinophiles humains à des temps d'incubation différents.....	43
<u>Figure 4.3</u> : Détermination de l'effet du Pd à différentes concentrations sur les éosinophiles humains.....	44
<u>Figure 4.4</u> : Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM sur la morphologie cellulaire des éosinophiles humains à différents temps d'incubation.....	46
<u>Figure 4.5</u> : Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM sur l'apoptose des éosinophiles humains à différents temps d'incubation.....	48
<u>Figure 4.6</u> : Détermination de l'effet du Pd à différentes concentrations sur l'apoptose des éosinophiles humains.....	49
<u>Figure 4.7</u> : Évaluation de l'influence des dendrimères PAMAM sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.....	50
<u>Figure 4.8</u> : Évaluation de l'influence du Pd sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.....	51
<u>Figure 4.9</u> : Caractérisation de l'impact des dendrimères PAMAM sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.....	52
<u>Figure 4.10</u> : Caractérisation de l'impact du Pd sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.....	53
<u>Figure 4.11</u> : Évaluation de l'incidence des dendrimères PAMAM sur la production de ROS intracellulaire des éosinophiles humains.....	54

Figure 4.12 : Évaluation de l'incidence du Pd sur la production de ROS intracellulaire des éosinophiles humains.....55

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1.1a</u> : Utilisations des NPs et des NM selon les domaines d'applications.....	6
<u>Tableau 1.1b</u> : Principales techniques employés dans l'élaboration des NM classifiées selon la méthode utilisée.....	9
<u>Tableau 2.5.1</u> : Chimiokines, cytokines, facteurs de croissance et protéines d'adhésion membranaire chez l'éosinophile.....	34
<u>Tableau 4.1</u> : Caractérisation du Pd.....	42
<u>Tableau 5.0</u> : Synthèse des résultats obtenus pour les expériences sur les effets des NPs (PAMAM et Pd) sur les fonctions des éosinophiles et des neutrophiles.....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
DLS : Diffusion Dynamique de la Lumière  
ECP : Protéine Cationique de l'Éosinophile  
EDN : Neurotoxine Dérivée de l'Éosinophile  
GM-CSF : Facteur de Stimulation de Granulocytes et Macrophages  
HB-EGF : Heparin Binding Epidermal Growth Factor like binding protein  
IL- : InterLeukine  
IFN- : InterFéroN  
Ig : Immunoglobuline  
IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence  
LIF : Leukemia Inhibitor Factor  
LPS : LipoPolySaccharide  
LT : Leucotriène  
MBP : Protéine Basique Majeure  
MIP-1  $\alpha/\beta$  : Protéines  $1\alpha/\beta$  d'Infiltration des Macrophage  
MIF- $1\alpha$  : Facteur de l'Inflammation des Macrophages  $\alpha$   
MIP-3 : Protéine 3 de l'Inflammation des Macrophages  
NGF  $\beta$  : Nerve Growth Factor  $\beta$   
NM : NanoMatériaux  
NP(s) : NanoParticule(s)  
Pd : Palladium  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PDI : Index de PolyDispersité  
RANTES : Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted  
ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)  
SCF : Stem Cell Factor  
TGF : Transforming Growth Factor  
TLR : Toll-Like Receptors  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
VEGF : Vascular endothelial Growth Factor

# INTRODUCTION

De nos jours, la nanotechnologie est une industrie en plein essor qui jouit de plusieurs milliards de dollars en recherche et développement et qui génère des milliers d'emplois. Cette industrie utilise des procédés de fabrication et de manipulation de matériaux qui ont une échelle nanométrique. Une nanoparticule (NP) est une particule, dont les trois dimensions inférieures à 100nm. Ses caractéristiques diffèrent des particules en raison de leur taille et de leur charge de surface, ce qui leur confère des propriétés qui permettent de les utiliser dans de multiples domaines.

En effet, les NPs sont utilisées dans une grande variété de produits, entre autres les cosmétiques, les vêtements de sport, l'imagerie médicale, l'électronique et les implants médicaux.

L'exposition aux NPs peut donc se faire de manière accidentelle ou non, et les principales voies d'exposition sont l'inhalation, l'ingestion et la voie cutanée.

Certaines NPs (synthétiques ou naturelles) sont diffusées dans l'environnement, l'air et l'eau, et sont suspectées d'avoir un impact négatif sur l'environnement et sur la santé. Diverses études toxicologiques ont été menées notamment, l'évaluation des effets cytotoxicologiques de NP de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et d'oxyde de zinc (ZnO) sur les bactéries du sol (X. Fang *et al.*, 2010). Selon les NPs, la taille et l'enveloppe bactérienne sont altérées. En ce qui concerne la santé humaine, une étude réalisée in vitro sur l'impact de NP de carbure de silicium sur les cellules pulmonaires a favorisé la formation de granulomes pulmonaires (O. Ostiguy *et al.*, 2006b). Dans notre laboratoire, l'effet immunomodulateur sur le modèle de la poche d'air murine, à montrer que les fonctions des neutrophiles sont modulées par les NPs (Durocher *et al.*, 2016).

Les NPs avec lesquelles nous avons travaillé sont les dendrimères PAMAM qui possèdent une structure unique, leur forme reprend celle des branches d'un arbre. Cette forme leur confère de nombreuses fonctionnalités, en particulier en nanomédecine où elles sont utilisées en tant que vecteurs de médicaments. Les dendrimères sont synthétisés en laboratoire et classifiés par génération. Les dendrimères PAMAM ont la particularité de pouvoir passer à travers les

barrières biologiques telles que la barrière placentaire et encéphalique. En raison de leur petite taille les NPs dendrimères sont connues pour s'accumuler dans les voies respiratoires.

Les nanoparticules de palladium se sont révélées être d'excellents catalyseurs dans beaucoup de réactions chimiques. Les NPs sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la chimie et matériaux ainsi que la santé.

Le système respiratoire est une cible potentielle d'exposition accidentelle aux NPs et plusieurs études ont démontré que celles-ci peuvent exacerber l'inflammation des voies respiratoires dans des modèles *in vivo*.

Le type cellulaire avec lequel nous avons travaillé est l'éosinophile. Les éosinophiles sont des cellules provenant de cellules souches hématopoïétiques multipotentes, de la lignée myéloïde, ils appartiennent à la famille des granulocytes avec les neutrophiles et les basophiles. Les éosinophiles représentent 1 à 3% des leucocytes sanguins chez les personnes saines, mais peuvent atteindre facilement 10 à 15% chez les personnes asthmatiques ou allergiques (Bousquet *et al.*, 1994). Les éosinophiles circulent brièvement dans le sang avant de s'établir dans des organes cibles tels que l'intestin, l'utérus, les glandes mammaires, la moelle osseuse. Elles sont appelées cellules tissulaires, en effet le ratio éosinophile tissulaire sur circulant est de 200/1. Les éosinophiles sont des cellules qui rentrent en apoptose assez rapidement, 24 à 48 heures, si on les met en culture sans ajouts de cytokines. Par contre en présence d'Interleukine 5 (IL-5) par exemple les éosinophiles sont viables jusqu'à 2 semaines. L'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF sont importants pour leur différenciation et leur survie.

Les éosinophiles ont un rôle important à jouer dans la réponse immune, y compris plusieurs fonctions impliquées dans la résolution des processus inflammatoires. Des pathologies telles que les allergies, l'asthme, les infections parasitaires ou les maladies auto-immunes sont caractérisés par une hyperéosinophilie sanguine et tissulaire.

Entre autres avec leurs cytokines, leurs médiateurs solubles, les éosinophiles pourraient participer à la modulation de la réponse TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> (lymphocytes T auxiliaire, en anglais *T helper*) et pourraient participer au recrutement des macrophages et des cellules dendritiques. Elles pourraient également agir en tant que cellules présentatrice d'antigène. Dans le modèle murin, les NPs induiraient de l'inflammation hyperéosinophilique pulmonaire.

Notre problématique est la suivante, considérant que les réponses fonctionnelles des NPs dendrimères ont un effet pro-inflammatoire *in vivo* (Durocher *et al.*, 2016), et que les

éosinophiles sont modulés par les NPs (Silva *et al.*, 2016). Nous avons émis l'hypothèse que les fonctions cellulaires des éosinophiles sont modulées par l'interaction avec les NPs dendrimères. Nous nous demandons également si le palladium a les mêmes capacités que le TiO<sub>2</sub> pour moduler les fonctions chez les éosinophiles.

# CHAPITRE 1 : LES NANOPARTICULES

## 1.1 Définition et application

Les nanotechnologies sont au cœur de la nouvelle ère industrielle. En effet, l'enthousiasme mondial dans ce domaine engendre des investissements dans de nombreux domaines ou activités de recherche et de nombreuses industries ont vu le jour à la suite d'une rapide extension dans les dix dernières années. En 2014, on pouvait trouver environ 1800 produits commercialisés ce qui correspond à un chiffre d'affaires annuel de plus de 750 milliards de dollars. Afin de pouvoir appréhender de nouveaux développements et application, une infrastructure au Québec a été créée (NanoQuébec). Elle dispose d'équipements de pointe (400M\$) et de personnel qualifié (Endo et al, 2014). Les applications et les procédés entourant les NPs touchent de nombreux secteurs d'activités, en effet les physiciens, les biologistes, les chimistes, les ingénieurs et bien d'autres travaillent de concert afin d'améliorer nos connaissances concernant les NPs (C. Ostiguy *et al.*, 2006a).

Une nanoparticule est une particule qui a ses trois dimensions comprises entre 1 et 100 nm. Les nanotubes, les nanofibres, les nanofilaments, les nano-objets cylindriques ont une seule dimension qui peut être supérieure à 100 nm, mais le diamètre varie de 1 à 10 nm. Les nanocouches, les nanofilms, ont deux dimensions qui sont au-dessus de 100 nm, mais l'épaisseur est d'un à une dizaine de nanomètres. Les NPs se retrouvent de partout dans notre environnement. Les nanoparticules sont utilisées dans une grande variété de produits entre autres on les retrouve dans les cosmétiques, certains contiennent du titane qui permet de refléter les ultra-violets. Les vêtements de sport renferment des particules d'argent qui ont un rôle d'agent bactéricide. Également, on retrouve du dioxyde de titane, dans certains textiles notamment dans les tenues des pompiers en raison de leurs propriétés de retardateur de flamme (C. Ostiguy *et al.*, 2006a ; AFP, 2018).

En octobre 2011, la Commission européenne a soumis une définition pour le nanomatériau. Il s'agit donc d'un matériau naturel créé par l'homme ou créé accidentellement qui comporte des particules sous forme d'agrégat, libre ou aggloméré, et dont la moitié et plus des particules à une ou de multiples dimensions qui sont comprises entre 1 et 100 nm. De plus, lorsqu'un

matériau présente une surface spécifique de plus de  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  elle intègre la définition mentionnée (INRS, 2015).

Certaines NPs sont relâchées dans l'environnement par des sources d'origine naturelle, telles que les fumées volcaniques, les embruns, les eaux souterraines et les feux. D'autres proviennent des activités humaines comme les particules émises lors du chauffage ou par les industries et les transports (Aitken *et al.*, 2004, Cyrus *et al.*, 2003).

Malgré le fait que l'utilisation des NPs est un domaine de la science considérée comme très moderne, celles-ci existaient déjà il y a de nombreuses années. En effet, l'utilisation de métaux contenant des NPs était utilisée dans la fabrication de verrerie à l'époque romaine (Poole *et al.*, 2003), car ces dernières permettaient un changement de couleur de l'objet en présence d'une source de lumière.

Pour faire suite à l'important développement des technologies lors des dix dernières années, aujourd'hui il est faisable de manipuler les atomes individuellement, ce qui permet de réaliser des structures minuscules avec des propriétés très divergentes d'un objet de taille plus grande et avec une composition identique.

Les dimensions des NPs sont infinitésimalement inférieures par rapport à celles qui déterminent la plupart des phénomènes physiques et ça leur procure des propriétés exceptionnelles. Dans la plupart des cas, les nanomatériaux (NM) dévoilent des particularités comme une force considérable, des caractéristiques physiques, chimiques ou électriques remarquablement différentes et surprenantes en comparaison aux mêmes matériaux de plus grand volume (C. Ostiguy *et al.*, 2006a). Par exemple, la mine de crayon en carbone se brise aisément, par contre lorsque le carbone est sous forme de nanotubes, il est plus robuste que l'acier. Communément, l'or est jaune et inerte, pourtant lorsqu'il s'agit de NPs d'or (3nm) celles-ci agissent comme un catalyseur et sont rouges. Toutes ces caractéristiques rendent les NPs très intéressantes pour l'industrie (INERIS, 2007). L'utilisation des nanomatériaux permet un accès à des propriétés physico-chimiques nouvelles, notamment électriques (conductivité d'un isolant remanier), magnétiques, mécanistiques (plasticité plus grande), optiques, catalytiques ou l'inflammabilité.

Comme nous l'avons déjà cité, les domaines d'application sont très variés (tableau 1.1) et certains ont rencontré un grand succès financier, comme les écrans solaires, les filtres optiques, et les rubans d'enregistrement magnétiques. D'autres secteurs sont quant à eux en plein

développement tel que le domaine biomédical et pharmaceutique, les cosmétiques, les textiles et les revêtements ainsi que l'énergie et les catalyseurs (C. Ostiguy *et al.*, 2006a). Il y a une multitude d'utilisations biologique développée à partir des NPs. Notamment dans le secteur médical, des NPs peuvent être employées dans le but de transporter et de délivrer un médicament. Elles sont également utilisées en imagerie médicale comme agent de contraste (Schlager *et al.*, 2010).

**Tableau 1.1a : Utilisations des NPs et des NM selon les domaines d'applications**

Domaines d'applications	Exemples d'utilisations
Aérospatial, nautique et automobile	Additifs pour une combustion optimisée, capteurs pour maximiser l'efficacité des moteurs, détecteurs de glace et de fissures (ailes d'avion), matériaux plus résistants et moins lourds, peinture spécifique (anticorrosion, anti-égratignure, anti-saleté, effet de couleur), pneumatique de plus longue vie et recyclable, résistance mécanique, thermique et énergétique améliorée...
Agroalimentaire	Additifs (anti-agglutinants, colorants, conservateurs, émulsifiants), emballages.
Chimie industrielle	Anticorrosif, catalyseurs à multifonctions, céramiques, charges, pigments, revêtements renforcés, textile antibactérien...
Construction	Ciments (autonettoyants et antipollution), colles (meilleure adhésion), mastics, peintures (antitaches, anticorrosion...), vitrages (autonettoyants et anti-saleté), vernis...
Cosmétique	Crèmes solaires (meilleure protection UV, texture, transparence), maquillage (meilleure tenue, texture, brillance...), dentifrice (meilleur nettoyage, longue durée), produits antirides et antibactériens...
Défense	Détecteurs (d'agents biologiques et chimiques), système de guidage (plus performant), système de surveillance (plus petit, plus performant), textile (légers, plus résistant) ...
Électronique	Audiovisuel (écran plat, système de son), bibliothèque électronique miniaturisée, cellules solaires, fibre optique, mémoire et processeur (haute densité, miniaturisée, rapidité), polymère et composite, technologies sans fil...
Énergie	Batteries et cellules photovoltaïques nouvelle génération, stockage d'hydrogène, géothermie et éolienne, fenêtres intelligentes, matériaux isolants plus performants...
Environnement	Analyseurs spécifiques (chimique), diminution des émissions de gaz (CO <sub>2</sub> ), fertilisants et pesticides de meilleures efficacités et moins néfaste...
Santé	Imagerie médicale (marqueurs fluorescents, contraste), médicaments et agents actifs, médicaments à délivrance précise, surface biocompatible (implants), surface adhésive (anti-allergènes, antibactériens), thérapie personnalisée, vaccins...

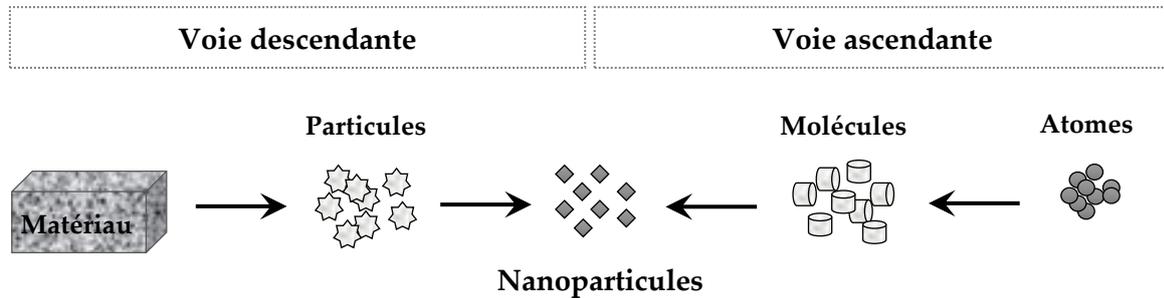
Le secteur de la nanomédecine relève de l'élaboration de conformation moléculaire, de procédé nanométrique complexe employé dans le secteur médical. Cette nouvelle branche de la médecine a pour but d'esquiver les complications connues, telles que la spécificité, les problèmes de synergie ainsi que la faible biodisponibilité. Les dendrimères sont les sujets parfaits pour combler la nécessité grandissante de molécules multifonctionnelles flexibles et biocompatibles (Caruthers *et al.*, 2007, J. Shi *et al.*, 2010). On peut donc parler d'une nouvelle révolution industrielle ou la recherche est en pleine expansion dans la plupart des pays industrialisés. L'Europe et les États-Unis ont grandement investi dans de nombreux domaines

de développement. De 2008 à 2015, le marché mondial des nanotechnologies a doublé en termes de chiffres d'affaires et a généré plus de 2 millions d'emplois dans le monde (Sabourin, 2014, Senik *et al.*, 2011). Plus de 800 articles mis sur le marché qui comporte des constituants nanométriques. Une assemblée de professionnels a évalué à environ 2,6 billions de dollars le marché mondial qui pourrait être atteint en 2015 (C. Ostiguy *et al.*, 2010, Schnieder *et al.*, 2007). Dans les 10 dernières années, plus de 640 millions de dollars ont été investis dans la recherche en nanotechnologie par les gouvernements provinciaux et le gouvernement fédéral du Canada. Par exemple, en Alberta un nouveau centre de recherche et de développement consacré aux nanotechnologies a été ouvert.

Afin de contribuer aux avancées qui sont développées au sein universitaire et mettre en valeur l'utilisation des nanotechnologies, il existe au Québec NanoQuébec (Senik *et al.*, 2011). NanoQuébec a annoncé qu'en 2005, les ventes d'articles contenant des NPs se sont élevées à 2 millions de dollars et qu'elles ont atteint 8 millions en 2008 (C. Ostiguy *et al.*, 2010). Le mandat de NanoQuébec consiste à encourager le développement et l'amélioration des nanotechnologies pour ce qui est de la recherche et de favoriser l'expansion économique et sociale. Beaucoup d'universités au Québec comportent des chercheurs travaillant sur les nanotechnologies. NanoQuébec permet d'avoir un accès aux entreprises et chercheurs en nanotechnologie au Québec, puisqu'il met un répertoire précis sur son site web.

Par contre, parmi les recherches sur les NPs un trop mince pourcentage se préoccupe des risques associés à la santé, l'environnement et à la sécurité en milieu de travail. Mais le domaine des NM et des nanotechnologies est tellement étendu, il touche de nombreuses disciplines et se développe extrêmement rapidement qu'il ne peut être entièrement couvert. En ce qui concerne la surface d'exposition c'est-à-dire la surface spécifique de particule, lorsqu'on a une particule de quelques millimètres, sa surface spécifique varie de 100 à 1000 m<sup>2</sup>/g, on peut donc constater que la réactivité de surface est fortement amplifiée (Brouwer *et al.*, 2004). La production des NM peut être dissociée en deux voies (Figure 1.1). La voie ascendante et la voie descendante. La première revient à assembler la matière atome par atome afin d'élaborer des molécules. Cette technique est employée pour la création des fullerènes et des nanotubes de carbone. La deuxième voie revient à fragmenter un matériau conventionnel

jusqu'à acquérir les proportions souhaiter d'échelle nanométrique (Köhler *et al.*, 2008, C. Ostiguy *et al.*, 2006a).



**Figure 1.1 :** Schématisation de la production des NPs selon les deux méthodes existantes

Les deux méthodes existantes représentées sont la voie ascendante et la voie descendante. Schéma adapté et modifié de (INRS, 2015).

Ces deux méthodes se rejoignent en ce qui concerne la taille de la NP obtenue. La voie ascendante permet de produire une variété d'architectures plus vaste et un meilleur contrôle de la dimension nanométrique des NPs. La première façon de procéder est de concevoir des molécules puis de les retailler pour réduire leur taille. La deuxième façon de procéder se fait grâce au microscope à effet tunnel qui sert d'outil pour manipuler les atomes. En effet, le mode de construction procure des moyens de contrôle sur la taille, sur l'homogénéité des substances, et sur la disposition des molécules. La voie descendante permet de générer de plus grandes quantités de NPs grâce à son mode de production par fractionnement graduel, mais cette technique rend plus délicat le contrôle sur la dimension nanométrique (INRS, 2015).

Les techniques utilisées de nos jours afin d'élaborer des NM sont regroupées en trois groupes différents selon le procédé d'utilisation qui sont regroupés dans le tableau 1.1b.

La voie ascendante emploie les méthodes de fabrication physiques et chimiques tandis que la voie descendante utilise les procédés mécaniques.

**Tableau 1.1b : Principales techniques employées dans l'élaboration des NM classifiée selon la méthode utilisée.**

Méthodes	Techniques
Chimique	Fluides avec réaction chimique (Oxydes, beaucoup de métaux, quelques nitrures) Réactions en milieu liquide (co-précipitation chimique, hydrolyse) Réactions en milieu solide (oxydes et la majorité des métaux) Réaction en phase vapeur (oxydes, carbures, alliages métalliques, nitrures, ect.) Procédés sol-gel (à base de silice, alkoxyde de métal, la majorité des oxydes) Polymérisation en phase gazeuse, électrofilage, greffage (polymères organiques comme les dendrons et les dendrimères) Réactions de coprécipitation chimique ou hydrolyse (oxydes métalliques et métaux) Polymérisation en chaîne par étape en phase liquide (polymères organiques : dendrimères et dendrons)
Mécanique	Broyage (haute énergie ou mécanosynthèse) Activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres Consolidation et densification Forte déformation par friction, laminage, torsion (oxydes métalliques)
Physique	Condensation, évaporation sous pression partielle inerte ou réactive ( Al, Co, Cu, Fe, Ni, Pd, Pt, oxydes) Synthèse au plasma ou méthodes à arc électrique (oxydes métalliques) Décharge électrique Décomposition catalytique Dépôt physique en phase vapeur (dépôts de CrN, TiN) Recuit à basse température (alliages métalliques) Flammes de combustion (oxydes métalliques) Pyrolyse au laser (suies carbonées, fullerènes, Si, TiO <sub>2</sub> , ect) Irradiation électronique ou ionique Micro-ondes (Ag, Ni) Sectionnement laser

## 1.2 Voies d'expositions

À la suite du développement des nanotechnologies, il y a eu une prise de conscience concernant l'émission de NM manufacturé. Cette situation a entraîné des interrogations sur les sujets entourant les nanotechnologies, qui touchent le domaine scientifique et sanitaire. Les émissions de NM induisent deux types d'expositions humaines qui attirent l'attention, soit celle concernant les travailleurs et celle visant les consommateurs (Bencsik *et al.*, 2017). Le fait que les NPs puissent pénétrer dans l'organisme représente un danger potentiel pour la santé de l'homme et des différentes espèces. L'exposition peut avoir lieu de manière directe, lorsque des NPs sont renfermées dans des poudres où de façon indirecte lorsque les NPs composant des matériaux sont libérées. Les situations d'expositions aux NPs sont variées et fréquentes. Elles peuvent se produire de façon accidentelle, comme lors d'incident ou d'un mauvais fonctionnement de matériel (fuite/bris). Ces expositions peuvent être considérées comme non

accidentelles, comme lors de l'utilisation des produits cosmétiques, ou de vêtements qui contiennent des NPs.

Il faut également prendre en compte les situations d'expositions professionnelles qui sont plus chroniques en raison du succès des NPs dans les industries et la recherche, telles que les transferts, l'échantillonnage, l'usinage de nanocomposites, le conditionnement, le nettoyage... (INRS, 2015).

L'homme se retrouve exposé aux NPs par le biais de diverses voies, les voies respiratoires, cutanées et digestives. La voie la plus importante est le système respiratoire, dont le site de dépôt va résulter de la taille des NPs (Li Y et al, 2019). En ce qui concerne la pénétration par la voie cutanée, elle est encore sujette à controverse (INRS, 2015 ; Frankova J, 2018 ; Ostaszewska T, 2016). Le système respiratoire représente la voie d'intrusion la plus importante de NP dans l'organisme. Les NPs sont capables d'atteindre la voie gastro-intestinale.

En raison de leur très petite taille, les NPs ou les objets qui sont ingérés ou inhalés sont susceptibles de traverser les barrières biologiques (nasales, bronchiques et alvéolaires) et se diriger vers les divers lieux de l'organisme via le sang et la lymphe (INRS, 2015). Une fois que les NPs se retrouvent dans la circulation sanguine, en fonction des interactions qu'elles vont avoir avec les cellules présentes (protéines plasmatiques, cellules sanguines, plaquettes, cellules immunitaires) leur devenir et leur action pourra être variable (Mortimer *et al.*, 2009). Des modifications physiologiques telles que l'inflammation, la coagulation sanguine et bien d'autres sont provoquées par la proximité avec des NPs. Il est donc d'une grande nécessité de déterminer la répercussion des interférences des NPs sur les divers modèles cellulaires et leurs incidences au niveau du système immunitaire.

### **1.3 Nanotoxicologie**

Chaque NP peut avoir un effet potentiellement toxicologique, cela va dépendre de plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la structure, la forme, la composition chimique et la taille. Actuellement, de plus en plus d'études sont menées sur ce sujet, mais elles restent peu nombreuses en ce qui a trait à la santé humaine. Plusieurs études montrent des impacts pouvant se produire au sein du système inflammatoire, neurologique, cardiovasculaire et respiratoire. La majorité des études sont issues d'un travail réalisé sur des cultures cellulaires ou chez l'animal et par conséquent il est difficile de transposer les résultats chez l'être humain.

Les particules fines émises par les activités industrielles et les moteurs sont à l'origine de la pollution atmosphérique et ont été amplement étudiées (essais chez l'homme, études épidémiologiques). Il ressort de ces études que les particules fines provoquent des effets sur le système respiratoire (inflammation ou obstruction des voies aériennes) et cardiovasculaire (ischémique myocardique) (Bencsik *et al.*, 2017, INERIS, 2007). Pour ce qui est relatif aux NPs manufacturées, le recul est moins élevé, son développement est relativement récent en comparaison des particules ultrafines, mais elles peuvent tout de même être utilisées comme référence.

Les effets toxicologiques sont souvent induits par un certain nombre de facteurs.

La taille, elle va déterminer la localisation des NPs déposées lors de l'inhalation. Plus la taille est réduite plus la NP va pouvoir migrer facilement dans l'organisme. Le programme Nanotox a démontré que les NPs d'aluminium de 2 à 4 nm sont beaucoup plus toxique que celles de plus grande taille, 40 à 47 nm (INERIS, 2007). La diminution de la taille des NPs conduit à un ratio plus élevé du volume ce qui engendre des interactions plus fortes avec les molécules biologiques présentes (Oberdorster *et al.*, 2005b).

La surface spécifique est en lien direct avec la taille de la NP. En effet plus la NP va être petite plus la réactivité chimique et biologique va être augmenté. Donc elle facilite l'entrée des NP dans l'organisme jusqu'aux organes.

Une plus grande concentration en NP facilite leur entrée au sein de l'organisme et favorise leur persistance.

La toxicité des NPs s'avère influencée par la forme de celle-ci. Les NPs comme les nano filaments et tubes semblent être plus toxique que les sphériques, et ce pour une composition identique.

La solubilité, la composition chimique, le degré d'agglomération et d'agrégation semblent avoir également un rôle à jouer dans la toxicité des NPs (INRS, 2015). Il faut aussi prendre en compte que certaines particules ont la capacité de fixer des molécules de l'environnement plus susceptible d'être toxique à leur surface. Il y a bien sûr d'autres facteurs qui peuvent entrer en ligne de compte en ce qui concerne la toxicité, comme les facteurs concernant l'exposition (la voie de pénétration, la durée et l'importance) et les facteurs de la personne concernée (susceptibilité...) (Schnieder *et al.*, 2007).

### 1.3.1 Distribution des NPs dans l'organisme

Les NPs se retrouvant dans de nombreux produits de notre quotidien, ils aboutissent inévitablement dans l'environnement, l'air, le sol et l'eau, amenant la flore et la faune à une exposition conséquente. À ce jour, il n'y a pas tant d'études qui ont été réalisées en ce qui concerne l'accumulation, la persistance, la distribution dans les compartiments, la dégradation et l'écotoxicité. Parmi celles qui sont à notre disposition, montre des résultats qui génère l'attention. Par exemple, Gottschalk et son équipe ont établi une modélisation de la contamination des eaux et des sols, les résultats sont plutôt alarmants quant à la capacité d'accumulation dans les sols (Sun *et al.*, 2014). Une autre étude montre une observation d'effets génotoxiques et cytotoxiques chez le poisson zébré. Ces effets sont corrélés avec une exposition directe à des NPs d'argent (Bai *et al.*, 2010, Wise *et al.*, 2009). L'exposition aux NPs au travail est jugée comme faisant partie des dix risques les plus importants concernant la santé sur les lieux de travail. En effet, les NPs étant de plus en plus utilisées dans les domaines de l'industrie, les travailleurs sont de plus en plus sujets aux expositions (Kuhlbusch *et al.*, 2011, Sanchez *et al.*, 2009). Un des risques rencontrés en milieu de travail lors d'une exposition aux NPs est lié au système respiratoire. Il a été observé que les NPs de 10 à 100 nm vont en grande partie se déposer au niveau des alvéoles pulmonaires (INRS, 2015).

### 1.3.2 Mode d'internalisation

Les NPs entraînent des réactions toxicologiques fondées sur des processus inflammatoires et liés au stress oxydant, qui est responsable de la production de radicaux libres (Stark, 2011). Ces derniers sont fortement réactifs et lorsqu'ils sont en quantité importante, ils ont la capacité d'endommager les tissus biologiques environnants dans la situation où les processus antioxydants ne seraient pas en mesure de les inactiver. Lorsque des NPs sont mises en contact avec un milieu biologique, il se produit des phénomènes d'absorption de protéine, de dissolution et d'agrégation (Oberdorster *et al.*, 2005b, Stark, 2011).

À la suite de la pénétration de NP, il est fréquent de retrouver une certaine cytotoxicité cellulaire, de par l'élaboration de ROS. En raison de leur taille réduite, les NPs sont capables d'esquiver les actions phagocytaires des macrophages (Dwivedi *et al.*, 2011, Oberdorster, 2010). Lorsque les NPs se retrouvent à l'intérieur de la cellule, elles sont capables de s'associer

à diverses molécules comme des protéines, des minimes portions de peptide ou à de l'ADN. Il est donc important de s'attarder sur les cellules immunes, sanguines ou plasmatiques lorsqu'on évalue la toxicité des NPs dans des conditions biologiques (Zolnik *et al.*, 2010). La majorité des NPs de dimension de 1 à 10 nm sont fréquemment internalisées de façon passive, de plus leur internalisation serait dépendante de la superficie et aussi de leur charge de surface. (Dobrovolskaia *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2012).

### 1.3.3 Effets toxiques

Les conséquences d'un contact par inhalation à des NM peuvent engendrer des inflammations pulmonaires, ainsi qu'une élévation du nombre de pathologies respiratoire chronique comme l'asthme et même des problèmes pulmonaire plus sévère (Oberdorster *et al.*, 2005a). En ce qui concerne la pénétration par la voie digestive, les NPs ingérées peuvent provenir du conditionnement des aliments ou directement de ceux-ci. Souvent, elles sont présentes en tant qu'additifs (Bencsik *et al.*, 2017). En réponse à une exposition à des NPs de titane chez le rat, il a été observé des lésions cardiaques, des mastocytes dans les tissus de l'estomac et l'œdème du foie (Y. Wang *et al.*, 2013b). Sur l'épiderme humain, des études « *in vitro* » ont établi qu'il y avait peu d'absorption au niveau de la peau inaltérée (Vlachou *et al.*, 2007). L'infiltration de NPs d'argent si l'épiderme est altéré, peut avoir lieu et même de façon considérable, mais les effets de cette infiltration n'a pas fait partie de cette étude. (Vlachou *et al.*, 2007).

Les nanotubes de carbone ont été catalogués comme un cancérogène possible (Bencsik *et al.*, 2017). En effet, ils représentent un risque élevé dans le développement de pathologie pulmonaire (plaques pleurales) en raison de leur similarité structurelle à l'amiante (Sanchez *et al.*, 2009). Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) a subi le même classement à la suite de nombreuses études (Trouiller B. *et al.*, 2009 ; Jargot D *et al.*, 2016). Le centre International de recherche sur le cancer l'a classé en 2006 dans la section des substances cancérogènes possibles chez l'homme (Cancer et Environnement, 2019). Notamment suite à une exposition pulmonaire des rats à des doses importantes, il était observé un développement de cancer du poumon (Borm *et al.*, 2004). Des dommages au niveau de l'ADN peuvent être provoqués par les NM (H. Wang *et al.*, 2013a). Le fait que les NM peuvent persister dans l'organisme laisse envisager l'éventualité d'une toxicité chronique, ainsi que l'évolution de cancers (Bencsik *et al.*, 2017).

On peut discerner trois processus impliqués dans la toxicité causée par les NPs. Tout d'abord, la NP par sa composition propre peut avoir un effet toxique direct sur l'organisme. On peut prendre le TiO<sub>2</sub> comme exemple lorsqu'il est inhalé suite à l'utilisation d'aérosol (Cancer et Environnement, 2018 ; Jargot D *et al.*, 2016). Ensuite, on peut remarquer l'élaboration d'éléments toxique par la cellule qui est entrée en contact avec la NP. Enfin, la mort cellulaire peut se produire en présence de NP suite à une réaction avec des molécules biologiques ou la destruction de la membrane (Zolnik *et al.*, 2010). De nombreux paramètres comme la concentration, le temps d'exposition, la surface spécifique et également les diverses tailles d'agglomérats conduisent à être prudent lorsqu'on compare différentes études entre elles. Effectivement, selon Fubini une NP qui se retrouve dispersée va être plus toxique que lorsqu'elle est considérablement agglomérée (Fubini *et al.*, 2010). Donc, il n'est pas évident de démontrer un lien direct entre l'induction de la toxicité et les caractéristiques physicochimiques des NPs.

#### **1.4 Les dendrimères**

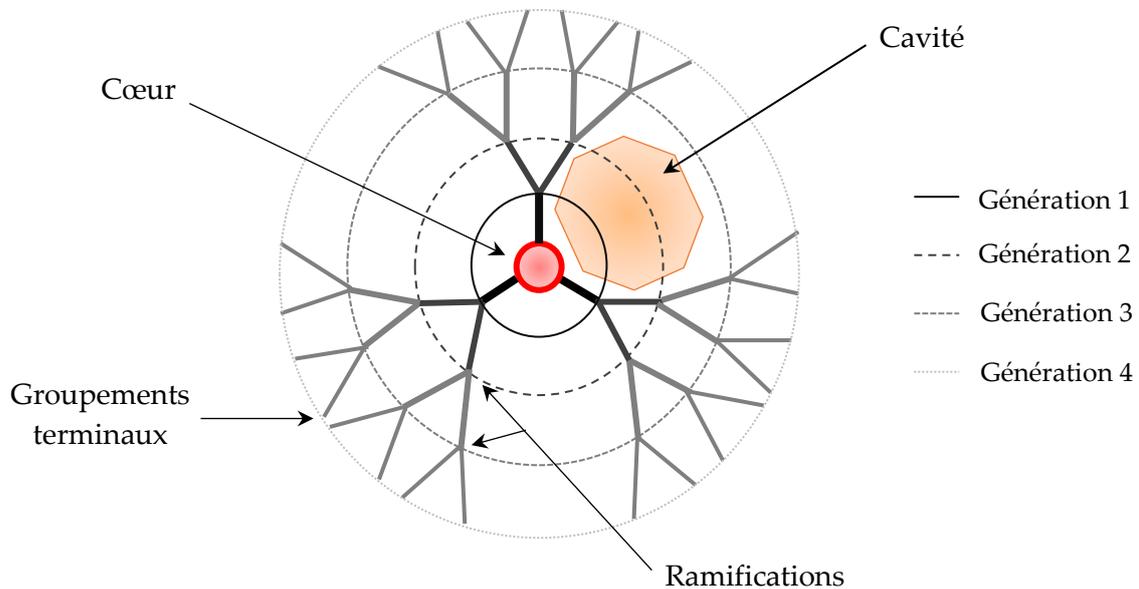
Ils sont synthétisés en laboratoire, le premier dendrimère a été créé en 1979 par Tomalia et son équipe (D. Astruc *et al.*, 2010). Tomalia a présenté les dendrimères polyamine (PAMAM) en 1984, pendant la première conférence internationale sur les polymères à Kyoto. Il existe diverses familles de dendrimères. Les PAMAM sont les premiers qui ont été caractérisés et synthétisés par l'équipe de Tomalia (chimiste spécialisé dans la conception de polymère synthétique).

Une molécule dendrimères à l'aspect des branches d'un arbre, en effet, en étymologique, ce nom provient du grec « dendron » signifiant arbre.

Dans la nature, on peut observer différentes conformations de type arborescentes que nous rappellent les dendrimères comme les cristaux de neiges, les neurones, les branches d'un arbre... Les dendrimères sont nés de l'inspiration de ces structures naturelles, mais elles ont été répliquées à une dimension nanométrique, ce qui a donné des molécules ayant une composition ramifiée spécifique.

Un dendrimère est une macromolécule de polymère, multifonctionnel et hyperramifiés, il est composé de trois éléments principaux qui sont le cœur de la molécule (le point central), les ramifications ou unités de branchements (lieux où commence chaque génération nouvelle) et

des groupes fonctionnels en surface (terminaux) (Figure 1.4). Une génération correspond à la quantité de répétition dans la structure.



**Figure 1.4 :** Représentation schématique de la structure d'un dendrimère.

Schéma de la structure d'un dendrimère adapté et modifié (Zerrad, L, 2010)

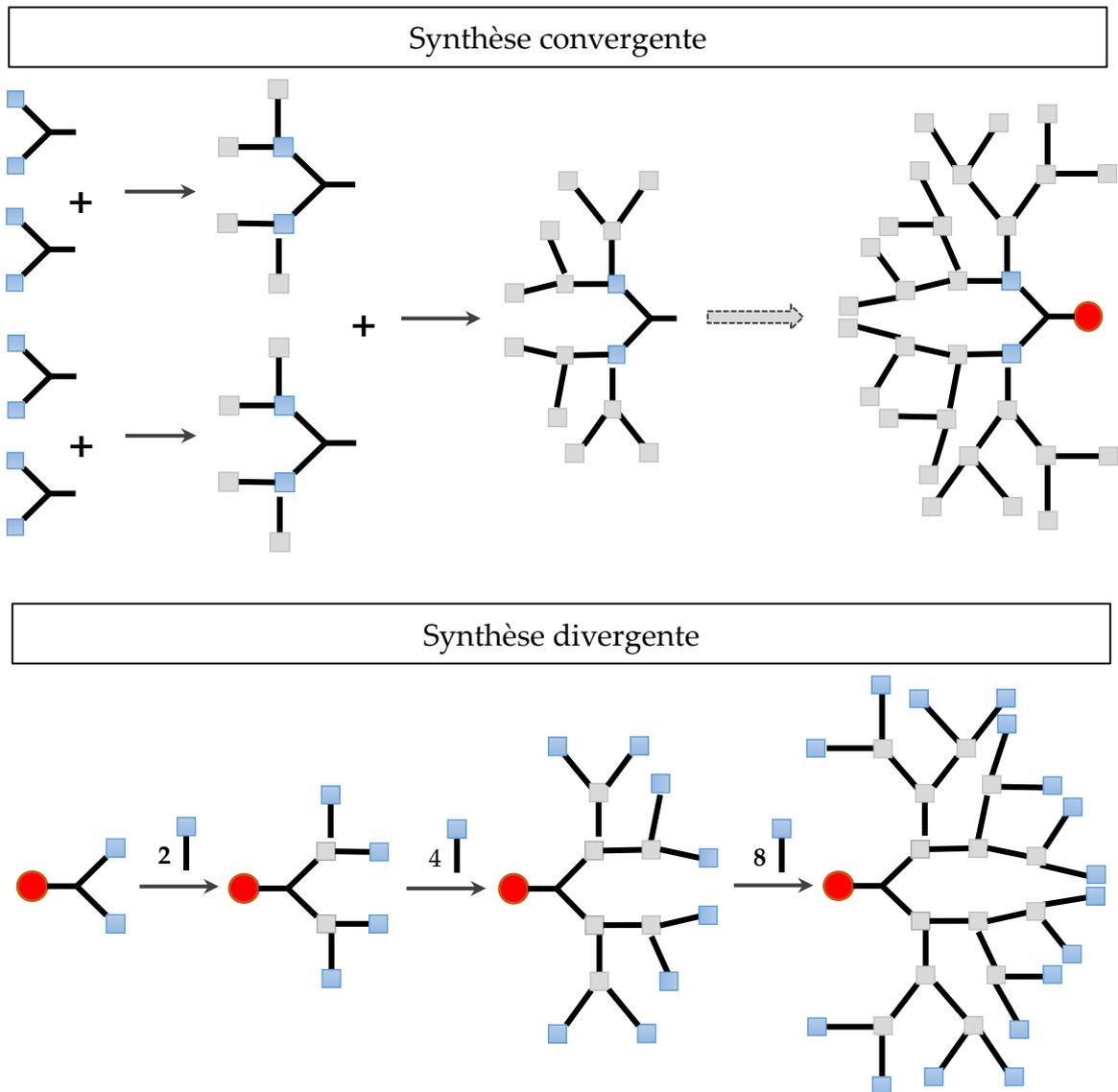
Tous les dendrimères ont un agencement similaire, par contre leurs propriétés physico-chimiques peuvent être variables en fonction de l'origine des éléments qui le constituent (Caminade *et al.*, 2005). Une des particularités des dendrimères est la présence de cavité centrale qui lui procure une flexibilité et porosité unique.

### 1.4.1 Propriétés des PAMAM et méthode de synthèse

Aujourd'hui les dendrimères PAMAM sont les plus employés, parmi la centaine d'autres familles qui ont des composants chimiques de structures différents (azote, carbone, métallique, phosphore, silicium, ou soufre) (D. A. Tomalia, 2016). Leur forme unique leur confère de nombreuses particularités et en fait des molécules d'intérêt dans le domaine scientifique. Ces molécules sont solubles dans l'eau, biocompatible et non immunogène. La structure spécifique des dendrimères leur procure des particularités physiques et chimiques, considérées nouvelles en comparaison des polymères conventionnels, comme la viscosité, la solubilité, et la pureté chimique. En ce qui concerne les PAMAM avec lesquels nous avons travaillé, ils possèdent des groupements chimiques terminaux  $-NH_2$ , ce qui leur confère d'être soluble et de plus ils sont miscibles dans les solvants (Hu Yang *et al.*, 2006). Au demeurant, elles disposent de

groupes aminés sur lesquelles il est possible de fixer des molécules spécifiques d'où l'intérêt qu'elle suscite dans le secteur médical. Lorsqu'ils sont utilisés en tant que vecteur de médicament, celui-ci est encapsulé dans le dendrimère (entre les branches) ou attaché en surface (D. Astruc *et al.*, 2010). Aussi les dendrimères sont capables de véhiculer des molécules d'intérêt, tel que des anticorps afin d'atteindre les cellules visées. Également, il est possible de joindre un traceur qui nous indiquera s'il s'est adhérent au point désiré. Ils sont donc des candidats parfaits comme vecteur de médicaments grâce à leur potentiel de fixation multiple, c'est à dire additionner une molécule cible et un agent de contraste (Gillies *et al.*, 2005, Svenson *et al.*, 2005).

La synthèse des dendrimères consiste en l'assemblage de monomères aboutissant à un polymère monodisperse. La conception de ces macromolécules est remarquable, elle a lieu autour d'élément monomérique de cœur, en multipliant plusieurs fois de suite des séquences de réactions chimiques identiques pour avoir en terminant chaque cycle une nouvelle génération qui aura une quantité exponentielle de branches similaire (Boas *et al.*, 2004, Caminade *et al.*, 2005) (figure 1.4). En ce qui concerne la synthèse des dendrimères, il y a deux approches différentes selon la conception, soit la synthèse convergente, elle consiste à former la molécule en partant de l'extérieur jusqu'au noyau en fixant des éléments dendritiques à un cœur possédant plusieurs fonctions (figure 1.4.3) (Hawker *et al.*, 1990, D. A. Tomalia, 2016). Soit la synthèse divergente, elle va se former du noyau jusqu'à la périphérie par répétition successive d'une séquence de réactions chimiques identique (figure 1.4.3, (adapté et modifié de (Le Dall, 2015))), qui a été élaborée par Tomalia et qui a permis de concevoir le premier dendrimère de grande taille, le PAMAM de génération 11 (Kallos *et al.*, 1991, Morgenroth *et al.*, 1997). La synthèse commence avec une petite molécule possédant divers points de branchements, par exemple l'ammoniac comporte trois points de branchements, alors que l'éthylène diamine du PAMAM en possède quatre (Arseneault, 2012). La méthode de synthèse par la voie divergente est la plus employée. Les PAMAM sont généralement obtenus par la voie de synthèse divergente. Ils sont composés d'un cœur central d'éthylènediamine sur lequel interagissent quatre acrylates de méthyles et synthétisés selon un protocole expérimental que l'on retrouve dans la revue (Peterson *et al.*, 2003). Celui-ci peut légèrement varier en ce qui concerne les températures de conservation des solutions ou les temps de pauses.



**Figure 1.4.3 :** Représentation schématique des méthodes convergente et divergente de la synthèse des dendrimères.

La synthèse des dendrimères est compliquée et dure longtemps, en effet plusieurs jours sont nécessaires pour l'obtention d'un dendrimère de petite génération. Et pour en obtenir un de génération élevée, plusieurs semaines peuvent être requises (Tang *et al.*, 1996). Ils arborent des fonctions, une géométrie et des proportions ressemblant à celles de système biologique, en particulier à celles d'une protéine (Donald A Tomalia, 2004). Les dendrimères ont plusieurs propriétés intéressantes et exploitables dans divers domaines. Ces propriétés particulières sont générées par les arrangements moléculaires à leur surface. La viscosité va être influencée par la génération. Elle va être plus élevée jusqu'à la génération 4 puis elle va s'abaisser.

Toutes les propriétés des PAMAM sont influencées par la génération. On parle de générations, lorsqu'une épaisseur est rajoutée, plus il y a de couches partant du cœur vers la périphérie des

dendrimères plus les générations sont élevées, plus les dendrimères sont denses, mais à partir d'un certain stade leur taille ne peut plus augmenter (encombrement stérique) (Tully *et al.*, 2001). On remarque que les PAMAM ne vont pas au-delà de la génération 10.

Donc le diamètre moléculaire varie selon la génération, soit le nombre d'embranchements qui compose la structure. L'équipe de Tomalia a évalué à plus d'un millier le nombre de modifications d'éléments de surface pouvant être faite sur les PAMAM leur procurant de nouvelles propriétés physico-chimiques. Donc dépendamment de l'extrémité du dendrimère, ses propriétés vont être variables si celui-ci porte des groupements carboxyliques qui sont hydrophiles, le dendrimère sera par conséquent hydrosoluble (Caminade *et al.*, 2005, D. A. Tomalia, 2016). En principe, il est envisageable de produire un dendrimère hydrosoluble, mais avec la caractéristique interne d'être hydrophobe, dans le but de véhiculer un agent actif hydrophobe dans le système circulatoire sanguin par exemple (D. Astruc *et al.*, 2010). Lorsqu'un dendrimère est constitué de charge positive, le volume de celui-ci sera amplifié. Cette propriété peut être un autre avantage lors du transport de médicament vers le site voulu (D. A. Tomalia, 2016).

#### **1.4.2 Domaines d'applications**

Plusieurs études ont établi que la combinaison des PAMAM avec des molécules actives allait engendrer une augmentation de la solubilité et de la perméabilité de ces médicaments au sein de cellules. La cytotoxicité ainsi que la perméabilité des dendrimères peuvent être modifiables par des changements à leur surface (D. A. Tomalia, 2016). Parmi les dendrimères, les macromolécules dendritiques PAMAM sont celles qui sont davantage employées en nanomédecine. Les utilisations sont hautement diversifiées, notamment ils peuvent être utilisés dans des thérapies contre le cancer (Oei AL *et al.*, 2019) en composant organique électroluminescent, ou encore comme aide dans la multiplication de cellule. Ils peuvent encore être utilisés en combinaison avec d'autres NPs (D. Astruc *et al.*, 2010).

Les dendrimères comme nous l'avons déjà cité sont multifonctionnelles et sont donc de très bons candidats pour la théranostique qui est un sous-secteur de la nanomédecine. Ce domaine comme son nom l'indique vient des termes thérapie et diagnostic, consiste au développement de NPs qui supporte l'imagerie médicale à des fins de diagnostic et la délivrance d'une substance active dans l'organisme (Arseneault, 2012). Depuis une vingtaine d'années, les

PAMAM font l'objet de nombreuse recherche, autant dans le secteur pharmaceutique (vecteur de médicament, d'acide nucléique) (Richardson *et al.*, 2001) qu'en tant qu'outils en imagerie médicale (diagnostic, ciblage), ces recherches entraînent des dépôts de brevets de plus en plus nombreux (Ferruti *et al.*, 2002, Marco Fischer *et al.*, 1999). Nous pouvons citer comme exemple le gel topique vaginal "vivagel" contre les maladies infectieuses liées aux virus herpes et VIH (Rupp *et al.*, 2007). Les dendrimères suscitent également l'intérêt des secteurs de la chimie (catalyseurs, revêtement...) (Lee *et al.*, 2006, BB. Wang *et al.*, 2004) et physique (cristaux liquides, capteurs lumineux) (Adronov *et al.*, 2000, Jang *et al.*, 2006).

### 1.4.3 Toxicologie

Il a été déterminé que les PAMAM portant des amines d'une certaine grosseur en surface peuvent être immunogènes (Kobayashi *et al.*, 2001 ; Luong D. *et al.* 2016). Lorsqu'on effectue un changement avec des chaînes de polyéthylène glycol en surface, on diminue l'immunogénéicité et ça permet d'augmenter la durée de vie du dendrimère dans la circulation sanguine (Kobayashi *et al.*, 2001). Si le dendrimère est associé à des épitopes de cellules T CD4+ ou alors avec des antigènes, on peut observer une forte augmentation de l'immunogénéicité. Dans le cadre de la transfection, les dendrimères associés à de l'ADN ont pénétré le noyau des cellules sans causer de dommage et de cytotoxicité ou très peu (Roessler *et al.*, 2001). *In vivo*, la durée d'épanchement s'accroît en fonction de la hausse du poids moléculaire et des générations des dendrimères lors du passage par l'endothélium microvasculaire (M. El-Sayed *et al.*, 2001).

Quelques études *in vitro* et *in vivo* ont déjà été réalisées avec les PAMAM sur des cellules en culture et sur des modèles animaux (généralement sur des souris). Parmi les différentes études, l'équipe de Baker a déterminé qu'il n'y avait que les générations les plus élevées qui permettent le transfert de gène (Y. Wang *et al.*, 2000). La majorité des études similaires ont consisté à établir la biocompatibilité et la biodistribution des PAMAM dans l'hôte, en dépit d'une faible cytotoxicité. Divers tests ont donc été effectués sur les PAMAM, et il a été observé qu'ils avaient une certaine toxicité selon les conditions. Entre autres, ces derniers peuvent engendrer une hémolyse ou des altérations morphologiques des érythrocytes (Domanski *et al.*, 2004, Ziemia *et al.*, 2012). Dans notre laboratoire, il a également été montré que les PAMAM avaient un impact sur les neutrophiles, notamment au niveau de l'apoptose et du recrutement

des cellules immunitaires. *In vitro* il a été observé que les PAMAM provoquent une induction de l'apoptose chez les neutrophiles et *in vivo*, en utilisant le modèle de la poche d'air murin, les PAMAM induisent le recrutement de cellules immunitaires au site de l'injection. (Durocher *et al.*, 2016).

Les premières études *in vivo* de thérapie génique utilisant des PAMAM ont produit des résultats favorables chez l'animal, encourageant de ce fait les équipes cliniques à envisager la réalisation d'essai clinique (Hu Yang *et al.*, 2006). Bien évidemment avant de pouvoir passer aux études cliniques, il faut montrer la pertinence et la sécurité de ces recherches. Il faut s'assurer de la reproductibilité des résultats et aussi étudier les potentiels effets secondaires. D'où la nécessité grandissante de caractériser le profil cytotoxicologique des PAMAM, de réaliser une étude physicochimique détaillée de ces macromolécules dans le but d'envisager les dangers éventuels adhérents à une injection systémique des dendrimères.

## 1.5 Le Palladium

### 1.5.1 Caractéristiques

Le palladium (Pd) existe en tant que matériaux, notamment le sel de Pd. Il existe également sous forme de NP et il peut majoritairement se retrouver sous forme de colloïdes ou de clusters. Les clusters se trouvent à l'état solide, il se retrouve dans une structure très mince (1-10nm), alors que pour les colloïdes on les retrouve en solution avec un diamètre supérieur à 10 nm (Lu *et al.*, 2004, Ott *et al.*, 2007). Dans notre étude, ils ont été utilisés sous forme de colloïde. Cet état leur permet d'être appariés à de nombreux éléments tels que des suspensions de polymères, des particules inorganiques, ou des suspensions de molécules organiques ou amphiphiles (Roucoux *et al.*, 2002). Quand une particule métallique est diminuée à l'échelle nanométrique, la conductivité et la densité électronique vont être moindres, du coup les caractéristiques électroniques vont être fortement altérées (Mostafa A El-Sayed, 2001).

En ce qui concerne la formation des nanoparticules métalliques, les deux approches de synthèse mentionner à la figure 1.1 existent. Néanmoins, la voie ascendante aussi appelée méthode chimique est préférée, car elle permet un meilleur contrôle de la composition, de la forme et de la taille des particules (Toshima *et al.*, 1998).

Une des principales fonctionnalités du Pd est la catalyse (Didier Astruc *et al.*, 2005, Widegren *et al.*, 2003). Le Pd soluble offre une réactivité de surface qui lui procure des caractéristiques comprises entre les catalyseurs hétérogènes et homogènes. Leurs petites tailles leur procurent une surface spécifique vraiment élevée qui va lui permettre d'avoir une quantité de sites actifs libres importants pour la modification de substrats (Roucoux *et al.*, 2002). Les agents stabilisants qui sont situés à leurs surfaces vont permettre une modulation de la sélectivité (Aiken *et al.*, 1999).

### 1.5.2 Secteurs d'utilisation

Le Pd fait partie des métaux de transition le plus fréquemment employés dans la réalisation des réactions de couplage carbone-carbone notamment la réaction de Suzuki-Miyaura et la réaction de Heck (Heck, 1968, Miyaura *et al.*, 1995). D'ailleurs, Crooks et son équipe ont employé des NPs de Pd encapsulés à l'intérieur des cavités de dendrimères lors de la réaction de Heck. Cette nanoréaction permet d'améliorer la stabilité du catalyseur à une température élevée (Yeung *et al.*, 2001). Le Pd est exploité dans divers domaines, en tant que catalyseur lors de la fabrication de nombreuses substances pharmaceutiques (Fiaud *et al.*, 1997). Par exemple lors de la synthèse de structures nucléosiques qui permettront d'accéder aux molécules d'intérêt (Shaughnessy, 2015). Il peut aussi être utilisé afin de dégrader des polluants environnementaux toxiques (Wang JS et Chiu K, 2009 ; Ma X *et al.*, 2019) . Il peut permettre la traçabilité de certains composites dans les systèmes sol-plante (Le TT *et al.*, 2019). Également, il peut être employé comme détecteur de plusieurs analytes (Baccar *et al.*, 2013, Favier *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'imagerie du Pd au sein d'échantillons biologiques est de plus en plus importante en raison de son utilisation en tant que catalyseur (Tracey *et al.*, 2015). De plus, le Pd et les ions Pd<sup>2+</sup> ont un rôle essentiel dans diverses procédures biotechnologiques, notamment l'équipe de Baccar a mis au point un biocapteur à base de différentes tailles de NPs de Pd dans le but de déceler le peroxyde d'hydrogène dans le lait (Baccar *et al.*, 2013). Le Pd a également une activité antimicrobienne importante, dans ce cas plus la NP est petite et plus elle s'est avérée toxique (Adams *et al.*, 2014). Le Pd se retrouve sous la forme bidimensionnelle ultramince, c'est un NM flexible et biocompatible avec des cellules et des tissus (Pan *et al.*, 2015). En effet, les films métalliques ultrafins disposent d'une taille quantique et des particularités de surface qui lui procure des caractéristiques chimiques et physiques

uniques. La synthèse de cette structure particulière est intitulée clusters ou « nanosheets ». Ces caractéristiques optiques remarquables peuvent être employées en imagerie ou lors de thérapie photothermique (Huang *et al.*, 2011). Le Pd a donc un grand équilibre photothermique, et il a été employé afin de détruire les cellules cancéreuses par irradiation (W. Fang *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2011).

### 1.5.3 Toxicologie

Alors que les applications avec du Pd sont de plus en plus nombreuses, il reste de nombreux points à éclaircir quand les métaux sont diminués à l'échelle nanométrique. Il est donc important de caractériser leur potentiel toxique. Fontana et son équipe ont établi qu'une exposition aux NPs de Pd peut provoquer un dysfonctionnement tubulaire des reins conséquent, par contre la filtration glomérulaire n'a pas paru affectée (Fontana *et al.*, 2015). Une autre étude a établi que l'exposition au Pd pouvait altérer la réponse immunitaire chez le rat en provoquant une réaction exacerbée de celle-ci lors de l'administration de forte dose (Iavicoli *et al.*, 2015).

La plus grande partie des connaissances sur l'impact du Pd et ses effets sur le système immunitaire a eu lieu à partir d'études sur les sels de Pd. Néanmoins, pendant les dernières décennies, il y a eu un accroissement significatif des niveaux d'exposition aux NPs de Pd autant dans les domaines professionnels que dans l'environnement dû à ces multiples exploitations, entre autres dans le domaine industriel (convertisseurs catalytiques automobiles), domaine pharmaceutique (catalyseur), et dans le domaine de l'imagerie. Les NPs de Pd peuvent avoir des actions dommageables sur la santé, comme une cytotoxicité variable selon la concentration, une induction de l'apoptose et des altérations dans les mécanismes cellulaires.

Les fonctionnalités de surface du Pd sont modifiables dans le but d'interagir avec les cellules cancéreuses afin de provoquer une cytotoxicité (Pan *et al.*, 2015). Il a été démontré que les complexes de Pd ont une efficacité anticancéreuse significative, de même qu'une toxicité moindre en comparaison à des chimiothérapies appliquées en clinique (Zhang Y *et al.*, 2019 ; Gil YG *et al.*, 2018). Une étude de Antunovic a présenté l'efficacité anticancéreuse de deux nouveaux complexes de Pd sur trois lignées de cellules de leucémie humaine. Une fois encore les résultats ont montré l'activité anticancéreuse des complexes de Pd. Il pourrait donc être

envisagé comme un traitement potentiel contre la leucémie (Antunovic *et al.*, 2015). Les réactions se faisant sur la base de métaux de transition ont été très employées dans la synthèse organique, aujourd'hui ceux-ci comme le Pd peuvent être utilisés pour modifier des biomolécules complexes, menant à de multiples applications de bioconjugaison (Vinogradova *et al.*, 2015).

À l'heure actuelle, nos connaissances sur les effets nocifs potentiellement induits par une exposition au Pd sont peu nombreuses, il nous reste beaucoup à découvrir.

Dans ces circonstances, il est important de réaliser une évaluation la plus complète possible des effets potentiels que les nanoparticules de Pd peuvent avoir sur le système immunitaire. Pour ce faire il paraît essentiel d'entreprendre des recherches afin d'évaluer de façon exhaustive le potentiel immunotoxique des nanoparticules de Pd. Nous avons donc entrepris de déterminer son action dans différents contextes sur les éosinophiles humains.

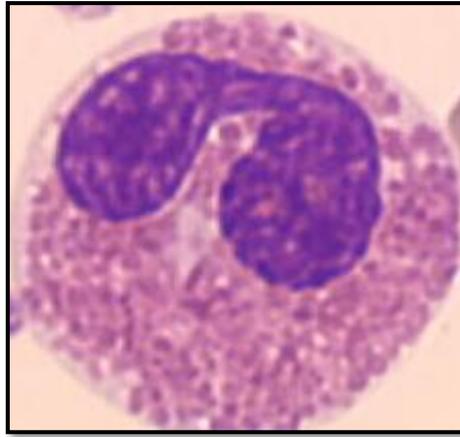
## CHAPITRE 2 : LES ÉOSINOPHILES

### 2.1 Découverte et morphologie

L'éosinophile fait partie de la famille des granulocytes et il est engagé dans diverses maladies inflammatoires telles que les allergies et les infections parasitaires. Suite aux essais de différents colorants sur des frottis de sang provenant de diverses espèces, Paul Ehrlich a observé une cellule qui a retenu son attention. Celle-ci contenait des granules absorbant l'éosine, un des composants du colorant triacide (éosine, fushine et orange G), Ehrlich l'a nommée polynucléaire éosinophile (Fondati *et al.*, 2003). Il a donc créé la coloration de l'éosinophile, teintant ce dernier en rouge orangé, qui se lie spécifiquement aux protéines basiques (P Ehrlich, 1879a, Paul Ehrlich, 1879b). Ce n'est qu'à partir des années 70, que des projets d'études ont été menés sur les personnes touchées d'éosinophilie. Suite à la découverte des éosinophiles, de nombreux progrès ont été faits en ce qui concerne les outils et les méthodes servant à l'isolation et à l'analyse de leurs propriétés, permettant de caractériser les éosinophiles.

Les éosinophiles se retrouvent au sein des tissus. Ils proviennent des cellules progénitrice de la moelle osseuse, plus précisément des cellules souches hémapoïétiques multipotentes de la lignée myéloïde qui appartient à la famille des granulocytes avec les neutrophiles et les basophiles. La taille des éosinophiles peut varier de 6 à 18  $\mu\text{m}$  dépendamment de l'espèce, chez l'homme sa taille est de 8 à 12  $\mu\text{m}$  (Fondati *et al.*, 2003). Il fait partie des leucocytes sanguins, et est constitué d'un noyau bilobé avec un cytoplasme contenant énormément de granules basiques (Figure 2.1). Dans le but de distinguer l'état de maturation des Éos, on peut employer une réaction enzymatique caractéristique à la peroxydase. Au microscope électronique les structures habituelles d'une cellule sont observables, un noyau, une membrane plasmique, le centriole, le REG, l'appareil de Golgi et quelques mitochondries. Également, le glycogène et des granules sont observables et caractérisent l'éosinophile. De plus, l'éosinophile possède un cytosquelette avec plusieurs microfilaments et microtubules qui permettent son déplacement (Peachman *et al.*, 2001, Rothenberg *et al.*, 2006). Le cytoplasme est entre autres occupé par de nombreuses granules ovoïdes ou sphériques qui sont spécifiques

à l'éosinophile, ces dernières ont une morphologie variable selon l'espèce (Wardlaw *et al.*, 1995).



**Figure 2.1 :** Photographie d'un polynucléaire éosinophile humain coloré au May Grünwald Giemsa en microscopie optique.

## 2.2 Les granules

Chez les éosinophiles quatre types de granules ont été distinguées, les granules primaires, secondaires (ou spécifique), les petites granules et les microgranules (Véronique Decot *et al.*, 2006b).

Les granules primaires sont denses et sont conçues à une étape avancée de la différenciation dans la moelle osseuse. Elle renferme de la lysophospholipase, et ne possède pas de noyau, par contre elles se condensent pour élaborer les cristaux de Charcot-Leyden, qui est une protéine hydrophobe (Gleich *et al.*, 1986).

Les granules secondaires ou spécifiques possèdent un gros noyau cristalloïde. Elles sont présentes lorsque les éosinophiles sont matures. Ce sont-elles qui provoquent la coloration à l'éosine grâce à qui l'identification au microscope optique est faisable. Ces granules renferment différentes protéines, la protéine basique majeure (MBP) et la protéine cationique de l'éosinophile (ECP). Elles se situent au sein du noyau cristalloïde et représente 50% et 30% respectivement des protéines spécifiques (Giembycz *et al.*, 1999). Ces granules contiennent dans leur matrice (qui est moins chargé en électron) la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN), la peroxydase de l'éosinophile (EPO), les  $\beta$ -glucuronidases, les collagènes et plusieurs cytokines. L'existence de ces protéines basiques au sein des granules est une particularité qui différencie divers granulocytes des éosinophiles.

Les microgranules font partie du système de transport tubulo-vésiculaire.

Les petits granules proviennent de l'appareil de Golgi et renferment des complexes enzymatiques comme la phosphatase acide et l'aryl sulfatase. Elles ont été observées seulement dans les éosinophiles tissulaires et ne sont pas observables au microscope optique (Véronique Decot *et al.*, 2006b, Kroegel *et al.*, 1994a, Kroegel *et al.*, 1994b).

Ce sont les protéines qui constituent les granules secondaires qui ensemble sont extrêmement cytotoxiques essentiellement contre les parasites, mais également envers divers types cellulaires. C'est cette particularité qui fait qu'ils sont connus comme acteur dans la défense en cas d'infection parasitaire. Les médiateurs contenus dans les granules, EDN, EPO, et MBP interfèrent de diverses manières avec l'environnement. Dans les cas d'asthme, ils provoquent une constriction et une hyper réactivité bronchique. Ils sont aussi neurotoxiques et déclenchent le relâchement de l'histamine auprès des basophiles et des mastocytes (Strek *et al.*, 1997).

### **2.2.1 Les effecteurs des granules**

Petite protéine, constituant 50% des protéines des granules, la MBP bénéficie d'une activité cytotoxique grâce à son potentiel de déstabilisation de l'intégrité cellulaire en perturbant l'équilibre électrostatique de la membrane. Cette activité est à la fois efficace envers les bactéries et les helminthes. Cette protéine serait impliquée dans la physiopathologie de l'asthme (Giembycz *et al.*, 1999). La MBP est aussi impliquée dans la mobilisation des cellules présentatrices d'antigène (CPA). De plus, la MBP induit le relâchement d'héparine par d'autres cellules, ainsi que d'EDN par les éosinophiles (Rothenberg *et al.*, 2006).

L'EPO est aussi une petite protéine qui déclenche la production de bromure (Br) ou de radicaux libres d'oxygène (O). Ces derniers sont oxydants et hautement instables procurant des capacités bactéricide et cytotoxique à cette protéine. De surcroit, les capacités cytotoxiques des différentes protéines sont directement liées à l'activité de l'EPO dans la nitration des tyrosines (Ulrich *et al.*, 2008).

Une autre protéine présente est l'ECP qui a une puissante activité ARNase. Bien que les éosinophiles représentent une faible proportion des cellules sanguines, 80% de l'activité ARNase provient d'eux. Des études ont déterminé la présence de cette protéine chez de nombreuses espèces indiquant qu'elle a été bien conservée durant l'évolution. Cette protéine est élaborée avec différentes conformations, selon le degré de glycolysation celui de la

cytotoxicité de l'ECP va varier (Eriksson *et al.*, 2007). Elle se présente sous deux formes, l'ECP1 qui est localisé dans les granules des éosinophiles. L'ECP2 est relâchée par les éosinophiles préalablement activés.

EDN tout comme ECP dispose de la même propriété ARNase, elles font d'ailleurs partie de la même famille, les ARNase A. Pour une concentration similaire, elle est moins cytotoxique que ces homologues. Par contre chez l'animal, lorsqu'elle est administrée elle a une action neurotoxique et une propriété antivirale avantageuse pour l'hôte (Giembycz *et al.*, 1999, Kroegel *et al.*, 1994b). Les macrophages qui sont stimulés par du TNF- $\alpha$  et du LPS peuvent également exprimer l'EDN. L'EDN est aussi considérée comme faisant partie des médiateurs qui indiquent un message de danger, celui-ci avisera les défenses immunitaires lorsqu'il se produit une infection et des altérations cellulaires (D.Yang *et al.*, 2008). Par l'entremise du TLR2, l'EDN va déclencher et mobiliser les cellules dendritiques menant à l'amplification des défenses immunitaires, notamment celles du lymphocyte TH2 (D. Yang *et al.*, 2008).

### **2.2.2 Mécanismes de dégranulation**

Il existe trois stratégies différentes déterminant comment est déclenchée la dégranulation des éosinophiles. La première est dite de « transport vésiculaire », elle permet le relâchement des protéines des granules grâce à un mécanisme de bourgeonnement. Ce dernier s'effectue sur les vésicules depuis les granules secondaires. Cette méthode de libération se manifeste par un relâchement de la substance granulaire de façon sélective (Hogan *et al.*, 2008, Tomassini *et al.*, 1991).

Le deuxième mécanisme est celui de la cytolyse. Celle-ci s'effectue sur les cellules de façon non apoptotique, elle permet un déversement du contenu cellulaire, soit des granules puis de leurs contenus dans le milieu extracellulaire.

Le dernier mécanisme de dégranulation est celui de l'exocytose. La membrane des granules va fusionner avec la membrane plasmique ce qui va provoquer la relâche des protéines. Il n'est pas précisé qu'un type de mécanisme soit associé à un type de granules en particulier.

### 2.2.3 Les espèces réactives de l'oxygène

Les éosinophiles ont une fonction cytotoxique et pro-inflammatoire, ces caractéristiques sont en partie dues aux molécules dérivées de l'oxygène.

Une fois les éosinophiles activés ils vont relâcher des médiateurs précoces, parmi eux on retrouve des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par l'interaction de divers intermédiaires, les ROS sont produits en grande quantité chez les Éos par rapport aux neutrophiles (Thomas *et al.*, 1995). Tout d'abord le complexe enzymatique NADPH oxydase (NOX) va catalyser la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O<sub>2</sub>). Cette réaction mène au superoxyde qui va réagir pour former le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par l'action du superoxyde dismutase. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut se modifier en oxygène singulet, lorsque qu'il y a du brome et par l'entremise de la peroxydase des éosinophiles (Thomas *et al.*, 1995).

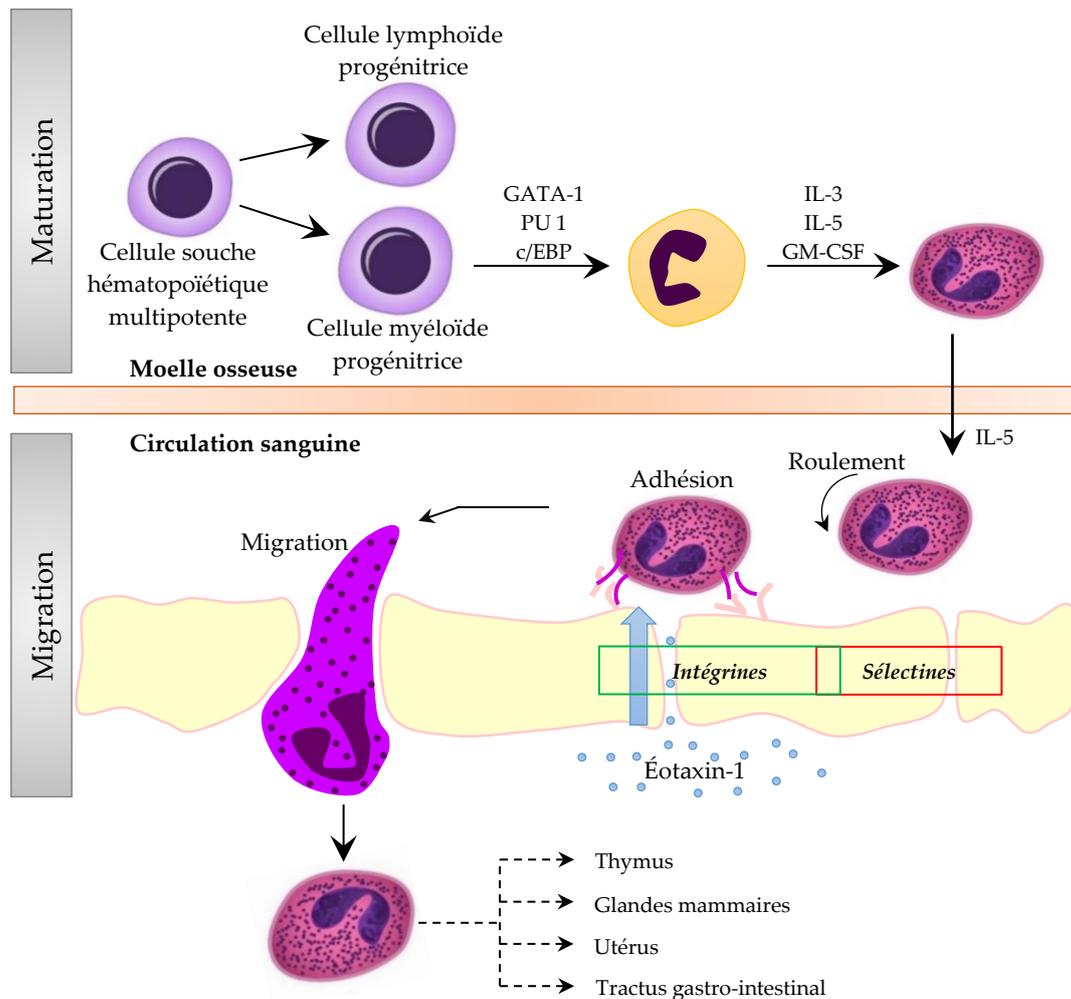
### 2.3 Ontogénie et localisation

C'est dans la moelle osseuse et à partir d'un « progéniteur » hématopoïétique exposant le CD34 que se forment et mûrissent les éosinophiles. Les cytokines IL-3, IL-5 et GM-CSF vont permettre dans un premier temps la formation d'une cellule multipotente puis dans un deuxième temps un précurseur hybride, ce sont ces derniers qui vont être la source des basophiles et des éosinophiles (Rothenberg *et al.*, 2006). L'IL-5 est notamment responsable de la différenciation des éosinophiles ainsi que de leur libération de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Afin de réaliser les stades de différenciation, il faut quatre jours chez l'être humain pour obtenir l'éosinophile mature, pour être ensuite stocké dans la moelle osseuse, dans un compartiment dit de stockage médullaire. Pendant la maturation des éosinophiles il y a trois facteurs de transcription qui vont intervenir, C/EBP  $\alpha/\epsilon$ , GATA-1 et PU 1 (Figure 2.3). Les éosinophiles vont migrer de leur emplacement d'origine pour rejoindre les sources inflammatoires.

Le taux d'éosinophiles tissulaire est largement supérieur à celui des éosinophiles circulants. La moelle osseuse renferme une accumulation d'éosinophiles aussi importante que dans les tissus (Kato *et al.*, 1998). Chez les personnes en bonne santé, les éosinophiles constituent 1 à 3% des cellules sanguines. Dans le sang, leur demi-vie est courte, elle ne va pas au-delà de dix-huit heures. C'est pour cette raison qu'il y a certaines contraintes à l'acquisition et la

purification de ceux-ci. On retrouve les éosinophiles matures dans plusieurs tissus où ils sont en mesure de survivre quelques semaines (Rothenberg *et al.*, 1987). Notamment au niveau du tractus uro-génital, gastro-intestinal et pulmonaire, ainsi que dans les organes lymphatiques et hématopoïétiques en particulier le thymus. Également, on les retrouve au niveau des glandes mammaires et de l'utérus lors d'une grossesse (Kato *et al.*, 2001, Rothenberg *et al.*, 2001). Plusieurs études émettent l'hypothèse que les éosinophiles présents pendant la grossesse ont un rôle important en ce qui concerne la tolérance du système immunitaire de la mère par rapport au fœtus (Valérie Gouon-Evans *et al.*, 2001b, Matsumoto *et al.*, 2003).

Depuis plusieurs années, l'éosinophile est également connu pour être impliqué dans les pathologies asthmatiques. En effet, les personnes souffrant d'asthme, manifeste de l'hyperéosinophilie, 10 à 15% des éosinophiles circulants sont présents en comparaison de 2 à 5% chez les personnes saines. L'infiltration des éosinophiles activés a lieu au niveau de la muqueuse bronchique (Bousquet *et al.*, 1994). De surcroît, des études ont établi que la gravité de la pathologie est corrélée avec l'éosinophilie et que l'on retrouve des granules hypodenses indiquant l'activation des cellules chez les asthmatiques (Bousquet *et al.*, 1994).



**Figure 2.3 :** Représentation schématique de la maturation et du recrutement tissulaire des éosinophiles (inspiré de (Driss V., 2008)).

## 2.4 Recrutement des éosinophiles

Comme cité précédemment, l'éosinophile provient d'une cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse. Une fois que les éosinophiles ont été différenciés et libérés de la moelle osseuse vers la circulation sanguine sous l'action de l'IL-5, ils vont pouvoir migrer du sang vers les tissus en exposant à leurs surfaces des molécules d'adhésion. Ces molécules sont classées en deux groupes, les intégrines et les sélectines.

Les intégrines sont des hétérodimères constitués d'une chaîne  $\alpha$  et  $\beta$ . Les ligands des intégrines sont des récepteurs de la famille des immunoglobulines, la liaison qui s'établit va avoir une attraction plus forte que lors de la liaison ligand-sélectine (Bochner *et al.*, 1991). Cette liaison va consolider l'adhésion de la cellule à l'épithélium. Les éosinophiles exposent les intégrines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 7$ . Les  $\beta 1$  sont essentiellement VLA-2, 4, 5 et 6 ou respectivement CD49b, d, e, f. VLA-

4 a comme ligand VCAM-1 et VLA-6 à la laminine comme ligand (Bochner *et al.*, 1991). Les chimiokines sont une catégorie particulière de cytokines qui ont une activité chimiotactique et qui permettent de recruter des cellules spécifiques. Des chimioattractants tels que MCP-3 et RANTES (Regulated Upon Activation in Normal T cells Expressed and Secreted) fortifient les liaisons entre VLA-4 et ses ligands. En présence des intégrines  $\beta 2$ , les éosinophiles vont notamment exprimer CD11a, b et c combinés au CD18. Le ligand de CD11a et b est ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule) alors que le fibrinogène est le ligand de CD11c (Hartnell *et al.*, 1990). L'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , est exprimée chez les lymphocytes ainsi que chez les éosinophiles, elle est essentielle en ce qui concerne le recrutement des éosinophiles dans le système gastro-intestinal. Les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  sont majoritairement engagées dans le recrutement des éosinophiles au niveau de la peau et des poumons (Mishra *et al.*, 2002).

Quant à elles, les sélectines sont engagées dans la phase de roulement de l'éosinophile sur l'endothélium vasculaire (Figure 2.3). Les éosinophiles collaborent avec la P-sélectine de l'endothélium, ils expriment la L-sélectine qui favorise l'interaction avec les molécules CD34, Glycam-1 et Madcam-1 qui se situe sur les cellules endothéliales (Costa *et al.*, 2009, Johansson *et al.*, 2011).

Le CD15 est aussi impliqué dans la fonction de roulement des éosinophiles sur l'endothélium, puisque son rôle est d'aider les éosinophiles à identifier les sélectines présentes, cette molécule est particulièrement exposée par les éosinophiles normodenses (Sato *et al.*, 1994).

Ainsi ces différentes molécules favorisent le déplacement, l'adhésion et la traversée de l'endothélium par les éosinophiles.

#### **2.4.1 Recrutement des éosinophiles en période d'homéostasie**

Suite à un court passage dans le sang, les éosinophiles vont être mobilisés dans les tissus par l'action de l'éotaxine-1 (CCL11) qui est notamment émise par les cellules épithéliales (Figure 2.3). Cette chimiokine est également exprimée par d'autres types de cellules telles que l'endothélium vasculaire, les éosinophiles, les fibres musculaires, les macrophages alvéolaires et les mastocytes. L'éotaxine entraîne l'initialisation de CCR3 son récepteur qui est émis par les basophiles, les éosinophiles, les lymphocytes TH2 et les mastocytes. À l'intérieur du thymus, la mobilisation des éosinophiles est contrôlée par l'éotaxine -1, cette dernière est exprimée de façon constitutive dans le thymus (Shaw *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2000). Au sein

de l'utérus, l'IL-5 contrôle le recrutement des éosinophiles. Par contre, parmi les souris déplétées en IL-5, il a été observé des proportions restantes d'éosinophiles ce qui permet de penser qu'il y a un processus de recrutement qui ne passe pas par l'IL-5. Effectivement, des études ont démontré une élévation de l'expression des molécules suivantes, les RANTES, MIPI- $\alpha$  et l'éotaxine-2 corrélé au recrutement des éosinophiles (V. Gouon-Evans *et al.*, 2001a, Robertson *et al.*, 2000).

#### **2.4.2 Recrutement des éosinophiles en situation inflammatoire**

Le recrutement puis la pénétration des éosinophiles sont précoces (Daugherty *et al.*, 1996). Ce phénomène peut être expliqué par la spécificité des éosinophiles à réagir aux facteurs précoces de l'inflammation, et aussi par leurs caractéristiques d'infiltration des tissus. En effet, les éosinophiles tissulaires sont 200 fois plus nombreux que les éosinophiles sanguins. L'infiltration des éosinophiles dans les tissus où est localisée l'inflammation se fait sous l'intervention de chimiokines et de cytokines. Les éosinophiles expriment CCR1, 2, et 3, ainsi que CXCR3 qui sont les principaux récepteurs de chimiokines. Avec l'influence de l'éotaxine (CCL11), de MCP-4 (CCL13) et de RANTES (CCL5), l'expression de CCR3 incite le déplacement des éosinophiles (Daugherty *et al.*, 1996, Rothenberg *et al.*, 2006). Les récepteurs de chimiokines CCR5, 6, 8 et CXCR4 vont être exprimés par les éosinophiles suite à la stimulation par l'IL-5. Il a également été constaté que les éosinophiles peuvent contribuer à leur propre recrutement en relâchant des chimiokines tels que l'IL-8, CCL5, CCL11, MIPI- $\alpha$  et MCP-1 (Jacobsen *et al.*, 2007). De plus, les éosinophiles affichent d'autres récepteurs qui eux aussi participent comme le facteur activateur des plaquettes (PAF), l'histamine, les leucotriènes B4, D4 et E4, la prostaglandine D2 et les protéines du complément (C3a et C5a) qui ont une fonction chimiotactique pour nos cellules (V. Decot *et al.*, 2006a, Hogan *et al.*, 2008).

#### **2.5 L'éosinophile une cellule aux multiples capacités**

Les nombreux récepteurs des éosinophiles leur confèrent un statut essentiel au cœur de la réponse immunitaire. Ainsi, les éosinophiles pré-activer et recruter vont pouvoir exprimer des récepteurs de surface différents et accroître l'affinité ou la quantité des récepteurs déjà présents. Selon les divers signaux de l'environnement, ils seront en mesure de pénétrer les

tissus grâce au mécanisme de diapédèse, ensuite ils pourront interférer au site de l'inflammation tissulaire. En plus d'exprimer les récepteurs pour les chimiokines ainsi que les médiateurs lipidiques, les éosinophiles expriment également des récepteurs du complément, comme CR1 et CR3 qui une fois activés vont déclencher la dégranulation (E. Fischer *et al.*, 1986). De surcroît, ces polynucléaires sont capables d'exprimer une lectine qui peut se lier aux IgE, cette action va engendrer une cytotoxicité profitable contre les parasites (E. Fischer *et al.*, 1986, Truong *et al.*, 1993). Le Formyl Peptide Receptor (FPR) est exposé par les éosinophiles, celui-ci va s'associer avec une molécule (N-formyl-Met-Leu-Phe) émise par les bactéries et aussi certains allergènes qui représente un signal de danger (Svensson *et al.*, 2007, Svensson *et al.*, 2005).

Les éosinophiles expriment aussi des récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines IgA, IgE et IgG. Ces derniers contribuent à l'activation des cellules et à leur dégranulation. Les éosinophiles collaborent à la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. Les éosinophiles expriment en surface des molécules qui leurs permettent d'interagir avec les lymphocytes T, comme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) notamment HLA-DR (Human Leucocyte Antigen) (H.Z.Shi, 2004). Les molécules de costimulation que l'on observe chez les lymphocytes, ou les cellules présentant l'antigène tel que CD4, 25, 28, et 86 sont également exprimées par les éosinophiles (H. Z. Shi, 2004, Woerly *et al.*, 2004).

### 2.5.1 Chimiokines et cytokines

L'éosinophile est en mesure de générer et d'emmagasiner une quantité importante de cytokines et de divers médiateurs, présentés dans le tableau 2.5.1. Dans des circonstances particulières, l'éosinophile produisant diverses cytokines possède une activité immunorégulatrice de manière ciblée au sein des tissus. Afin de relâcher des cytokines, il requiert des stimuli spécifiques et se caractérise par des mécanismes complexes. Lorsque les éosinophiles quittent la moelle osseuse suite à leur développement, on estime qu'ils sont à l'étape finale de leur différenciation. En effet, quand il est mature il n'est pas en mesure d'effectuer la division cellulaire (Véronique Decot *et al.*, 2006b). Les éosinophiles peuvent fixer un certain nombre de cytokine, des récepteurs pour certaines IL sont présents à leurs surfaces comme pour l'IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-15 et le GM-CSF. Ils exposent des récepteurs pour les interférons, en particulier pour l'INF  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Et ils présentent également

des récepteurs au « Transforming Growth Factor »(TGF) et au « Tumor Necrosis Factor »(TNF) (Hogan *et al.*, 2008).

**Tableau 2.5.1 : Chimiokines, cytokines, facteurs de croissance et protéines d'adhésion membranaire chez l'éosinophile.**

Chimiokines	Cytokines	Facteurs de croissances	Protéines d'adhésion membranaire
Éotaxine	GM-CSF	HB-EGF	$\alpha 4\beta 7$
IL-8	IL-1 $\alpha$	NGF- $\beta$	ICAM-1 et 3
MIF-1 $\alpha$	IL-2, 3, 4, 5, 6, 7	PDGF	Intégrines $\beta 1$
RANTES	IL-9, 10, 11, 12	SCF	Intégrines $\beta 2$
	IL-13, 15, 16, 17	TGF- $\alpha$	Glycoconjugués
	INF $\alpha, \beta, \gamma$	TGF- $\beta 1$	L-sélectine
	LIF	VEGF	PECAM-1
	TNF		

Suite à leurs activations les éosinophiles sont en mesure de relâcher rapidement les cytokines nécessaires puisque celles-ci sont emmagasinées à l'intérieur des vésicules et/ou des granules des cellules. Cette faculté à stocker les cytokines est liée à une activité de transcription très faible par rapport aux différentes cellules immunitaires comme par exemple, les lymphocytes. Certaines cytokines vont être stockées au niveau du core central des granules cristalloïdes comme l'IL-2, IL-4 et IL-13, alors que d'autres comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 seront renfermés au niveau de la bicouche lipidique des granules (Hogan *et al.*, 2008, Lacy *et al.*, 1998). Grâce à leur sécrétion les éosinophiles possèdent une fonction régulatrice et effectrice, notamment dans l'orientation de la réponse immune dépendamment des cytokines produites, soit de type 1 tel que l'IL-2, IL-12 et l'INF  $\gamma$  ou de type 2 comme l'IL-4, IL-5, et IL-10 (Rothenberg *et al.*, 2006). L'IL-3, IL-5 et le GM-CSF sont des facteurs de croissance et d'activation dans la différenciation des éosinophiles et pour leur participation dans la régulation de l'activité de ces derniers. Aussi, les éosinophiles possèdent des caractéristiques pro-inflammatoires grâce à l'IL-6 et au TNF- $\alpha$  (Strek *et al.*, 1997).

L'IL5 est reconnue comme la plus importante en raison des différents rôles qu'elle joue. L'IL5 est essentielle à l'éosinophilie ainsi qu'à la maturation de l'éosinophile. De plus elle a une grande importance dans la survie des éosinophiles, puisqu'elle permet d'empêcher le phénomène d'apoptose. L'IL5 est aussi connu sous le nom de facteur de survie de l'éosinophile, en effet, en son absence dans une culture "*in vitro*" les éosinophiles seront en

quelques heures tous en apoptose. Par contre, en sa présence, dans une culture "*in vitro*" les cellules peuvent rester viables jusqu'à deux semaines (Tai *et al.*, 1991, Yamaguchi *et al.*, 1988). Une autre cytokine ayant un rôle important dans la pathologie de l'asthme est l'IL9, qui collabore au recrutement des éosinophiles et à leurs proliférations (Soussi-Gounni *et al.*, 2001). L'IL9 engendre un accroissement des éosinophiles et une hyperactivité au niveau des bronches, et de la formation de mucus. En présence d'IL-9 ainsi que d'IL-3 et d'IL-5, il va y avoir une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-5 parmi les cellules CD34<sup>+</sup> contribuant à la maturation et la prolifération des cellules souches des éosinophiles (Louahed *et al.*, 2001).

L'éosinophile est associé aux pathologies allergiques, qui sont liées à l'élaboration de cytokines du type TH2 telles que l'IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 et l'IL-17 (Hellings *et al.*, 2003, Yamamoto *et al.*, 1997). Deux autres cytokines qui participent à la régulation de l'éosinophile, mais qui sont du type TH1 sont l'INF $\gamma$  et l'IL-2. Donc, les éosinophiles sont à même de relâcher de façon sélective des cytokines de type TH1, TH2 ou immunorégulatrice selon le contexte, ce qui leur permet de collaborer à l'adaptation de la réponse immune.

L'INF $\gamma$  comme l'IL-5, est capable d'activer et de maintenir en vie les cellules en culture en retardant l'apoptose. L'INF $\gamma$  peut stimuler l'élaboration de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et incite à la surface des éosinophiles l'expression des récepteurs des IgG (CD16 et CD32) (Valerius *et al.*, 1990).

L'IL-2 dynamise la relâche d'EPO et l'élaboration d'IL-6 par l'éosinophile (Hoenstein *et al.*, 2001). L'IL-2 induit une éosinophilie sanguine quand il est prescrit en tant que thérapie anti-cancer. Ce phénomène est dû à la sollicitation des lymphocytes T par l'IL-2 provoquant une production accrue d'IL-5 (Van Haelst Pisani *et al.*, 1991).

L'éotaxine est une chimiokine qui a une implication majeure dans la biologie de l'éosinophile, dans les cas d'effet inflammatoire, elle entraîne le recrutement spécifique des éosinophiles (Conroy *et al.*, 2001, Ferland *et al.*, 2001).

### **2.5.2 Présence des éosinophiles dans les pathologies**

L'éosinophilie sanguine est évoquée quand le nombre d'éosinophiles présent dans la circulation sanguine est au-dessus de 500 par microlitre ( $\mu$ l) de sang. Les éosinophilies les plus connues comprennent les parasitoses et les allergies (Kovalszki *et al.*, 2016). Les éosinophiles

sécrètent de nombreuses cytokines qui leurs permettent de collaborer à l'activation des cellules structurales, à la mobilisation de diverses cellules inflammatoires et également à assurer leurs survies (Rothenberg *et al.*, 2006).

Les éosinophiles sont impliqués dans de nombreuses maladies, mais aussi dans divers types de cancers, notamment dans les cancers de l'œsophage, des poumons, colorectale, de la bouche et de l'utérus. Les tumeurs sont infiltrées par les éosinophiles. Leur présence dans ces différents sites peut être favorable ou non (Dorta *et al.*, 2002, Takanami *et al.*, 2002, van Driel *et al.*, 1999). Le rôle et les mécanismes que les éosinophiles entretiennent en cas de cancer restent encore à déterminer. Plusieurs maladies sont caractérisées par une hyperéosinophilie sanguine et tissulaire. Les plus rencontrées sont des maladies inflammatoires allergiques, telles que l'asthme, l'eczéma et la rhinite allergique (Riegert-Johnson *et al.*, 2002, Tanigawa *et al.*, 1999). Il y a une forte hyperéosinophilie dans le cas de pathologie inflammatoire intestinale (maladie de Crohn, colite et gastrite ulcéreuse) ainsi que bien d'autres comme l'endométriose, la pneumonie à éosinophile et les problèmes parasitaires qui en plus de l'infiltration des éosinophiles ont comme particularité un dépôt de protéine basique (Blumenthal *et al.*, 2000, Levy *et al.*, 1997).

### 2.5.3 Capacités immunorégulatrices

Les éosinophiles sont connus pour leurs capacités cytotoxiques et pro-inflammatoires, néanmoins, de nos jours avec les avancées dans le domaine de la recherche, permettent de reconnaître la fonction immunorégulatrice que possèdent les éosinophiles. Ils sont en mesure grâce à la gestion de médiateurs d'avoir non seulement une incidence sur eux même, mais également sur divers genres cellulaires (Jacobsen *et al.*, 2007). Les éosinophiles sont capables d'influencer leur mobilisation et leurs fonctions effectrices avec le relâchement de multiples médiateurs tels que l'éotaxine, l'IL-5 et le GM-CSF. Grâce à l'expression de certaines chimiokines, ils contribuent à la mobilisation des lymphocytes (Gutierrez-Ramos *et al.*, 2000). Les éosinophiles peuvent exprimer le CMH de classe 2 chez l'être humain et également des récepteurs de costimulation comme CD28, 40, 80 et 86 (H. Z. Shi, 2004). Ils peuvent donc être en mesure de provoquer la multiplication de cellules T spécifique au CMH 2 *in vitro* (Jacobsen *et al.*, 2007). Dernièrement, diverses études portant sur le parasite *Strongyloides stercoralis* ont démontré l'aptitude des éosinophiles à exposer l'antigène aux cellules T naïves dans un essai

sur les souris (Padigel *et al.*, 2007). Donc il est envisagé que l'implication des éosinophiles à présenter des antigènes les classent parmi les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Finalement, ils sont aussi en mesure d'influer la réaction immunitaire adaptative grâce à l'élaboration d'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) qui va orienter la réponse en privilégiant la multiplication des lymphocytes T TH2 (Odemuyiwa *et al.*, 2004).

## CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 3.1 Mesure de la taille et du potentiel zêta

La charge de surface (potentiel zêta) et la répartition de la taille du Pd ont été déterminées par DLS (Diffusion dynamique de la lumière). La diffusion de la lumière se mesure avec un Zetasizer Nano-ZS Malvern (modèle ZEN3600 de Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Les mesures ont été réalisées sur la solution stock de Pd (1.5mg) et à 50 et 100 µg/ml de Pd dans du RPMI-1640 avec HEPES et Pen/Strep + 10% de sérum humain inactivé par la chaleur (Babin *et al.*, 2013, Poirier *et al.*, 2016).

### 3.2 Réactifs

Le GM-CSF a été acheté chez Pepro Tech Inc. (Rocky Hill, NJ). La lectine de plante *Viscum album* Agglutinine I (VAA), l'AM-Calcéine, la fibronectine de plasma humain, l'éotaxine humaine (CCL11), la sonde H<sub>2</sub>DCFDA, le bleu de trypan et le dextran proviennent de chez Sigma Aldrich Ltd. (St-Louis, MO). Le Ficoll-Hypaque a été acheté chez GE Healthcare (Uppsala, SE). Le RPMI-1640 et l'HEPES viennent de chez Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Lorsqu'ils ne sont pas spécifiés, les autres réactifs proviennent de chez Sigma Aldrich Ltd. (St-Louis, MO)

### 3.3 Nanoparticules

Le Pd a été acheté chez Sigma Aldrich Ltd. (St-Louis, MO), les PAMAM proviennent de chez Dendritech, Inc. (Midland, MI). Les concentrations utilisées lors des expériences sont de 100 et 500µg/ml, elles ont été déterminées après des tests préliminaires. De plus, il a été démontré dans de nombreuses études qu'à ces concentrations des effets sur les cellules sont observables (Babin *et al.*, 2013, Goncalves *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2016). Pour faciliter l'écriture, nous allons abréger certains termes, notamment en ce qui concerne les concentrations et les générations de dendrimères employés. Par exemple, pour la génération 1 à 500 µg/ml nous allons écrire simplement G1 500.

### 3.4 Isolation et incubation des éosinophiles

Les éosinophiles sont isolés à partir du sang veineux de donneurs sains volontaires. Les dons de sang ont été obtenus auprès de personnes informées et consentantes selon les procédures approuvées par l'institution. Après centrifugation et sédimentation par le dextran pour séparer les globules rouges, le gradient de Ficoll obtenu permet d'enlever les PBMC (Cellules Mononucléaires Périphériques Sanguines). Ensuite, nous avons réalisé une lyse des érythrocytes en effectuant un choc osmotique avec de l'eau déminéralisée et distillée. Après centrifugation, nous avons obtenu un culot de granulocytes. Les Éos étant CD16 négatif, nous faisons une sélection négative avec des billes magnétiques et une colonne (MidiMACS, Miltenyi Biotec) comme décrit précédemment (Pelletier *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2016). Après isolement, les éosinophiles sont mis en culture à 500 000 cellules/ml avec les NPs dendrimères des générations 0 à 3 à des concentrations de 100 et 500 µg/ml, ou avec les NPs Pd à des concentrations de 100 et 500 µg/ml (sauf pour la viabilité ou un plus grand nombre de concentrations a été évaluées). Les temps d'incubation peuvent varier de 30 minutes à 48 heures selon les fonctions étudiées.

### 3.5 Viabilité cellulaire et cytologie

La viabilité cellulaire a été contrôlée par l'exclusion du bleu de trypan et était toujours supérieure à 98%. La pureté de la suspension de cellules a été examinée (elle aussi à environ 98%) par cytologie après cyto-centrifugation et coloration avec le kit « hema3stain » (Fisher Scientific). La morphologie cellulaire a été étudiée après 2, 12, et 24 heures (h) et nous avons identifié trois principaux phénotypes : viables, apoptotiques et des cellules « fantômes ». Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les PAMAM G0 à G3, la VAA (50 µg/ml), ou l'HBSS. Les pourcentages de chacun des phénotypes ont été déterminés après cyto-centrifugation puis colorés avec le kit hema-3-stain. Les changements morphologiques des éosinophiles ont été observés sous microscopie optique (400X), et des photomicrographies ont été prises à l'aide d'une caméra Nikon Eclipse TS100.

### 3.6 Évaluation de l'apoptose des éosinophiles

L'apoptose a été déterminée par cytologie, comme précédemment publiée (Goncalves *et al.*, 2010, Poirier *et al.*, 2016). La cytométrie en flux nous permet de déterminer l'apoptose des cellules suite à un marquage à l'annexine V/PI (Iodure de Propidium). Les éosinophiles ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) ont été incubés dans des plaques à 48 puits dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant des temps et des concentrations variables selon la NP utilisée, en présence de tampon (Ctrl), et la lectine de la plante pro-apoptotique VAA-I (1 µg/ml). Les cellules sont ensuite lavées, marquées et incubées à l'obscurité sur glace. L'analyse des cellules par marqueur fluorescent se fait par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) (BD Biosciences).

### 3.7 Adhésion cellulaire

À partir d'éosinophiles fraîchement isolés, nous avons réalisé un marquage avec l'AM Calcéine et ils ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les NPs Pd à 100 et 500 µg/ml ou avec les PAMAM de G0 à G3 à 100 et 500 µg/ml, le GM-CSF (65 ng/ml), ou le volume équivalent d'HBSS. Puis ils ont été déposés sur lamelle recouverte de cellules épithéliales hybrides EA-hy296 pendant 30 minutes. Ces dernières proviennent de chez ATCC. Le nombre de cellules a été évalué après observation au microscope à fluorescence et des photomicrographies ont été prises à l'aide d'une caméra Nikon Eclipse TS100.

### 3.8 Chimiotactisme

Pour déterminer le chimiotactisme chez les éosinophiles, nous avons utilisé une chambre de Boyden. Elle est constituée de deux compartiments séparés par un filtre dont les pores de 5µm de diamètre laissent passer les cellules. Le compartiment inférieur contient la substance chimiotactique et le compartiment supérieur la suspension d'éosinophiles. Après l'obtention des éosinophiles tout juste isolés, ils sont incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les PAMAM de G0 à G3 ou le Pd à 100 et 500 µg/ml, l'éotaxine humaine (EH 100 ng/ml), ou l'HBSS. Ensuite, ils sont déposés sur une membrane poreuse (5µm) pendant 1 heure. Le nombre de cellules ayant migré a été déterminé après coloration avec le kit Hema-3-stain et comptabilisé au microscope

optique (400X), et des photomicrographies ont été prises à l'aide d'une caméra Nikon Eclipse TS100.

### **3.9 Les ROS**

Dans le but de vérifier la fonction au réactif oxygéné (la production de ROS) nos cellules fraîchement isolées ont été incubées ( $0,5 \times 10^6$  cellules/mL) avec la sonde  $H_2CFDA$  ( $10 \mu M$ ), le PMA ( $0,1 \mu M$ ), ou le volume équivalent d'HBSS. Après quelques lavages, les NPs Pd à 100 et 500  $\mu g/ml$  ou les PAMAM G0 à G3 à 100  $\mu g/ml$  puis placé immédiatement sur glace. Ensuite, les mesures ont été prises à différentes périodes de temps indiquées dans les figures. Nous avons utilisé cette sonde qui devient fluorescente en contact avec les réactifs oxygénés. La lecture se fait au FACS.

### **3.10 Analyses statistiques**

Les données sont rapportées en moyenne  $\pm$  MES (Erreur Standard Moyenne, soit l'erreur type). Les données ont été analysées par ANOVA à sens unique ou double dans certaines expériences et les écarts de chacun des groupes ont été déterminés par rapport aux groupes de contrôles avec un « post-test » de Dunnett avec le logiciel GraphPad Prism version 5.00 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La signification statistique a été déterminée à  $p < 0,05$  et chaque expérience a été reproduite et validée au minimum 3 fois.

## CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

### 4.1 Caractérisation du Pd

Puisque le milieu RPMI a été employé dans toutes les expérimentations réalisées lors de cette étude, le potentiel zêta, la taille et l'index de polydispersion (PDI) des molécules de Pd ont été faits dans ce milieu. Comme nous pouvons le voir dans le tableau 4.1, les résultats ont démontré une répartition de la taille bimodale ou trimodale aux concentrations de 50 et 100µg/ml respectivement. De grands agrégats ont été perçus aux deux concentrations testées (300.5 nm 34.3%, 532.3 nm 55.1%). Cet essai a été réalisé dans du RPMI-1640 Hepes/PenStrep qui est utilisé dans l'ensemble de nos expériences.

**Tableau 4.1 : Caractérisation du palladium.**

*Palladium + RPMI*

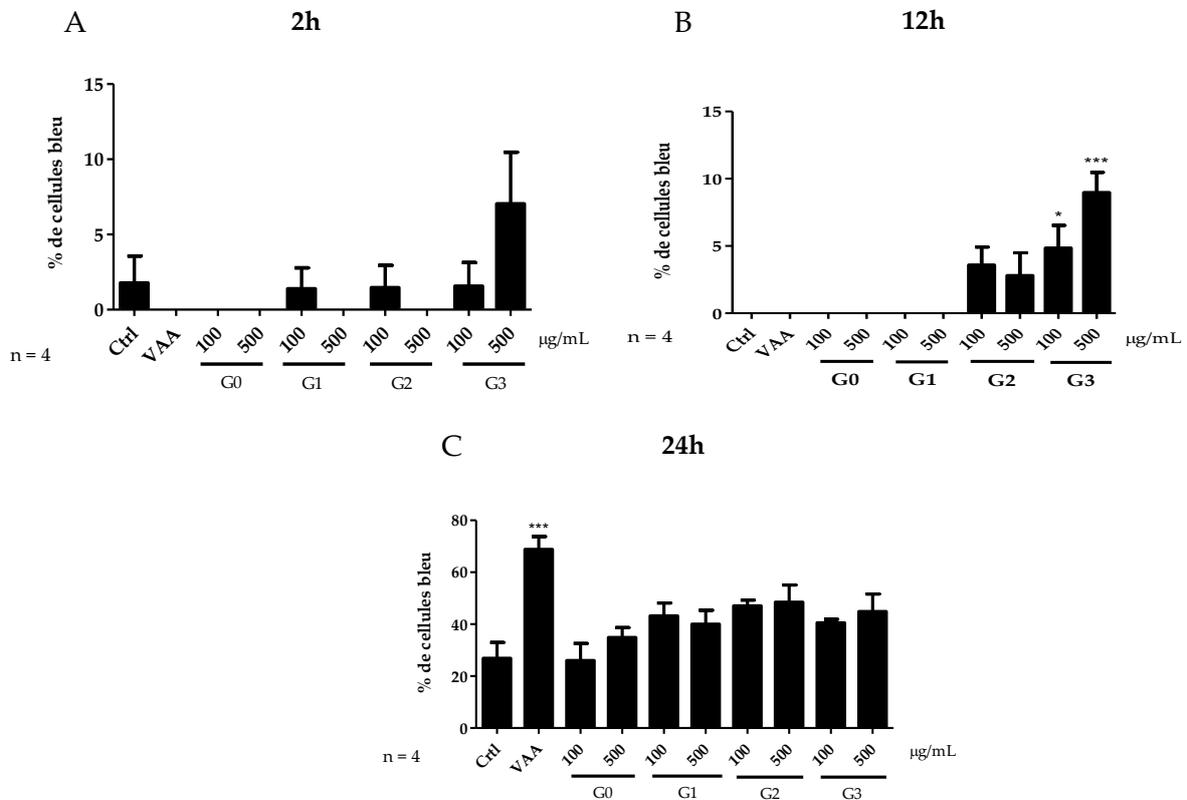
	50 µg/ml			100 µg/ml		
<i>Taille (nm)</i>	27.94	65.7%	± 2.6	532.3	55.1%	± 0.6
	300.5	34.3%	± 2.6	42.68	28.2%	± 3.1
				10.25	15.4%	± 4.1
<i>PDI</i>	0.605		± 0.005	1.0		± 0.0
<i>Zeta (mV)</i>	- 9.14		± 1.43	- 9.96		± 0.158

Après avoir mis le Pd aux concentrations de 50 et 100 µg/ml avec le RPMI-1640 Hepes/PenStrep nous avons effectué l'analyse avec un Zetasizer Nano-ZS Malvern.

### 4.2 Effet des dendrimères PAMAM sur la viabilité des éosinophiles humains

Les conditions expérimentales ont été reproduites pour 3 temps d'incubation, 2, 12 et 24 heures. Lorsqu'une cellule est normale et donc que sa membrane est intacte, le colorant ne peut pas pénétrer la cellule, ce qui nous permet de faire une discrimination entre deux états, vivante ou morte. Pour chacun des temps le pourcentage (%) de cellules bleues a été déterminé. On observe qu'après 2 et 12 heures d'incubation le % de cellules viables est élevé, supérieure à 90 %. On constate qu'après 2 heures en présence des PAMAM à 500 µg/ml il y a moins de 10 % de nécrose cellulaire, les cellules ont éclatées et libérées leurs contenues. À 12 heures, on peut observer une légère augmentation du pourcentage de cellule bleu en présence de G2 et particulièrement pour G3, même si pour ce dernier le résultat est significatif, il reste

inférieur à 10 %. À 24 heures, le nombre de cellules bleues ne dépasse pas les 50 % et on peut constater qu'aucune des quatre générations a un effet plus marqué.

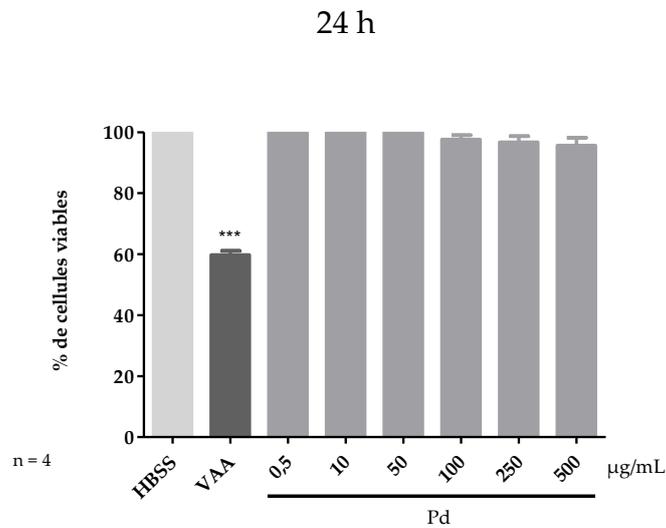


**Figure 4.2 :** Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM de G0 à G3 sur la viabilité des éosinophiles humains à des temps d'incubation différents.

Les éosinophiles ont été incubés à  $0,5 \times 10^6$  cellules/mL, avec les PAMAM aux concentrations de 100 et 500 µg/ml de G0 à G3, de la lectine de plante *Viscum album* Agglutinine I (VAA) à 1 µg/ml ou le volume équivalent de diluant (HBSS) pendant 2h (A), 12h (B) et 24h (C), puis la viabilité des cellules a été déterminée par un test d'exclusion au colorant bleu de trypan puis observé au microscope optique.

### 4.3 Effet du Pd sur la viabilité des éosinophiles humains

De la même façon que pour les dendrimères, nous avons établi le pourcentage de cellules viables. Nous avons dans cette expérience testée un grand nombre de concentrations afin de pouvoir établir l'effet qu'elles peuvent induire sur les éosinophiles. On peut observer qu'après 24 heures, le Pd n'a eu aucun impact sur les éosinophiles humains. Sans que ceci soit significatif, on a pu observer une légère diminution de la viabilité en présence des plus fortes concentrations, à partir de 100 µg/ml jusqu'à 500 µg/ml.



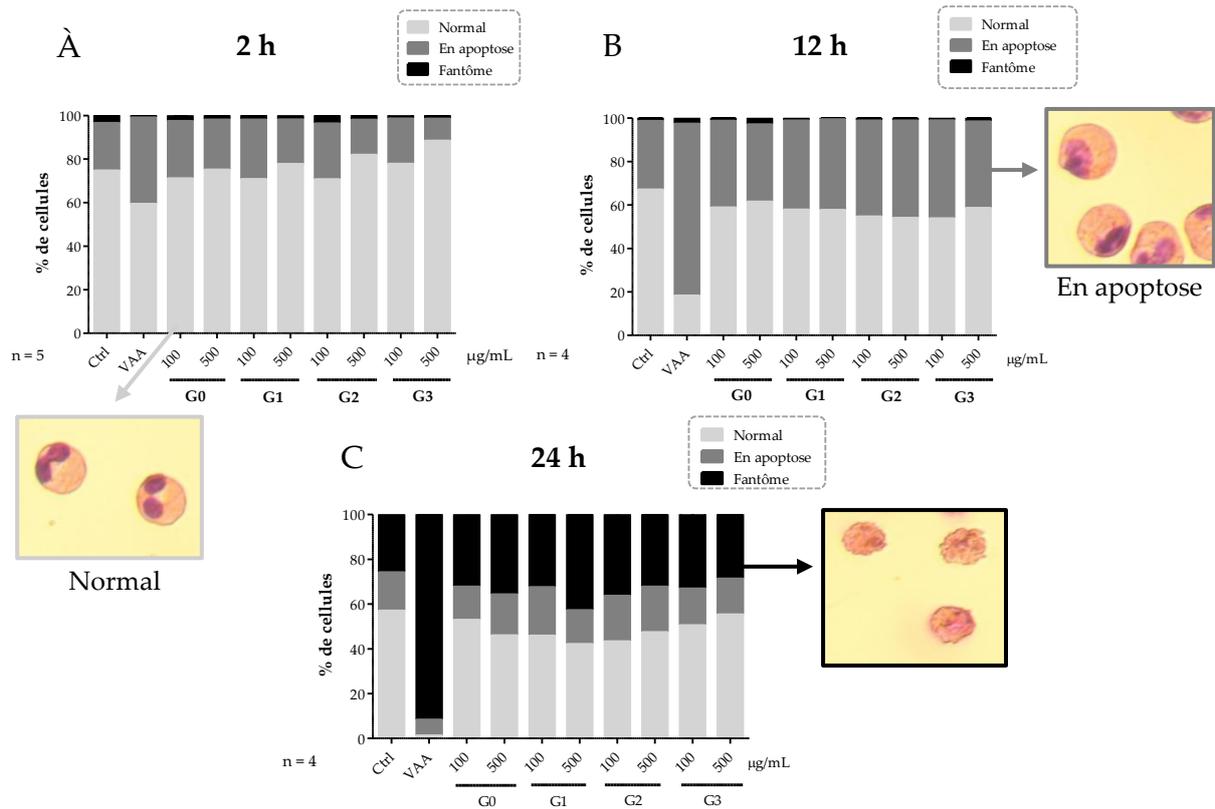
**Figure 4.3 :** Détermination de l'effet du Pd à différentes concentrations sur les éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés à  $0,5 \times 10^6$  cellules/ml, avec le Pd aux concentrations de 0,5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml, de la lectine de plante *Viscum album* Agglutinine I (VAA) à 1 µg/ml ou le volume équivalent de diluant (HBSS) pendant 24h, puis la viabilité des cellules a été déterminée par un test d'exclusion au colorant bleu de trypan puis observé au microscope optique.

#### **4.4 Effet des dendrimères PAMAM sur la morphologie cellulaire des Éos humains**

Nous avons effectué l'observation de la morphologie cellulaire à trois temps d'incubation différents, soit à 2, 12 et 24 heures. Nous avons identifié trois principaux phénotypes : normales, apoptotiques, et les fantômes. Puis nous avons déterminé le pourcentage de chacun des phénotypes par observation au microscope. Après 2 heures d'incubation, la majorité des cellules, soit 80 % en moyenne ont un phénotype normal, il n'y a pas d'altération de la morphologie des cellules. Nos éosinophiles sont bien ronds avec un beau noyau bilobé et une grande quantité de granules. Les cellules ayant un phénotype fantôme sont très peu nombreuses. À 12 heures, on peut observer qu'une plus grande portion de cellules sont encore normales c'est à dire viables, soit environ 60 % d'entre elles. On remarque également qu'il y a plus de cellules en apoptose, soit environ 30 à 40 % selon les concentrations et la génération testée. Les cellules en apoptose commencent à se déformer et leur noyau se retrouve altéré, comme on peut le voir sur la photographie de la figure 4.4.

C'est à 24 heures que l'on constate que la population dite fantôme est la plus importante, elle varie entre 20 et 40 % selon la génération et la concentration. On peut les différencier des cellules en apoptose puisqu'elles se vident de leur contenu cellulaire et de leur noyau, tout en conservant leur forme de départ et en se décolorant. C'est avec G1 500 que la population de fantômes est la plus importante (environ 40 %). Les cellules normales restent encore nombreuses avec des pourcentages variants de 40 à 60 %, c'est en présence de G0 100 et de G3 que ce pourcentage est le plus haut.



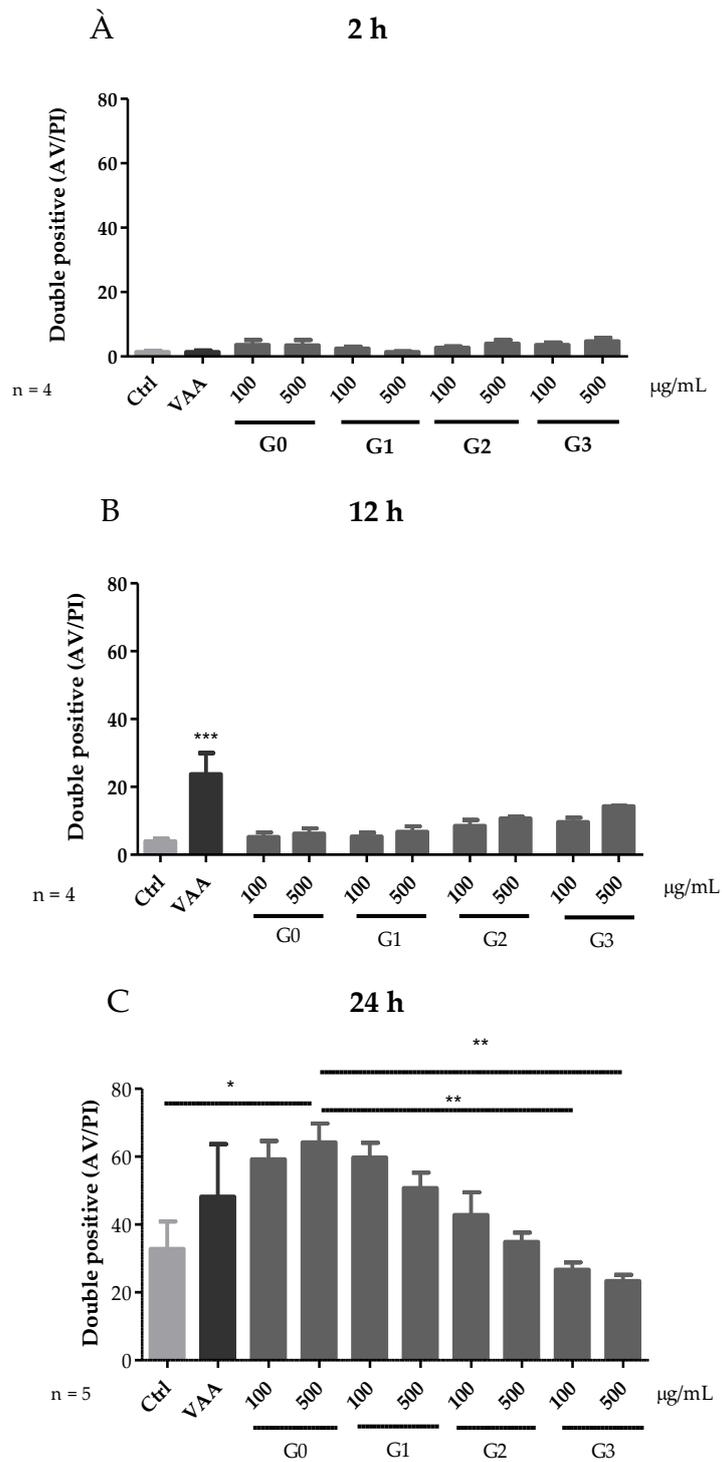
**Figure 4.4 : Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM sur la morphologie cellulaire des éosinophiles humains à différents temps d'incubation**

La morphologie cellulaire a été étudiée après 2 h (A), 12h (B) et 24 h (C) et nous avons identifié trois principaux phénotypes : normales, apoptotiques et des cellules « fantômes ». Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les PAMAM de G0 à G3, la VAA (1 µg/mL), ou l'HBSS. Les pourcentages de chacun des phénotypes ont été déterminés après cytocentrifugation puis coloration avec le kit hema-3-stain et observé par microscopie optique.

#### **4.5 Effet des dendrimères PAMAM sur l'apoptose des éosinophiles humains**

Nous nous sommes intéressés à l'effet des PAMAM sur l'apoptose des éosinophiles humains. Les mêmes conditions que précédemment ont été utilisées, suite à l'incubation le % des cellules doublement positives (apoptose et nécrose) a été déterminé par cytométrie en flux après un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (PI).

À 2 heures et à 12 heures, il y a très peu de cellules en apoptose. On peut observer une légère augmentation de cette dernière avec l'augmentation des générations testée après 12 heures d'incubation. (Figure 4.5 B). En effet à 2 heures, il y a un maximum de 5 % d'apoptose et à 12 heures on atteint 14 % en présence de G3 500, avec un contrôle positif de l'ordre de 25 %. Par contre à 24 heures, on peut observer une augmentation de l'apoptose des éosinophiles en présence de G0 et de G1. Par rapport à des conditions physiologiques normales (HBSS) où l'on a 32.8 % de cellules doublement positives, on constate que G0 500 induit de l'apoptose avec 64.5 % de cellules doublement positives. Ce qui est étonnant, c'est qu'en présence des PAMAM des générations 2 et 3, on peut observer un nombre de cellules en apoptose qui va diminuer par rapport à G0 500. Effectivement en présence de G3 500, 23.5 % des cellules sont doublement marquées. Pour résumé, on peut tout d'abord remarquer une augmentation de l'apoptose en présence de la génération 0 puis une diminution graduelle corrélée à l'augmentation des générations.



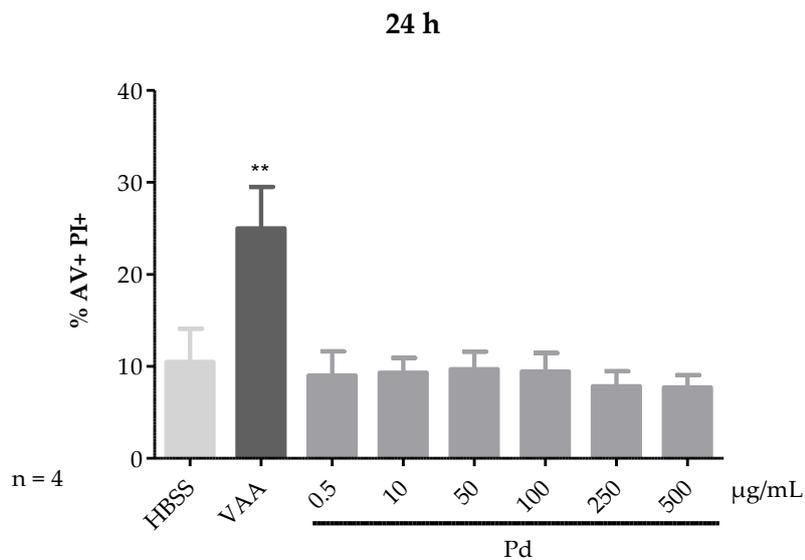
**Figure 4.5 :** Détermination de l'effet des dendrimères PAMAM sur l'apoptose des éosinophiles humains à différents temps d'incubation

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les PAMAM G0 à G3 pour les concentrations de 100 et 500 µg/ml, la VAA (1 µg/ml), ou l'HBSS pendant 2 h (A), 12h (B) et 24h (C). Le pourcentage de cellules doublement positives (apoptose + nécrose) a été déterminé par cytométrie en flux après un marquage FITC-annexine V (AV) et iodure de propidium (PI).

#### 4.6 Effet du Pd sur l'apoptose des éosinophiles humains

Nous nous sommes également intéressés à l'effet que pouvaient avoir le Pd sur l'apoptose des éosinophiles humains. Les mêmes conditions que pour les dendrimères ont été employées. Après avoir incubé les éosinophiles, nous avons déterminé le pourcentage des cellules doublement positives avec la cytométrie en flux suite à un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Pareillement au test de la viabilité, cette expérience a été réalisée avec les mêmes concentrations de Pd (de 0.5 à 500 µg/ml).

Après 24 heures d'incubation, les différentes concentrations de Pd sur les éosinophiles humains ont un pourcentage de cellules doublement positives proche des conditions normales (HBSS). En effet, en présence d'HBSS on obtient 10.5 % de cellules en apoptose, et en présence de Pd les pourcentages restent proches de cette condition avec au plus bas 7.7 % avec Pd 500 et au plus haut de 9.7 % avec Pd 50.

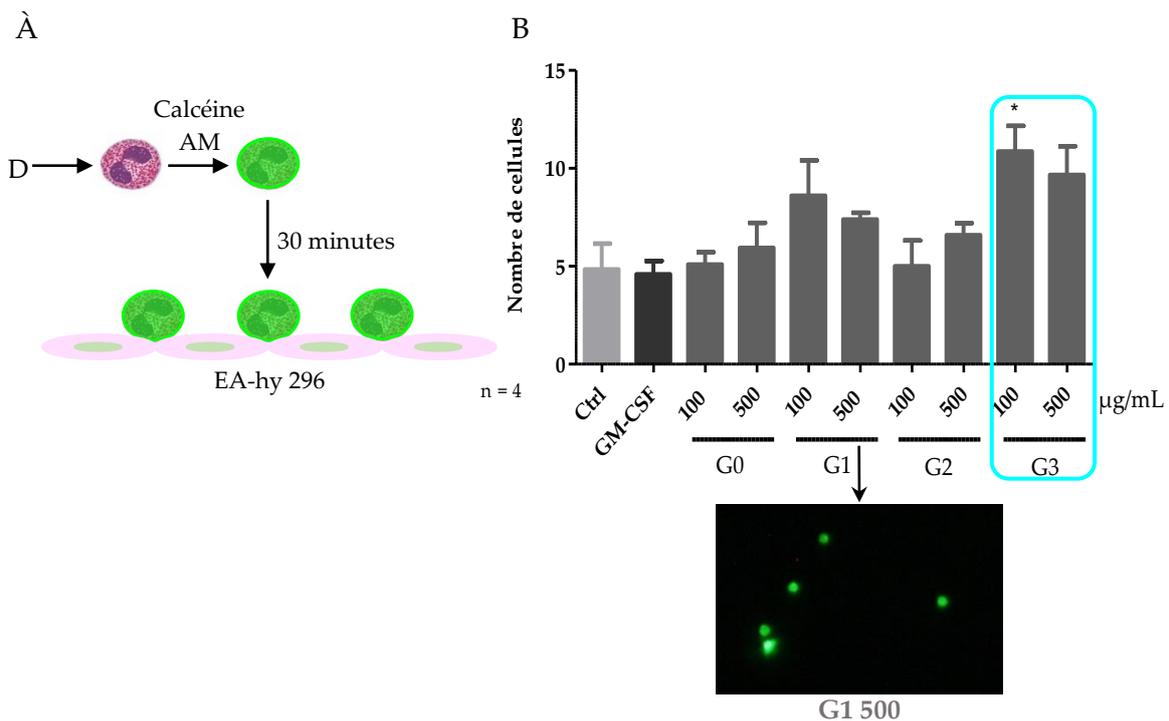


**Figure 4.6 :** Détermination de l'effet du Pd à différentes concentrations sur l'apoptose des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec le Pd pour les concentrations de 0.5, 10, 50, 100, 250 et 500 µg/ml, la VAA (1 µg/ml), ou l'HBSS pendant 24 heures. Le pourcentage de cellules doublement positives a été déterminé par cytométrie en flux après un marquage FITC-annexine V (AV) et iodure de propidium (PI).

## 4.7 Influence des dendrimères PAMAM sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains

Par la suite, nous sommes allés vérifier si les PAMAM avaient un impact sur l'adhésion des éosinophiles. Les éosinophiles ont été incubés avec les PAMAM des générations 0 à 3 et marqués avec l'AM calcéine. Puis ils ont été déposés sur des lamelles recouvertes de cellules épithéliales hybrides EA-hy296 (Figure 4.7 A). Le nombre de cellules a été évalué à partir de l'observation au microscope à fluorescence, à la figure 4.7 B on peut voir un exemple de l'observation pour G1 500. On a pu observer un grand nombre de cellules adhérer en présence des PAMAM de la génération 3 par rapport au contrôle. En effet, dans des conditions normales on obtient une moyenne de 4.8 cellules adhérentes, alors qu'en présence de G3 on a 10.8 et 9.6 pour 100 et 500 µg/ml respectivement. On peut également noter une légère augmentation de cellules adhérentes en présence de G1, 8.6 et 7.4 pour 100 et 500 µg/ml respectivement. En ce qui concerne G0 et G2 leur proportions sont proches de la normale (de 5 à 6.6).



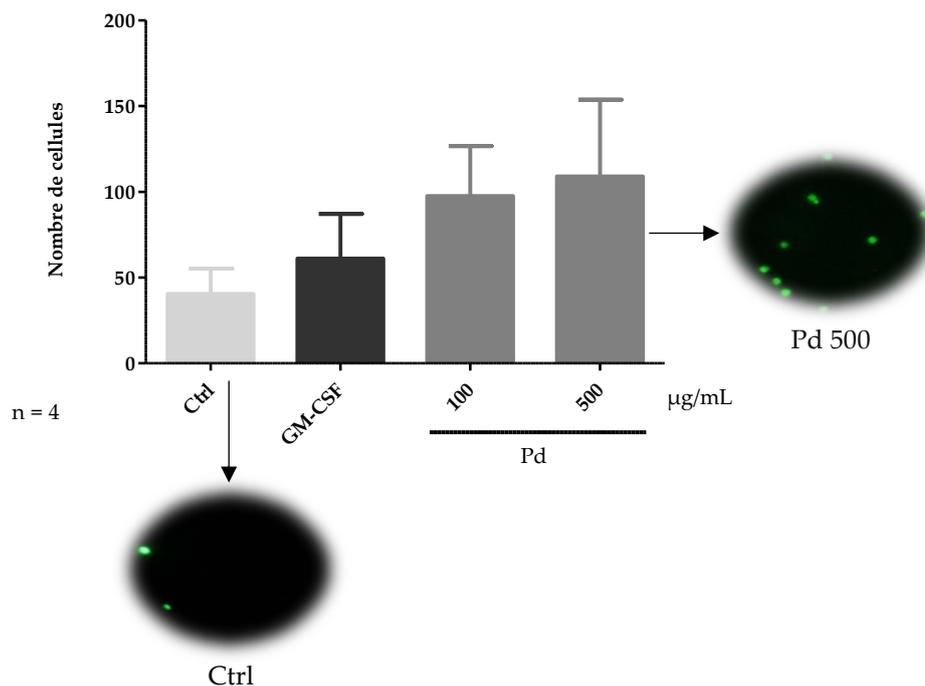
**Figure 4.7 :** Évaluation de l'influence des dendrimères PAMAM sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.

Schématisme de la méthode d'adhésion cellulaire (A) où les éosinophiles marqués avec l'AM Calcéine ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/mL) avec les PAMAM G0 à G3 à 100 et 500 µg/ml, le GM-CSF (65 ng/ml), ou le volume équivalent d'HBSS. Puis ils ont été déposés sur lamelle recouverte de cellules épithéliales hybrides EA-hy296 pendant 30 minutes. Le nombre de cellules a été évalué après observation au microscope à fluorescence et représenté dans un graphique (B).

#### 4.8 Influence du Pd sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains

De la même manière, nous avons voulu examiner si le Pd avait un impact sur l'adhésion des éosinophiles. Encore une fois les éosinophiles ont été incubés avec le Pd aux mêmes concentrations que celles expérimentées avec les PAMAM, puis marquées avec l'AM calcéine. Ensuite, ils ont été déposés sur des lamelles qui ont été recouvertes de cellules épithéliales hybrides EA-hy296 (figure 4.7 A). Le nombre de cellules a été déterminé à partir de l'observation au microscope à fluorescence.

On remarque qu'il y a un nombre croissant de cellules adhérentes selon la concentration de Pd. En effet, avec Pd 100 on a en moyenne 97.5 cellules qui ont adhéré et 109 avec Pd 500, alors qu'on a que 40.5 en condition normale (ctrl). D'ailleurs on voit nettement la différence sur les photographies prises pour le contrôle (ctrl) et Pd 500. À noter qu'il y a une grande variabilité d'un donneur à l'autre.



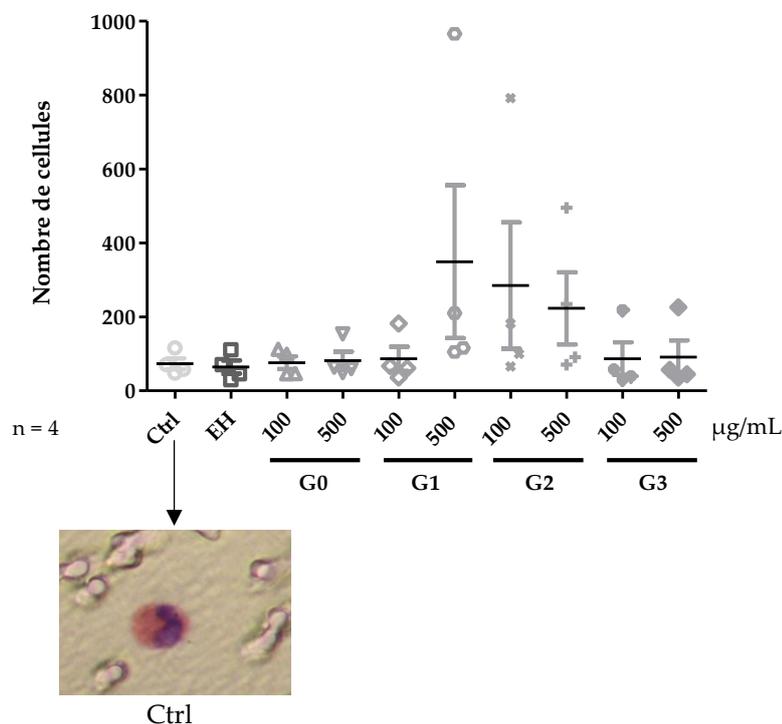
**Figure 4.8 :** Évaluation de l'influence du Pd sur l'adhésion cellulaire des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/mL) avec le Pd à 100 et 500 µg/ml, le GM-CSF (65 ng/ml), ou le volume équivalent d'HBSS puis marqués avec l'AM Calcéine. Ensuite, ils ont été déposés sur lamelle recouverte de cellules épithéliales hybrides EA-hy296 pendant 30 minutes. Le nombre de cellules a été évalué après observation au microscope à fluorescence.

#### 4.9 Impact des dendrimères PAMAM sur la chimiotaxie des éosinophiles humains

Après l'adhésion cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'effet des PAMAM sur la fonction de chimiotaxie des éosinophiles. Nous avons incubé les éosinophiles s avec les PAMAM, l'éotaxine humaine (EH) et le contrôle, ensuite ils ont été déposés sur la membrane poreuse pendant une heure. Le nombre d'éosinophiles ayant passé la membrane sont coloré et comptés au microscope. À la figure 4.9, on peut remarquer la photographie d'un éosinophile en présence du contrôle.

On a pu distinguer que la chimiotaxie des éosinophiles est plus élevée en présence de 500  $\mu\text{g/ml}$  de D G1 et de G2 100 et 500. Effectivement avec le contrôle nous avons obtenu une moyenne de 73 cellules qui ont traversé la membrane, alors qu'on atteint les 349 avec G1 500, ainsi que 285 et 235 en présence de G2 100 et 500 respectivement. En ce qui concerne les autres conditions elles sont proches de la normale, 76 pour G0 100 à 91 pour G3 500. Il est connu que d'un donneur à l'autre la variabilité de la chimiotaxie des éosinophiles est très élevée.



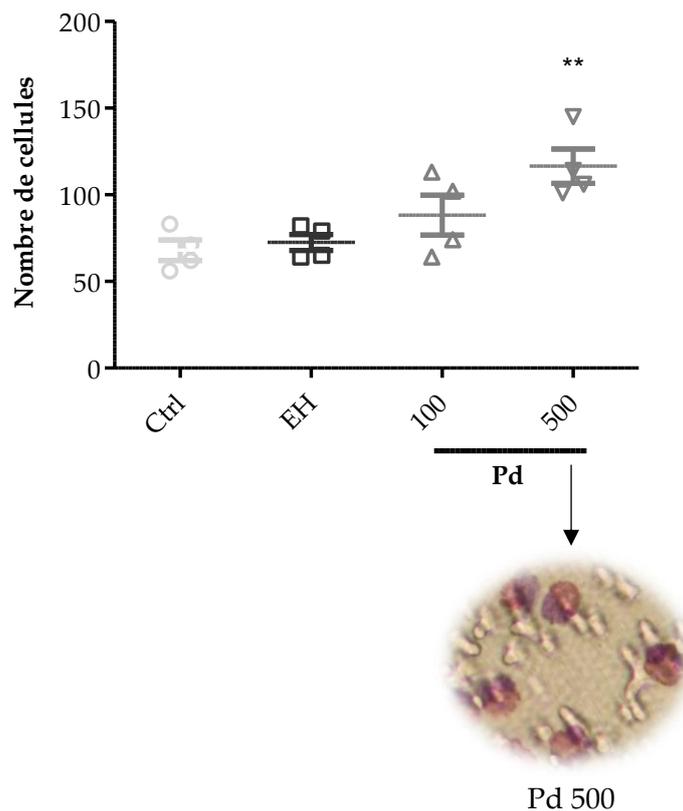
**Figure 4.9 :** Caractérisation de l'impact des dendrimères PAMAM sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec les PAMAM de G0 à G3 à 100 et 500  $\mu\text{g/ml}$ , l'EH 100 ng/ml, ou le contrôle (HBSS). Ensuite, ils sont déposés sur une membrane poreuse ( $5\mu\text{m}$ ) pendant 1 heure. Le nombre de cellules a été déterminé après coloration avec le kit Hema-3-stain.

#### 4.10 Impact du Pd sur la chimiotaxie des éosinophiles humains

Encore une fois nous avons reproduit la même expérience, mais avec le Pd à la place des PAMAM dans le but d'examiner si ce dernier a une influence sur la chimiotaxie des éosinophiles. Le nombre d'éosinophiles qui a pu traverser la membrane sont colorés et comptabilisé au microscope. On remarque qu'il y a un grand nombre d'éosinophiles sur la photographie de la figure 4.10.

On peut observer une élévation de la chimiotaxie des éosinophiles en présence de Pd. En effet, avec le contrôle on a une moyenne de 68 éosinophiles ayant traversé la membrane puis ce nombre passe à 88 et à 114 lorsque le Pd a été introduit. On peut également constater qu'à une concentration de 500  $\mu\text{g/ml}$  de Pd la chimiotaxie des éosinophiles est grandement favorisée par rapport au contrôle.



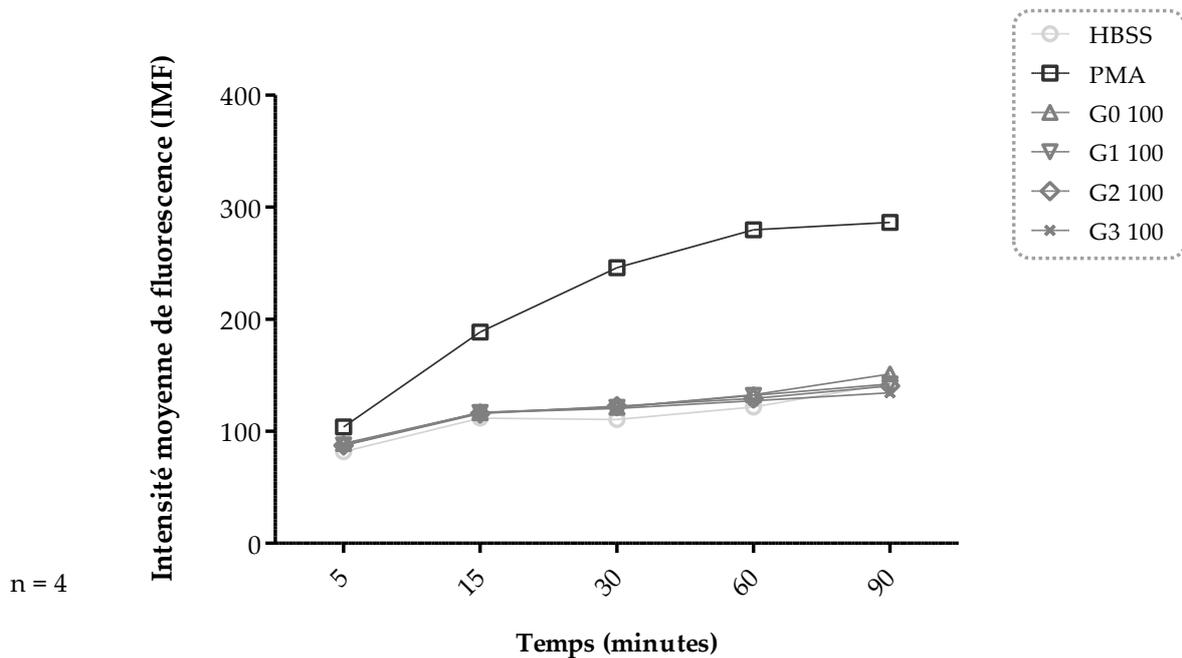
**Figure 4.10 :** Caractérisation de l'impact du Pd sur la chimiotaxie des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec le Pd, l'EH 100 ng/ml, ou le contrôle (HBSS). Par la suite, ils ont été déposés pendant 1 heure sur une membrane poreuse ( $5\mu\text{m}$ ). Le nombre de cellules a été évalué après coloration avec le kit Hema-3-stain.

#### 4.11 Incidence des dendrimères PAMAM sur la production de ROS chez les éosinophiles humains

Pour finir, nous avons évalué si les PAMAM influençaient la production de ROS intracellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé la sonde H<sub>2</sub>CFDA qui est clivée par une protéase activée en présence de ROS, ceci fait qu'elle devient fluorescente. Donc la sonde est mise en présence des éosinophiles, auxquels on ajoute les dendrimères des quatre générations et on analyse à des temps différents pour suivre l'évolution de l'intensité de la fluorescence qui reflète la production de ROS. Ici sont présentés seulement les résultats en présence des PAMAM aux concentrations de 100 µg/ml.

On peut remarquer que la production de ROS n'a pas été influencée par la présence des dendrimères comparativement à notre contrôle positif (PMA), effectivement pour ce dernier on obtient une intensité moyenne de fluorescence (IMF) de 286 alors que pour G3 100 on obtient une IMF de 134.



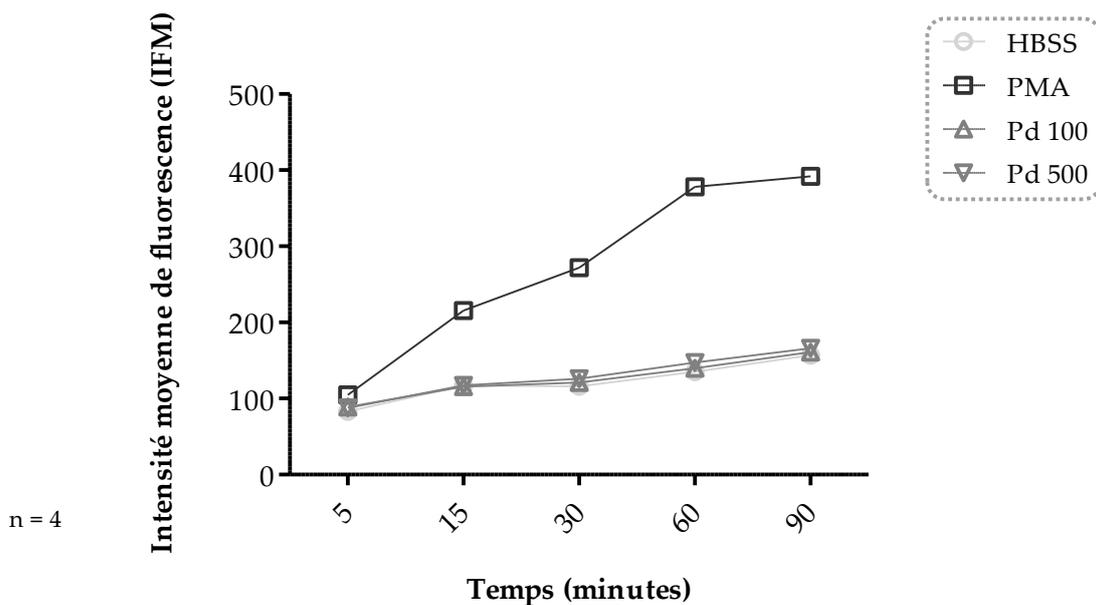
**Figure 4.11 :** Évaluation de l'incidence des dendrimères PAMAM sur la production de ROS intracellulaire des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec la sonde H<sub>2</sub>CFDA, le PMA 0.1 µM, ou le contrôle (HBSS). Puis les dendrimères PAMAM de G0 à G3 à 100 µg/ml sont ajoutés et analysés au FACS à 5, 15, 30, 60 et 90 minutes.

#### 4.12 Incidence du Pd sur la production de ROS chez les éosinophiles humains

Finally, we also went to examine if Pd influenced the production of ROS intracellularly. We proceeded in the same way as previously. We used the H<sub>2</sub>CFDA probe which is fluorescent when it is cleaved by an activated protease in the presence of ROS. So the probe is incorporated into eosinophils then Pd is added at the two chosen concentrations, finally the analysis is performed at different times in order to follow the evolution of the fluorescence intensity which represents the production of ROS.

It is observed that the presence of Pd did not lead to a variation in the production of ROS compared to normal conditions (control). It can be seen that the conditions with Pd have values very inferior to our positive control (PMA), effectively for the latter one obtains an average fluorescence intensity (IMF) of 391 whereas for Pd 100 one obtains an IMF of 161 and 166 for Pd 500.



**Figure 4.12 :** Évaluation de l'incidence du Pd sur la production de ROS intracellulaire des éosinophiles humains.

Les éosinophiles ont été incubés ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ml) avec la sonde H<sub>2</sub>CFDA, le PMA 0.1  $\mu$ M, ou le contrôle (HBSS). Puis le Pd à 100 et 500  $\mu$ g/ml a été introduit et analysé au FACS pour les temps de 5, 15, 30, 60 et 90 minutes.

## CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Depuis quelques années, tout ce qui a attiré aux nanotechnologies est en plein essor. Cet engouement vient principalement de l'industrie et de la recherche, mais aussi des consommateurs qui recherchent des produits toujours plus performants et de meilleure qualité (Araujo *et al.*, 2015, INRS, 2015). Il a déjà été établi que les particules ultrafines sont un réel danger pour la santé humaine, elles sont présentes en abondance dans les métropoles et sont bien évidemment considérées comme des polluants de notre environnement (INERIS, 2007). Considérant la très petite taille des nanoparticules, celles-ci circulent dans l'organisme avec plus d'aisance, elles ont la capacité de se rendre plus loin vers des organes cibles (INRS, 2015, Stark, 2011). Quand elles sont dans la circulation sanguine, elles vont faire face à un ensemble complexe de défense immunitaire, et bien souvent elles vont causer des dommages dans les défenses de l'organisme, comme le dérèglement de l'homéostasie qui peut conduire à la production d'espèce réactive à l'oxygène et provoquer la mort cellulaire précoce ou échapper aux défenses (macrophage) (Oberdorster, 2010, Stark, 2011). La présence de ces nanoparticules au niveau des cellules immunitaires provoque un dérèglement qui peut induire des maladies inflammatoires, comme des dommages pulmonaires (Oberdorster *et al.*, 2005a), certaines pathologies peuvent être reliées à des problèmes asthmatiques qui sont dus à une dégranulation précoce et abondante du neutrophile (Lacy, 2006). La présence des nanoparticules peut également mener à des maladies auto-immunes (Zolnik *et al.*, 2010). Parmi ces pathologies, les cellules éosinophiles ont un rôle important à jouer (Rothenberg *et al.*, 2006, Wardlaw *et al.*, 1995). Une dégranulation excessive des neutrophiles peut mener à différentes pathologies, et plusieurs cellules du système immunitaire sont également affectées par la présence de nanoparticules (Babin *et al.*, 2013, Noel *et al.*, 2016). En ce qui concerne les éosinophiles, il y a peu d'études sur l'impact des nanoparticules sur ce type cellulaire qui pourtant occupe un rôle important dans la défense de l'organisme. Cependant nous savons que les éosinophiles peuvent être modulés par les nanoparticules (Silva *et al.*, 2016). En effet, cette étude a permis de constater que le ZnO retarde l'apoptose des éosinophiles humains. Cette nanoparticule augmente la synthèse des protéines *de novo* mais n'induit pas la production d'espèces réactives à l'oxygène. De plus, il a été démontré que le ZnO augmente la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-8.

Quand on prend en considération les différents mécanismes concernant leur activation, leur mobilisation et leur conservation, les éosinophiles ont la capacité d'influer leur environnement immunitaire et tissulaire, que ce soit dans des situations inflammatoires ou physiologiques, d'où l'intérêt de déterminer l'effet des nanoparticules sur leurs différentes fonctions. De plus, nous avons discuté des différentes voies d'expositions en ce qui concerne l'absorption des nanoparticules. Dans le cas des dendrimères PAMAM et du palladium qui sont tous les deux des outils en nanomédecine, l'exposition dans le secteur hospitalier serait donc plus importante. Que ce soit du côté de l'imagerie, de l'oncologie et du diagnostic l'exposition accidentelle va être accrue, de même que les concentrations de cette exposition seront probablement plus élevées. Notamment pour les expositions dermiques, les risques d'un terrain plus favorable (derme irrité ou lésé) sont à envisager, ce qui permettrait une pénétration et une absorption des nanoparticules plus aisée (Kimura *et al.*, 2012, Liang *et al.*, 2013).

Tout d'abord, effectuons un petit retour sur notre hypothèse, qui d'une part est que les fonctions cellulaires des éosinophiles soient modulées par l'interaction avec les nanoparticules dendrimères de la même façon qu'avec les neutrophiles. Et d'une autre part que ces mêmes fonctions cellulaires des éosinophiles seront modulées par le palladium et ce de la même façon qu'en présence des dendrimères. Dans notre laboratoire, des études ont déjà été menées sur les interactions des nanoparticules TiO<sub>2</sub>, ZnO, CeO<sub>2</sub> et Ag avec les neutrophiles. Ces études ont montré que ces nanoparticules pouvaient influencer des changements morphologiques chez le neutrophile *in vitro* (Babin *et al.*, 2013, Goncalves *et al.*, 2010, Poirier *et al.*, 2014). Également, l'activité pro-inflammatoire des dendrimères PAMAM *in vivo* a pu être observée chez les souris (Durocher *et al.*, 2016). De plus, il a également été montré que les nanoparticules ZnO avaient un impact sur l'apoptose et la production de cytokines chez les éosinophiles *in vitro* (Silva *et al.*, 2016). Pour la première fois, à notre connaissance les effets des dendrimères PAMAM et du Pd sur les éosinophiles ont été évalués. Afin de pouvoir répondre à notre hypothèse, effectuons un retour sur nos objectifs. Voici un récapitulatif de nos résultats sous forme de tableau.

**Tableau 5.0 :** Synthèse des résultats obtenus pour les expériences sur les effets des NPs (PAMAM et Pd) sur les fonctions cellulaires des éosinophiles et des neutrophiles.

	ÉOSINOPHILES		NEUTROPHILES
	Palladium	PAMAM	
<b>Viabilité</b>	Pas affectée	Peu affectée	Très affectée
<b>Apoptose</b>	Aucun effet	Induction avec G0 Retardée avec G2 et G3	Induction de l'apoptose
<b>Adhésion cellulaire</b>	Plus importante	Plus importante avec G3	?
<b>Chimiotaxie</b>	Plus élevée	Plus élevée avec G1 500 et G2	En cours
<b>ROS</b>	Pas de modification	Pas de modification	?

Les expériences et résultats des dendrimères PAMAM sur les neutrophiles ont été réalisés par une collègue du laboratoire Isabelle Durocher.

Comme nous en avons déjà discuté, nous avons choisi de caractériser le palladium dans du RPMI-1640 au lieu d'une solution d'eau ou d'un diluant précis, afin de mieux refléter les conditions biologiques. Pour caractériser le potentiel zêta (stabilité colloïdale) et la distribution de la taille des nanoparticules de palladium, nous avons employé le DLS. Le palladium utilisé est issu d'une solution aqueuse et sa taille ne dépasse pas 600 nm pour une de ces distributions, les autres étant inférieures à 100 nm. Concernant le potentiel zêta, -9.96 mV pour 100µg/ml reflète une instabilité colloïdale des nanoparticules de Pd. À ce sujet Cho et son équipe ont émis qu'elle serait due à la formation d'agrégats (Cho *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les éosinophiles, nous avons pu observer que leur viabilité est peu affectée (elle ne dépasse pas les 50 %) par la présence des dendrimères alors que chez les neutrophiles il a été observé que, quelle que soit la génération présente la viabilité était beaucoup affectée. Pour ce qui est du Palladium, sa présence n'a pas du tout affecté la viabilité des éosinophiles. Il révèle qu'avec une forte concentration, soit 500 µg/ml et avec une exposition de vingt-quatre heures il n'induit pas de dommage à la membrane, puisque le bleu de trypan était exclu de nos éosinophiles.

Pour ce qui est de l'apoptose, chez les neutrophiles, les quatre générations de dendrimères PAMAM ont induit fortement l'apoptose. Par contre avec les éosinophiles nous observons d'abord une augmentation de l'apoptose en présence de la génération 0, puis on remarque un retour proche de la normale avec l'augmentation des générations voire même un retard de

l'apoptose en présence de la génération 3. Toujours chez les éosinophiles, le palladium n'a engendré aucun effet sur l'apoptose des cellules, peu importe la concentration de celui-ci.

En ce qui concerne la chimiotaxie, la présence de la génération 1 à 500 µg/ml et de la génération 2 favorise le déplacement des éosinophiles, nous n'avons pas encore les résultats pour cette fonction chez le neutrophile. Par contre, en présence de palladium la chimiotaxie est beaucoup plus élevée, en effet plus la concentration de palladium est élevée et plus les éosinophiles sont attirés de l'autre côté de la membrane.

Les éosinophiles en présence de la génération 3 révèlent une plus grande capacité d'adhésion qu'avec les autres générations. On observe également que le palladium a un effet sur l'augmentation de l'aptitude des éosinophiles à l'adhésion cellulaire. Plus la concentration de palladium est élevée plus les éosinophiles ont une meilleure capacité d'adhésion. Nous n'avons pas les résultats pour cette fonction chez les neutrophiles en présence de dendrimères. Ces résultats révèlent que le mode d'action des nanoparticules se trouve être fluctuant et complexe.

Nous n'avons vu aucune inhibition ou augmentation de la production d'espèce réactive à l'oxygène que ce soit pour les dendrimères ou le palladium. Cependant, il est possible que l'addition de sérum interfère avec la sonde. Il serait donc avantageux de reproduire cette expérience avec de l'HBSS au lieu du RPMI-1640. Cet inconvénient nous montre les limites des essais *in vitro*. Effectivement, lors de l'exposition d'un système biologique tel que l'homme, les nanoparticules se retrouvent dans un milieu biologique plus complexe avec de nombreuses interactions que lors de nos essais en laboratoire. Pour cette dernière fonction, il serait intéressant de pouvoir faire la comparaison avec d'autres cellules, comme les neutrophiles.

Au vu de nos résultats, nous sommes en mesure de signifier que le palladium pourrait devenir un excellent candidat pour le domaine médical ou de l'imagerie, mais il est nécessaire d'approfondir et d'entreprendre des études complémentaires. Particulièrement à des concentrations élevées celui-ci favorise les fonctions cellulaires telles que l'adhésion et la chimiotaxie sans induire des effets indésirables sur la viabilité cellulaire, l'apoptose ou encore la production d'espèces réactives à l'oxygène chez les éosinophiles. Il serait donc considérablement intéressant de vérifier son impact sur d'autres types cellulaires, en particulier sur les neutrophiles. Ainsi que de poursuivre les expériences sur son influence sur

les fonctions cellulaires par exemple la production de cytokines et la phagocytose. Et bien évidemment, des études *in vivo* permettraient de compléter les données à notre disposition.

Les dendrimères sont également de bons candidats à la nanomédecine, mais en ajustant la concentration et la génération utilisées pour avoir le moins d'effets néfastes et profiter au mieux des avantages de ceux-ci. En nous basant sur les résultats, nous pouvons dire que les générations 2 et 3 sont les plus intéressantes. De plus, nous pouvons également remarquer que son impact n'est pas le même selon le type cellulaire présent, les éosinophiles ou les neutrophiles, c'est un point sur lequel il faut porter attention, et il serait primordial de pouvoir effectuer une comparaison de l'effet des dendrimères sur toutes les fonctions cellulaires des éosinophiles et des neutrophiles.

Les nanoparticules de dendrimères PAMAM modulent effectivement les fonctions des éosinophiles et des neutrophiles. Par contre, leur effet n'est pas toujours le même. En effet, nous n'avons pas toujours des résultats semblables à ce qui a été observé chez le neutrophile même si ces deux granulocytes ont une oncologie très semblable. De la même façon, les nanoparticules palladium et dendrimères modulent les fonctions des éosinophiles. Mais l'impact de ces deux nanoparticules n'est pas forcément identique pour une même fonction chez l'éosinophile.

L'apoptose des éosinophiles est un procédé considéré anti-inflammatoire. Il est plausible de penser que les nanoparticules dendrimères PAMAM en ayant un effet retardateur sur l'apoptose spontanée des éosinophiles et en ayant une meilleure adhésion et chimiotaxie, pourraient soutenir un peu plus les fonctions effectrices. Les éosinophiles pourraient rester davantage au site d'inflammation. Exactement de la même façon, le palladium en favorisant l'adhésion et la chimiotaxie pourrait permettre une arrivée sur le site de l'inflammation plus précoce des éosinophiles.

Lorsqu'on regarde le modèle le plus commun dans l'étude des nanoparticules, chez les cellules neutrophiles, celles-ci sont internalisées, il y a une production d'espèces réactives à l'oxygène, et une induction de l'apoptose. Chez les éosinophiles ce n'est pas le cas, puisqu'on a plus tôt une tendance au retard de l'apoptose ou aucun effet, alors il n'est pas possible d'extrapoler les effets de nanoparticules d'un type cellulaire à un autre. Et comme nous l'on montrer nos résultats nous ne pouvons pas non plus extrapoler les effets sur un type cellulaire d'une

nanoparticule à une autre. Ce qui revient à dire que peu importe la nanoparticule ou le type cellulaire tout est contexte dépendant.

Le programme de recherche de mon laboratoire d'accueil évalue l'effet de plusieurs nanoparticules courantes sur le système immunitaire dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Tout ceci s'intègre dans un contexte plus large, de gestion des risques associés à l'exposition aux nanoparticules. On peut citer le dioxyde de titane présent dans de nombreuses préparations alimentaires, il est également connu sous le nom E 171. Suite à plusieurs études ayant démontré son effet néfaste pour la santé, il a été retiré de nombreux produits alimentaires en décembre 2016 en France comme les bonbons Têtes Brulées ou les yaourts Danone. De plus, suite à une évaluation de l'Organisation mondiale de la Santé, le  $\text{TiO}_2$  a été classé en tant que cancérigène possible pour l'être humain lors d'exposition par inhalation. Les différences observables dans les résultats des nombreuses études réalisées sur les nanoparticules appuient l'importance de notre travail. Nos résultats contribuent à mettre en évidence le besoin d'évaluer l'effet des nanoparticules sur plusieurs fonctions et divers types cellulaires.

D'un point de vue plus global, il s'agit de pouvoir déterminer si les nanomatériaux ou certains d'entre eux peuvent et dans quelles mesures constituer une menace pour l'environnement et l'être humain à courts, moyens et longs termes. Ces études sont un premier pas en vue d'améliorer les évaluations et les gestions du risque, par la production de réglementation et de bonnes pratiques.

Mon travail à la maîtrise n'est que la première étape de l'évaluation de l'effet des nanoparticules dendrimères PAMAM et du palladium sur les fonctions des éosinophiles. Il serait intéressant de déterminer l'effet de ces nanoparticules sur certaines cytokines et chimiokines impliquées dans la production et le recrutement de ces dernières, telles que l'IL-5, l'IL-9, et l'INF- $\gamma$ . Quelles sont les voies métaboliques impliquées dans la modulation de ces fonctions ? Qu'est-ce qui est modulé, comment, et quelles sont les voies de signalisations impliquées ? Et il serait profitable de réaliser des expériences *in vivo* afin de compléter les connaissances relatives aux effets inopportuns des nanoparticules de palladium, et aussi d'élargir les recherches *in vivo* concernant l'impact des dendrimères dans l'organisme (impact sur le système respiratoire).

## RÉFÉRENCES

- Adams CP, Walker KA, Obare SO & Docherty KM (2014) Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles. *PLoS One* 9(1):e85981.
- Adronov A, Gilat SL, Frechet JM, Ohta K, Neuwahl FV & Fleming GR (2000) Light harvesting and energy transfer in laser- dye-labeled poly (aryl ether) dendrimers. *Journal of the American Chemical Society* 122(6):1175-1185.
- AFP (2018) Le dioxyde de titane, un additif controversé. Science et avenir. [https://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement/le-dioxyde-de-titane-un-additif-controverse\\_124093](https://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement/le-dioxyde-de-titane-un-additif-controverse_124093) (Consulté le 01 Décembre 2019)
- Aiken JD & Finke RG (1999) A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 145(1):1-44.
- Aitken R, Creely K & Tran C (2004) Nanoparticles : an occupational hygiene review. *Health and Safety Executive*:113.
- Antunovic M, Kriznik B, Ulukaya E, Yilmaz VT, Mihalic KC, Madunic J & Marijanovic I (2015) Cytotoxic activity of novel palladium-based compounds on leukemia cell lines. *Anticancer Drugs* 26(2):180-186.
- Araujo F, Shrestha N, Granja PL, Hirvonen J, Santos HA & Sarmiento B (2015) Safety and toxicity concerns of orally delivered nanoparticles as drug carriers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 11(3):381-393.
- Arseneault M (2012) *Nouvelles méthodologies pour le design et la synthèse de nano-objets dendritiques*. (Université Laval).
- Astruc D, Boisselier E & Ornelas C (2010) Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chemical reviews* 110(4):1857-1959.
- Astruc D, Lu F & Aranzas JR (2005) Nanoparticles as recyclable catalysts: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 44(48):7852-7872.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicology letters* 221(1):57-63.
- Baccar H, Adams CP, Abdelghani A & Obare SO (2013) Chronoamperometric-based detection of hydrogen peroxide using palladium nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology* 10(5-7):563-576.
- Bai W, Zhang Z, Tian W, He X, Ma Y, Zhao Y & Chai Z (2010) Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12(5):1645-1654.
- Bencsik A & Département cancer et environnement (2017) Les nanomatériaux. (centre de lutte contre le cancer Léon-bérard).

- Blumenthal RD, Samoszuk M, Taylor AP, Brown G, Alisauskas R & Goldenberg DM (2000) Degranulating eosinophils in human endometriosis. *Am J Pathol* 156(5):1581-1588.
- Boas U & Heegaard PM (2004) Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* 33(1):43-63.
- Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone Jr MA, Newman W, Sterbinsky S, 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.
- Bolton SJ, McNulty CA, Thomas RJ, Hewitt CR & Wardlaw AJ (2003) Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *J Leukoc Biol* 74(1):60-68.
- Borm PJ, Schins RP & Albrecht C (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *International journal of cancer* 110(1):3-14.
- Bousquet J, Chanez P, Vignola AM, Lacoste J-Y & Michel FB (1994) Eosinophil inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 150(5 Pt 2):S33-S38.
- Brouwer DH, Gijssbers JH & Lurvink MW (2004) Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *The Annals of occupational hygiene* 48(5):439-453.
- Cancer et Environnement, (2019) Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) additif alimentaire (E171), <https://www.cancer-environnement.fr/559-Dioxyde-de-titane.ce.aspx> (consulté le 2 déc 2019).
- Caminade A-M, Laurent R & Majoral J-P (2005) Characterization of dendrimers. *Advanced drug delivery reviews* 57(15):2130-2146.
- Caruthers SD, Wickline SA & Lanza GM (2007) Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in biotechnology* 18(1):26-30.
- Cho WS, Duffin R, Bradley M, Megson IL, MacNee W, Lee JK, Jeong J & Donaldson K (2013) Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 10(1):55.
- Conroy DM & Williams TJ (2001) Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res* 2(3):150-156.
- Costa MF, Nihei J, Mengel J, Henriques MG & Penido C (2009) Requirement of L-selectin for gammadelta T lymphocyte activation and migration during allergic pleurisy: co-relation with eosinophil accumulation. *Int Immunopharmacol* 9(3):303-312.
- Cyrus J, Stolzel M, Heinrich J, Kreyling WG, Menzel N, Wittmaack K, Tuch T & Wichmann HE (2003) Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *The Science of the total environment* 305(1-3):143-156.
- Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotina A & Springer MS (1996) Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *Journal of Experimental Medicine* 183(5):2349-2354.

- Decot V & Capron M (2006a) [Eosinophils: structure and functions]. *Presse Med* 35(1 Pt 2):113-124.
- Decot V & Capron M (2006b) Le polynucléaire éosinophile. *La Presse Médicale* 35(1):113-124.
- Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB & McNeil SE (2009) Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 5(2):106-117.
- Domanski DM, Klajnert B & Bryszewska M (2004) Influence of PAMAM dendrimers on human red blood cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* 63(1-2):189-191.
- Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR & Oliveira DT (2002) Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 41(2):152-157.
- Durocher I & Girard D (2016) In vivo proinflammatory activity of generations 0-3 (G0-G3) polyamidoamine (PAMAM) nanoparticles. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 65(9):745-755.
- Dwivedi PD, Tripathi A, Ansari KM, Shanker R & Das M (2011) Impact of nanoparticles on the immune system. *Journal of biomedical nanotechnology* 7(1):193-194.
- Ehrlich P (1879a) Beitrage zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch Anat Physiol* 3:166-169.
- Ehrlich P (1879b) Ueber die spezifischen granulationen des Blutes. *Arch Anat Physiol* 3:571.
- El-Sayed M, Kiani MF, Naimark MD, Hikal AH & Ghandehari H (2001) Extravasation of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers across microvascular network endothelium. *Pharmaceutical research* 18(1):23-28.
- El-Sayed MA (2001) Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts of chemical research* 34(4):257-264.
- Endo CA, Ostiguy C, Dossa NI, Emond C (2014) Portrait de la nanotechnologie au Québec dans les milieux industriels et de la recherche universitaire et publique. Prévention des risques chimiques et biologiques, Rapport R-854. IRSST.
- Eriksson J, Woschnagg C, Fernvik E & Venge P (2007) A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein. *J Leukoc Biol* 82(6):1491-1500.
- Fang W, Tang S, Liu P, Fang X, Gong J & Zheng N (2012) Pd nanosheet-covered hollow mesoporous silica nanoparticles as a platform for the chemo-photothermal treatment of cancer cells. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 8(24):3816-3822.
- Fang X, Yu R, Li B, Somasundaran P & Chandran K (2010) Stresses exerted by ZnO, CeO<sub>2</sub> and anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea*. *Journal of colloid and interface science* 348(2):329-334.

- Favier F, Walter EC, Zach MP, Benter T & Penner RM (2001) Hydrogen sensors and switches from electrodeposited palladium mesowire arrays. *Science* 293(5538):2227-2231.
- Ferland C, Guilbert M, Davoine F, Flamand N, Chakir J & Laviolette M (2001) Eotaxin promotes eosinophil transmigration via the activation of the plasminogen-plasmin system. *J Leukoc Biol* 69(5):772-778.
- Ferruti P, Marchisio MA & Duncan R (2002) Poly (amido-amine) s: Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications* 23(5-6):332-355.
- Fiaud J, Malleron J-L & Legros J-Y (1997) *Handbook of palladium-catalysed organic reactions*. Academic Press,
- Fischer E, Capron M, Prin L, Kusnierz JP & Kazatchkine MD (1986) Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cell Immunol* 97(2):297-306.
- Fischer M & Vögtle F (1999) Dendrimers: from design to application—a progress report. *Angewandte Chemie International Edition* 38(7):884-905.
- Fondati A, Fondevila D & Ferrer L (2003) Piecemeal degranulation (PMD) morphology in feline circulating eosinophils. *Research in veterinary science* 75(2):127-132.
- Fontana L, Leso V, Marinaccio A, Cenacchi G, Papa V, Leopold K, Schindl R, Bocca B, Alimonti A & Iavicoli I (2015) The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats. *Nanotoxicology* 9(7):843-851.
- Frankova J, Juranova J, Kamarad V, Zalesak B, Ulrichova J, (2018) Effect of AnNPs on the human reconstructed epidermis, *Interdiscip Toxicol*, 11(4):289-293
- Fubini B, Ghiazza M & Fenoglio I (2010) Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 4:347-363.
- Giembycz MA & Lindsay MA (1999) Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacological reviews* 51(2):213-340.
- Gil YG, Kang S, Chae A, Kim YK, Min DH, Jang H (nov 2018) *Nanoscale*, 10(42) : 19810-19817.
- Gillies ER & Fréchet JMJ (2005) Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today* 10(1):35-43.
- Gleich GJ & Adolphson CR (1986) The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Advances in immunology* 39:177-253.
- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(3):1002-1008.
- Gouon-Evans V & Pollard JW (2001a) Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. *Endocrinology* 142(10):4515-4521.
- Gouon-Evans Vr & Pollard JW (2001b) Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. *Endocrinology* 142(10):4515-4521.
- Gutierrez-Ramos JC, Lloyd C, Kapsenberg ML, Gonzalo JA & Coyle AJ (2000) Non-redundant functional groups of chemokines operate in a coordinate manner during the inflammatory response in the lung. *Immunol Rev* 177:31-42.

- Hartnell A, Moqbel R, Walsh G, Bradley B & Kay A (1990) Fc gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* 69(2):264.
- Hawker C & Fréchet JM (1990) A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (15):1010-1013.
- Heck RF (1968) Acylation, methylation, and carboxyalkylation of olefins by Group VIII metal derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 90(20):5518-5526.
- Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, Mathieu C & Ceuppens JL (2003) Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(1):42-50.
- Hoenstein R, Admon D, Solomon A, Norris A, Moqbel R & Levi-Schaffer F (2001) Interleukin-2 activates human peripheral blood eosinophils. *Cell Immunol* 210(2):116-124.
- 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.
- Huang X, Tang S, Mu X, Dai Y, Chen G, Zhou Z, Ruan F, Yang Z & Zheng N (2011) Freestanding palladium nanosheets with plasmonic and catalytic properties. *Nat Nanotechnol* 6(1):28-32.
- Iavicoli I, Fontana L, Corbi M, Leso V, Marinaccio A, Leopold K, Schindl R & Sgambato A (2015) Exposure to Palladium Nanoparticles Affects Serum Levels of Cytokines in Female Wistar Rats. *PLoS One* 10(11):e0143801.
- INERIS (2007) Nanotechnologies, nanomatériaux, nanoparticules, Quels impacts? sur l'homme et l'environnement. in *maitriser le risque pour un développement durable.*, Édit Fiction C (Institut national de l'environnement industriel et des risques.).
- Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, Ponikau JU & Kita H (2005) Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175(8):5439-5447.
- INRS (2015) Nanomatériaux, Nanoparticules. (INRS-Santé et sécurité au travail), p 38.
- Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA & Lee JJ (2007) Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 119(6):1313-1320.
- Jang W-D, Nakagishi Y, Nishiyama N, Kawauchi S, Morimoto Y, Kikuchi M & Kataoka K (2006) Polyion complex micelles for photodynamic therapy: incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *Journal of Controlled Release* 113(1):73-79.
- Jargot D, La Rocca B, Malard S, Robert S, Serre P, Simonnard A, Reynier M, Ricaud M, Witschger O, (2016) Dioxyde de titane, Fiche toxicologique n°291, INRS.
- Johansson MW & Mosher DF (2011) Activation of beta1 integrins on blood eosinophils by P-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(4):889-897.

- Kallos GJ, Tomalia D, Hedstrand D, Lewis S & Zhou J (1991) Molecular weight determination of a polyamidoamine Starburst polymer by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 5(9):383-386.
- Kato M, Kephart GM, Morikawa A & Gleich GJ (2001) Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissues: evidence for eosinophil degranulation in normal gastrointestinal tract. *International archives of allergy and immunology* 125(Suppl. 1):55-58.
- Kato M, Kephart GM, Talley NJ, Wagner JM, Sarr MG, Bonno M, McGovern TW & Gleich GJ (1998) Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. *The Anatomical Record* 252(3):418-425.
- Kim S & Choi IH (2012) Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei medical journal* 53(3):654-657.
- Kimura E, Todo H & Sugibayashi K (2012) [Safety and skin penetration of nanoparticles]. *Yakugaku Zasshi* 132(3):319-324.
- Kobayashi H, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Ishimori T, Konishi J, Togashi K & Brechbiel MW (2001) Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents. *Magnetic resonance in medicine* 46(4):781-788.
- Köhler M & Fritzsche W (2008) *Nanotechnology: an introduction to nanostructuring techniques*. John Wiley & Sons,
- Kovalszki A & Weller PF (2016) Eosinophilia. *Prim Care* 43(4):607-617.
- Kroegel C, Virchow J, Luttmann W, Walker C & Warner J (1994a) Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *European Respiratory Journal* 7(3):519-543.
- Kroegel C, Warner J, Virchow J & Matthys H (1994b) Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II). *European Respiratory Journal* 7(4):743-760.
- Kuhlbusch TA, Asbach C, Fissan H, Gohler D & Stintz M (2011) Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: a review. *Particle and fibre toxicology* 8:22.
- Lacy P (2006) Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2(3):98-108.
- Lacy P, Levi-Schaffer F, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez J, Kay AB & Moqbel R (1998) Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood* 91(7):2508-2516.
- Le Dall J (2015) *Étude de l'interaction de dendrimères phosphorés avec les monocytes humains, recherche de récepteur (s)*. Doctorat (Université de toulouse III). 165 p
- Le TT, Yoon H, Son MH, Kang YG, Chang YS (2019) Treatability of hexabromocyclododecane using Pd/Fe nanoparticles in the soil-plant system : effects of humic acids. *Sci Total Environ*. 689 : 444-450.
- Lee CC, Gillies ER, Fox ME, Guillaudeu SJ, Fréchet JM, Dy EE & Szoka FC (2006) A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice

- bearing C-26 colon carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(45):16649-16654.
- Levy AM, Gleich GJ, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Steiner BL & Phillips SF (1997) Increased eosinophil granule proteins in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease. *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, p 117-123.
- Li Y, Duan J, Chai X, Yang M, Wang J, Chen R, Sun Z, (2019) Microarray-assisted size-effect study of amorphous silica nanoparticles on human bronchial epithelial cells. *Nanoscale*, 11(47):22907-22923
- Liang XW, Xu ZP, Grice J, Zvyagin AV, Roberts MS & Liu X (2013) Penetration of nanoparticles into human skin. *Curr Pharm Des* 19(35):6353-6366.
- Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, Rani PU, Weiss C, Tomer Y, Vink A, Renauld J, Van Snick J, Nicolaides NC, Levitt RC & Haczku A (2001) Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. *Blood* 97(4):1035-1042.
- Lu F, Ruiz J & Astruc D (2004) Palladium–dodecanethiolate nanoparticles as stable and recyclable catalysts for the Suzuki–Miyaura reaction of aryl halides under ambient conditions. *Tetrahedron letters* 45(51):9443-9445.
- Luong D, Kesharwani P, Deshmukh R, Mohd Amin MCl, Gupta U, Greish K, Iyer AK, (oct 2016) PEGylated PAMAM dendrimers : Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. *Acta Biomater.* 43:14-29.
- Ma X, He D, Jones AM, Waite TD, An T (Mar 2019) Ligand-mediated contaminant degradation by bare and carboxymethyl cellulose-coated bimetallic palladium-zero valent iron nanoparticles in high salinity environments. *J Environ Sci.* 77:303-311.
- Matsumoto K, Ogasawara T, Kato A, Homma T, Iida M, Akasawa A, Wakiguchi H & Saito H (2003) Eosinophil degranulation during pregnancy and after delivery by cesarean section. *International archives of allergy and immunology* 131(Suppl. 1):34-39.
- Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Wagner N, Crossman MW, Foster PS & Rothenberg ME (2002) Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking. *J Biol Chem* 277(6):4406-4412.
- Miyaura N & Suzuki A (1995) Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical reviews* 95(7):2457-2483.
- Morgenroth F, Reuther E & Müllen K (1997) Polyphenylene dendrimers: From three-dimensional to two-dimensional structures. *Angewandte Chemie International Edition in English* 36(6):631-634.
- Mortimer G, Deng ZJ, Schiller T, Musumeci A, Martin D & Minchin RF (2009) Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20(45):455101.
- 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.

- Oberdorster G (2010) Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267(1):89-105.
- Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D & Yang H (2005a) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology* 2:8.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005b) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 113(7):823-839.
- Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A & Moqbel R (2004) Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173(10):5909-5913.
- Oei AL, Korangath P, Mulka K, Helenius M, Coulter JB, Stewart J, Velarde E, Crezee J, Simons B, Stalpers LJA, Kok HP, Gabrielson K, Franken NAP, Ivkov R (nov 2019) Enhancing the abscopal effect of radiation and immune checkpoint inhibitor therapies with magnetic nanoparticle hyperthermia in a model of metastatic breast cancer. *Int J.Hyperthermia.* 36 (sup1) : 47-63.
- Ostaszewska T, Chojnacki M, Kamaszewski M, Sawosz-Chwalibog E, (2016) Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(2):1621-33
- Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L, Cloutier Y, Trottier M, Boutin M, Antoum M & Normand C (2006a) Les nanoparticules, Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail. *IRSST:90.*
- Ostiguy C, Roberge B, Woods C & Soucy B (2010) Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. rapport R-646:159.
- Ostiguy O, Lapointe G, Ménard L, Cloutier Y, Trottier M, Boutin M, Antoum M & Normand C (2006b) Les nanoparticules : connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. R-45S:90.
- Ott LS & Finke RG (2007) Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: a critical review of ranking methods and putative stabilizers. *Coordination Chemistry Reviews* 251(9):1075-1100.
- Padigel UM, Hess JA, Lee JJ, Lok JB, Nolan TJ, Schad GA & Abraham D (2007) Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis* 196(12):1844-1851.
- Pan YT, Smith CE, Kwok KS, Chen J, Kong H & Yang H (2015) Functionalized ultrathin palladium nanosheets as patches for HepG2 cancer cells. *Chem Commun (Camb)* 51(75):14171-14174.
- 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.

- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173(12):7521-7530.
- Peterson J, Allikmaa V, Subbi J, Pehk T & Lopp M (2003) Structural deviations in poly (amidoamine) dendrimers: a MALDI-TOF MS analysis. *European Polymer Journal* 39(1):33-42.
- Poirier M, Simard JC, 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(4):404-412.
- 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.
- Poole JC & Owens F (2003) *Introduction to nanotechnology*. John Wiley and sons inc., Hoboken, New Jersey
- Richardson SC, Pattrick NG, Stella Man Y, Ferruti P & Duncan R (2001) Poly (amidoamine) s as potential nonviral vectors: ability to form interpolyelectrolyte complexes and to mediate transfection in vitro. *Biomacromolecules* 2(3):1023-1028.
- Riegert-Johnson DL, Godfrey JA, Myers JL, Hubmayr RD, Sandborn WJ & Loftus EV, Jr. (2002) Delayed hypersensitivity reaction and acute respiratory distress syndrome following infliximab infusion. *Inflamm Bowel Dis* 8(3):186-191.
- Robertson SA, Mau VJ, Young IG & Matthaei KI (2000) Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5-deficient mice. *J Reprod Fertil* 120(2):423-432.
- Roessler BJ, Bielinska AU, Janczak K, Lee I & Baker JR (2001) Substituted  $\beta$ -cyclodextrins interact with PAMAM dendrimer–DNA complexes and modify transfection efficiency. *Biochemical and biophysical research communications* 283(1):124-129.
- Rothenberg ME & Hogan SP (2006) The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24:147-174.
- Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB & Hogan SP (2001) Gastrointestinal eosinophils. *Immunological reviews* 179(1):139-155.
- Rothenberg ME, Owen WF, Silberstein DS, Soberman RJ, Austen KF & Stevens RL (1987) Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. *Science* 237(4815):645-647.
- Roucoux A, Schulz J & Patin H (2002) Reduced transition metal colloids: a novel family of reusable catalysts? *Chemical reviews* 102(10):3757-3778.
- Rupp R, Rosenthal SL & Stanberry LR (2007) VivaGel™(SPL7013 Gel): A candidate dendrimer-microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *International journal of nanomedicine* 2(4):561.
- Sabourin V (2014) Nanotechnologies : market dynamic and opportunities. *IJIRTS* volume 3, number 1:7.
- Sanchez VC, Pietruska JR, Miselis NR, Hurt RH & Kane AB (2009) Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials: what have we

- learned from asbestos? *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 1(5):511-529.
- Satoh T, Knowles A, Li MS, Sun L, Tooze JA, Zabucchi G & Spry CJ (1994) Expression of lacto-N-fucopentaose III (CD15)- and sialyl-Lewis X-bearing molecules and their functional properties in eosinophils from patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Immunology* 83(2):313-318.
- Schlager JJ, Schrand AM, Dai L & Hussain SM (2010) Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nature protocols* 5(4):744-757.
- Schnieder T, Jansson A, Jensen K, Kristjansson V, Luotamo M, Nygren O, Savolainen K, Skaug V, Thomassen Y, Tossavainen A, Tuomi T & Wallin H (2007) Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles. *NCM* 581:96.
- Senik D, Doyle D, McDougall G & Doyle J (2011) Étude sur le sous-secteur de la nanotechnologie : l'évolution de l'industrie canadienne de la nanotechnologie et ses conséquences futures sur la main d'oeuvre des TIC. in *CTIC*, p 6.
- Shaughnessy KH (2015) Palladium-catalyzed modification of unprotected nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides. *Molecules (Basel, Switzerland)* 20(5):9419-9454.
- Shaw OM, Nyanhanda T, McGhie TK, Harper JL & Hurst RD (2017) Blackcurrant anthocyanins modulate CCL11 secretion and suppress allergic airway inflammation. *Mol Nutr Food Res* 10.1002/mnfr.201600868.
- Shi HZ (2004) Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 76(3):520-527.
- Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC & Langer R (2010) Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters* 10(9):3223-3230.
- 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. *Toxicology letters* 259:11-20.
- Soussi-Gounni A, Kontolemos M & Hamid Q (2001) Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 107(4):575-582.
- Stark WJ (2011) Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50(6):1242-1258.
- Strek M & Leff A (1997) Eosinophils. *Asthma* 1:399-417.
- Sun TY, Gottschalk F, Hungerbühler K & Nowack B (2014) Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental pollution* 185:69-76.
- Svenson S & Tomalia DA (2005) Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Advanced drug delivery reviews* 57(15):2106-2129.
- Svensson L, Redvall E, Bjorn C, Karlsson J, Bergin AM, Rabiet MJ, Dahlgren C & Wenneras C (2007) House dust mite allergen activates human eosinophils via

- formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 1. *Eur J Immunol* 37(7):1966-1977.
- Svensson L & Wenneras C (2005) Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect* 7(4):720-728.
- Tai PC, Sun L & Spry CJ (1991) Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 85(2):312-316.
- Takanami I, Takeuchi K & Gika M (2002) Immunohistochemical detection of eosinophilic infiltration in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22(4):2391-2396.
- Tang MX, Redemann CT & Szoka FC (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate chemistry* 7(6):703-714.
- Tanigawa K, Sugiyama K, Matsuyama H, Nakao H, Kohno K, Komuro Y, Iwanaga Y, Eguchi K, Kitaichi M & Takagi H (1999) Mesalazine-induced eosinophilic pneumonia. *Respiration* 66(1):69-72.
- Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM & King CC (1995) Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *J Biol Chem* 270(7):2906-2913.
- Tomalia DA (2004) Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 37(2):39-57.
- Tomalia DA (2016) Special Issue: "Functional Dendrimers". *Molecules (Basel, Switzerland)* 21(8).
- Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, Capron A & Capron M (1991) Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol* 88(3 Pt 1):365-375.
- Toshima N & Yonezawa T (1998) Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications. *New Journal of Chemistry* 22(11):1179-1201.
- Tracey MP, Pham D & Koide K (2015) Fluorometric imaging methods for palladium and platinum and the use of palladium for imaging biomolecules. *Chem Soc Rev* 44(14):4769-4791.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH, (2009), Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Molecular biology, pathobiology, and genetics*. DOI:10.1158/0008-5472.
- Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A & Capron M (1993) IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol* 23(12):3230-3235.
- Tully DC & Frechet JMJ (2001) Dendrimers at surfaces and interfaces: chemistry and applications. *Chemical Communications* 10.1039/B104290B(14):1229-1239.
- U.S. Government RD (2017) *National Nanotechnology Initiative.*, <http://www.nano.gov/>

- Ulrich M, Petre A, Youhnovski N, Promm F, Schirle M, Schumm M, Pero RS, Doyle A, Checkel J, Kita H, Thiyagarajan N, Acharya KR, Schmid-Grendelmeier P, Simon HU, Schwarz H, Tsutsui M, Shimokawa H, Bellon G, Lee JJ, Przybylski M & Doring G (2008) Post-translational tyrosine nitration of eosinophil granule toxins mediated by eosinophil peroxidase. *J Biol Chem* 283(42):28629-28640.
- Valerius T, Repp R, Kalden JR & Platzer E (1990) Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines. A novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145(9):2950-2958.
- van Driel WJ, Kievit-Tyson P, van den Broek LC, Zwinderman AH, Trimbos BJ & Fleuren GJ (1999) Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. *Gynecol Oncol* 74(2):188-195.
- Van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ, Silver JE, Dennin R & Abrams JS (1991) Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. *Blood* 78(6):1538-1544.
- Vinogradova EV, Zhang C, Spokoyny AM, Pentelute BL & Buchwald SL (2015) Organometallic palladium reagents for cysteine bioconjugation. *Nature* 526(7575):687-691.
- Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R & Moiemmen NS (2007) The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 33(8):979-985.
- Wang B, Zhang X, Jia X, Li Z-C, Ji Y, Yang L & Wei Y (2004) Fluorescence and aggregation behavior of poly (amidoamine) dendrimers peripherally modified with aromatic chromophores: the effect of dendritic architectures. *Journal of the American Chemical Society* 126(46):15180-15194.
- Wang JS, Chiu K (May 2009) Destruction of pentachlorobiphenyl in soil by supercritical CO(2) extraction coupled with polymer-stabilized palladium nanoparticles. *Chemosphere*. 75(5):629-633.
- Wang H, Wu F, Meng W, White JC, Holden PA & Xing B (2013a) Engineered nanoparticles may induce genotoxicity. *Environmental science & technology* 47(23):13212-13214.
- Wang Y, Boros P, Liu J, Qin L, Bai Y, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR, Jr. & Bromberg JS (2000) DNA/dendrimer complexes mediate gene transfer into murine cardiac transplants ex vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2(6):602-608.
- Wang Y, Chen Z, Ba T, Pu J, Chen T, Song Y, Gu Y, Qian Q, Xu Y, Xiang K, Wang H & Jia G (2013b) Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 9(9-10):1742-1752.
- Wardlaw AJ, Moqbel R & Kay AB (1995) Eosinophils: biology and role in disease. *Advances in immunology* 60:151-266.

- Widegren JA & Finke RG (2003) A review of soluble transition-metal nanoclusters as arene hydrogenation catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 191(2):187-207.
- Wills-Karp M (1999) Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual review of immunology* 17(1):255-281.
- Wise JP, Sr., Wise SS, Goodale BC, Shaffiey F, Kraus S & Walter RB (2009) Medaka (*Oryzias latipes*) as a sentinel species for aquatic animals: Medaka cells exhibit a similar genotoxic response as North Atlantic right whale cells. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 149(2):210-214.
- Woerly G, Decot V, Loiseau S, Loyens M, Chihara J, Ono N & Capron M (2004) CD28 and secretory immunoglobulin A-dependent activation of eosinophils: inhibition of mediator release by the anti-allergic drug, suplatast tosilate. *Clin Exp Allergy* 34(9):1379-1387.
- Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A & Takatsu K (1988) Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167(5):1737-1742.
- Yamamoto S, Hamasaki Y, Ishii E, Ichimaru T & Miyazaki S (1997) Unbalanced production of interleukin-5 and interleukin-2 in children with atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 78(5):517-523.
- Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, Michalek SM, Rosenberg HF, Zhang N & Oppenheim JJ (2008) Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 205(1):79-90.
- Yang H & Kao WJ (2006) Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of biomaterials science, polymer edition* 17(1-2):3-19.
- Yeung LK & Crooks RM (2001) Heck heterocoupling within a dendritic nanoreactor. *Nano letters* 1(1):14-17.
- Zerrad. L (2010) *Propriétés structurales et associations en solution des dendrimères polyamidoamine (PAMAM)*. doctorat (Université de la méditerranée- aix-marseilles II). 261 p
- Zhang J, Lathbury LJ & Salamonsen LA (2000) Expression of the Chemokine Eotaxin and Its Receptor, CCR3, in Human Endometrium 1. *Biology of reproduction* 62(2):404-411.
- Zhang Y, Guo R, Wang D, Sun X, Xu Z (apr 2019) Pd nanoparticle-decorated hydroxy boron nitride nanosheets as a novel drug carrier for chemo-photothermal therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 176:300-308.
- Ziemba B, Matuszko G, Bryszewska M & Klajnert B (2012) Influence of dendrimers on red blood cells. *Cellular & molecular biology letters* 17(1):21-35.
- Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N & Dobrovolskaia MA (2010) Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151(2):458-465.