

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**LES ÉOSINOPHILES HUMAINS : DES CIBLES DIRECTES DES
NANOPARTICULES DE PALLADIUM**

Par
Pascal Chhay

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade 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

M. Martin Pelletier, PhD
Université Laval

Directeur de recherche

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

Page volontairement blanche

CHAPITRE 4: ACTIVATION OF HUMAN EOSINOPHILS WITH PALLADIUM NANOPARTICLES (PD NPS): IMPORTANCE OF THE ACTIN CYTOSKELETON IN PD NPS-INDUCED CELLULAR ADHESION	53
4.1 Présentation de l'article.....	53
4.2 Activation of human eosinophils with palladium nanoparticles (Pd NPs): importance of the actin cytoskeleton in Pd NPs-induced cellular adhesion.	55
4.2.1 Abstract.....	55
4.2.2 Introduction.....	56
4.2.3 Materials and Methods.....	58
4.2.4 Results	61
4.2.5 Discussion.....	72
4.2.6 Conclusion	74
4.2.7 Acknowledgment.....	75
4.2.8. References	75
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION	79
Références.....	86
Annexe.....	107

Remerciements

En mémoire de mon père. Tu as vu ton p'tit gars grandir et persévérer dans ses études malgré les pentes parfois abruptes. Aujourd'hui, c'est le même sourire que tu portais si bien qui m'habite : je suis fier. Fier d'avoir été contre le courant et les dissuasions, fier de faire à ma tête, fier d'être rendu où je suis, fier d'être celui qui tourne la page à sa maîtrise. Mais ce sentiment si chaleureux, rarement occupé, ne sera jamais saturé sans ta présence. Lorsqu'on pense au temps qui défile, c'est incroyable. On s'embarque dans une aventure qui, malgré les quelques accrochages, nous mène vers une finalité amère. Amère dans le sens où les souvenirs partagés avec les personnes que nous côtoyons au courant de notre parcours ne seront plus aussi tangibles. On se contente donc de se remémorer le bon vieux temps; ces souvenirs n'évoqueront désormais qu'un arrière-goût enjoué.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche du fond du cœur, le Pr. Denis Girard. Tu as su former un jeune étudiant sérieux et soucier en un humoriste accompli. Vieux fou, merci pour ta confiance, pour ton aide si précieuse et pour m'avoir pris sous ton aile. Je t'en serais éternellement reconnaissant et c'est avec ma motivation la plus sincère que je poursuis au doctorat au sein de ton équipe.

Je dois la réussite de mon parcours académique à un professeur en particulier qui m'a contaminé avec sa passion pour la biologie. En plus d'avoir été un mentor exceptionnel, tu as su me former en tant que futur enseignant. Merci infiniment, François Lareau, pour ta contribution dans mon parcours.

Également, c'est avec honneur que je tiens à rendre grâce aux organismes subventionnaires suivants: CRSNG et FQRNT sans qui l'ampleur de cette maîtrise n'aurait pas été aussi éloquente.

Quant à mes collègues de travail, je tiens également à vous dire merci. Vous avez rayonné mon quotidien au courant de mon séjour. Rigolade, souffle coupé et fous rires, vous étiez la raison de mon ivresse euphorique! Un énorme merci aux personnes suivantes : Francis Vallières, Maxime Murphy-Marion, Isabelle Durocher, Jean-Christophe Simard, Guillaume Ricaud et Merve Kulbay.

Il y a mille façons d'exprimer sa gratitude, mille façons de formuler une phrase et pourtant, à cet instant, on dirait que seul l'alphabet n'est pas assez pour dire merci. Dominique Mirault, tu été une influence et une collègue exceptionnelle. Je ne te remercierai jamais assez pour ta contribution non seulement dans mon cheminement, mais également dans ma vie. Sans toi et Migou, jamais je n'aurai cru que la science pouvait être aussi plaisante et dangereuse.

Je désire également remercier quelques personnes proche qui, sans eux, mon succès n'en vaudrait pas la peine d'être prononcé. Dans un premier temps, je remercie infiniment ma mère qui m'a encouragé tout au long de mon parcours. Tu as toujours été là pour moi même si parfois je n'étais pas facile à suivre. Merci pour ta patience, pour tout ton aide, mais surtout pour ton amour inconditionnel. Je te dois une fière chandelle. Je tiens également à remercier mon beau-père et ma sœur. Je tiens aussi à remercier mes amis les plus fidèles même si l'on s'est perdu de vu à quelques reprises. On s'en boira une « frette » bientôt! Sébastien Plamondon, Simon D. Bélanger et Kevinnick Pong, merci d'avoir été indulgent et patient à mon égard. Je dois également une place à mon cousin, Pierre-Philippe Chhay. Merci pour ton écoute et tes conseils. Quoi qu'il en soit, même si la distance nous fragmente, je saurai toujours sur qui compter ne serait-ce que pour discuter du beau temps. Je dois également un grand merci à mon amoureuse, Melodie Jalbert, qui m'a supporté durant la dernière année de ma maîtrise. Nous avons consommé les moments les plus fous et uniques et, malgré que je clos ce volet mémorable de mon parcours, j'apprivoise ce que le futur nous réserve avec allégresse.

Liste des abréviations

5-KETE : <i>5-Oxo-eicosatetraenoic acid</i>	FAB: <i>Fragment antigen binding</i>
ADN : Acide désoxyribonuléique	FAK: <i>Focal adhesion kinase</i>
ALS : Sclérose latérale amyotrophique	GM-CSF: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
AML : Leucémie myéloïde aigue	GPCRs : Récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G
ARN : Acide ribonucléique	GTP : Guanine triphosphate
Arp (...) : Protéines associées à l'actine	H2O2 : Peroxyde d'hydrogène
ATP: Adénosine Triphosphate	HOCl : Acide hypochlorite
Ca: Calcium	ICAM-1 : Molécules d'adhésion intercellulaires
CCL: Chimioking ligands	Ig (...) : Immunoglobuline
CD (...) : <i>Cluster of differentiation</i>	LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen
CMH (...) : Complexe majeur d'histocompatibilité	LIR7 : Récepteurs d'immunoglobuline-like 7
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes	LPS : Lipopolysaccharide
CR3 : Récepteur du complément 3	LTB : <i>Lymphotoxin-beta</i>
CXCL(...) : Chimiokine	LTB4 : Leucotriène B4
DAMPs : Motif moléculaire associés aux dommages cellulaires	LYN: <i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
DLS: <i>Dynamic light scattering</i>	MAPK : <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
DOX: Doxorubicine	MBP : Protéines majeures basiques 1 et 2
DUOX : <i>Dual oxydase</i>	MFAP : Protéines associées aux microfilaments
ECP : Protéines cationiques éosinophiliques	MMPs : Métalloprotéinases
EDN : Neurotoxines dérivées des éosinophiles	NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
EoP : Progéniteur éosinophilique	NK : <i>Natural killer</i>
EoSV : <i>Eosinophil sombrero vesicles</i>	ONOO ⁻ : Peroxynitrite
EPO : Peroxydases éosinophiliques	
ERK: <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>	

PAF : Facteur d'activation des plaquettes

PAMP: *Pathogen associated molecular patterns*

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PKC: Protéine kinase C

PRR : *Pattern recognition receptor*

PSGL1 : Glycoprotéiques des P-sélectines

PSGL-1 : P-sélectines ligands glycoprotéiques 1

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

RNase : Ribonucléase

RNS : Dérivés réactifs de l'azote

ROCK : *Rho-associated protein kinase*

ROS : Espèces oxygénées réactives

SFK: *Src family of protein tyrosine kinases*

SNARE (...): *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*

TGF: *Tumor growth factor*

Th2: Lymphocyte T auxiliaire 2

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: *Tumor necrosis factor*

VCAM-1: Molécules d'adhésion vasculaires

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VLA 4: *Very Late Antigen 4*

ZnO : Oxyde de zinc

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1. Étapes subséquentes au recrutement des neutrophiles au foyer infectieux.

Figure 2 : Les éosinophiles orchestrent l'activation de plusieurs leucocytes par l'entremise de la libération de cytokines.

Figure 3: Représentation de différents types de sécrétion chez les éosinophiles humains où (A) représente l'exocytose classique et, en contrepartie, B et C représentent la dégranulation de type *piece meal*.

Figure 4 : Représentation des NP de Pd selon leur construction nuancée.

Liste des tableaux

Tableau I : Sommaire des principaux médiateurs libérés par les éosinophiles.

Tableau II : Principaux ligands et leurs récepteurs des éosinophiles.

Résumé

L'exploitation des nanoparticules (NP) ne cesse de croître. En dépit de leur utilisation due à différentes caractéristiques attrayantes pour la biologie, la médecine, l'aérospatiale et bien plus, la toxicité de ces nanomatériaux demeure lacunaire. En particulier, les NP de palladium (Pd) ont émergé dans les fabrications automobiles notamment dues à leur propriété catalytique. Cependant, il en demeure que trop peu de recherche focalisent sur l'interaction entre ces NP et les cellules du système immunitaire, encore moins sur les granulocytes.

Les études œuvrées au sein de notre laboratoire sont orientées à savoir les effets de certaines NP sur les granulocytes, particulièrement les neutrophiles. En ce sens, il a été démontré que les effets, malgré que les NP utilisés sont de même matière (ex. NP d'argent), agissent de façon paradoxale. En parallèle, les études en nano-immunobiologie sur les éosinophiles, soit des granulocytes dont leur implication dans les réponses immunitaires est loin d'être silencieuse, sont déficientes. Étant donné que la voie principale d'exposition aux NP de Pd est principalement par inhalation et sachant que les éosinophiles orchestrent la réponse allergique des voies respiratoires ne serait-ce que par leur recrutement ou encore, par la libération de médiateurs, l'objectif consiste à déterminer si les éosinophiles humains sont des cibles directes des NP de Pd.

À travers les résultats obtenus pour ce présent projet, nous démontrons que les NP de Pd ciblent directement les éosinophiles en modulant certaines fonctions, et non pas toutes, qui sont fondamentales. Les NP de Pd ne sont pas cytotoxiques, provoquent une polymérisation du réseau d'actine tout en induisant la relocalisation des filaments qui le constitue, affecte l'adhésion cellulaire sur les cellules endothéliales à la hausse et ne cause pas la libération de ROS.

Somme toute, les éosinophiles et leur modèle cellulaire sont des cibles pour les NP de Pd et, bien que les effets répertoriés ne soient pas exhaustifs, ils se doivent d'être tenus compte dans leur commercialisation. La compréhension de l'exposition véritable à ces agents demeure déficiente, mais les recherches avancées par ce présent projet contribuent à la compréhension des cibles cellulaires et moléculaires des NP de Pd.

Page volontairement blanche

CHAPITRE 1 : LE SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ, L'INFLAMMATION ET LA PHYSIOLOGIE DES GRANULOCYTES

1.1 Le système immunitaire inné

La défense immunitaire a pour but de circonscrire l'invasion des agents exogènes. Cette ligne de défense harmonise deux sous-systèmes, soit le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. D'une part, le premier permet une reconnaissance générale et l'élimination de tout agent étranger tandis que le deuxième fait appel à des mécanismes plus spécifiques. Malgré leur divergence quant à reconnaissance et à l'élimination des pathogènes, les deux sous-systèmes communiquent entre eux de sorte à synchroniser une réponse immunitaire adéquate. Cependant, pour l'intérêt de ce présent mémoire, seul le système immunitaire inné sera détaillé.

1.1.1 Caractéristiques du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné consiste en une réponse non spécifique qui est mise en relief lorsque les pathogènes échappent aux barrières anatomiques et physiologiques. Il permet la distinction des antigènes du soi et du non-soi tout en s'assurant de limiter l'étendue des dégâts immunitaires chez l'hôte (Chaplin, 2010). Entre autres, la peau, le mucus qui tapisse les voies digestives et aériennes, l'acidité de l'estomac, les lysozymes lacrymaux, la salive et d'autres sécrétions correspondent à de telles barrières indispensables (Janeway *et al.*, 2002b). En revanche, lorsque ces barrières n'arrivent pas à appréhender les pathogènes, le système immunitaire sollicitera l'aide des cellules du système immunitaire inné. Parmi celles-ci, les granulocytes constituent la population majoritaire qui migre au sein du foyer infectieux en répondant à un large éventail de cytokines et de chimiokines. Cette population est composée de plusieurs types cellulaires qui possèdent, entre autres, la capacité de phagocyter les corps étrangers via des récepteurs membranaires et cytoplasmiques reconnaissant les motifs antigéniques (PRR). L'une des particularités de celles-ci correspond à leur capacité de reconnaître un large spectre de motifs antigéniques associés aux pathogènes (PAMPs) qui ont été conservés au courant de l'évolution de façon non spécifique de sorte à fournir une réponse rapide (Chaplin, 2010). Parmi ceux-ci, les récepteurs Toll (TLRs), les récepteurs RIG-1 (RLRs), les récepteurs Nod (NLRs) et des récepteurs cytoplasmiques à ADN permettent la reconnaissance, puis le déclenchement d'une alerte immunologique en agissant via les protéines kinases. Conséquemment, l'activation de celles-ci

cause rapidement un phénomène inflammatoire qui a pour but de limiter la propagation des dégâts d'origine exogène (Dunne *et al.*, 2003, Janeway *et al.*, 2002a, Kaisho *et al.*, 2002). Pour l'intérêt de ce mémoire, seule la population granulocytaire sera définie, particulièrement celle des éosinophiles.

Brièvement, les neutrophiles représentent entre soixante et soixante-dix pour cent de la population leucocytaire chez l'humain, les définissant comme étant les leucocytes les plus abondants. Caractérisés par leur noyau polymorphonucléaire, les neutrophiles possèdent une courte durée de vie (24h) pendant laquelle ces derniers peuvent phagocyter, recruter d'autres cellules effectrices, libérer des réseaux extracellulaires à ADN, produire une production d'espèces oxygénées réactives (ROS) ou encore, libérer leurs granules contenant des enzymes cytolytiques de sorte à (Bjornsdottir *et al.*, 2015, Perobelli *et al.*, 2015, Smith, 1994). De surcroît, les neutrophiles correspondent à l'une des cellules intégrales de l'inflammation aiguë. Effectivement, ces derniers sont connus pour orchestrer une grande partie de cette réponse physiologique grâce à leur production accrue en cytokines pro-inflammatoires, immunorégulatrices, anti-inflammatoires, des facteurs de stimulation de colonies, ainsi qu'une variété de chimiokines (Bazzoni *et al.*, 2010, Ethuin *et al.*, 2004, Metcalf *et al.*, 1996, Pelletier *et al.*, 2010, Sadik *et al.*, 2011, Scapini *et al.*, 2000, Tamassia *et al.*, 2008).

Issues de la même cellule couche myéloblastique, les éosinophiles et les basophiles représentent une population minoritaire des granulocytes, soit d'un à trois pour cent et moins d'un pour cent respectivement. Étant donné que les éosinophiles consistent en un des points culminants de ce mémoire, le second chapitre sera dédié à ces cellules. Partageant plusieurs caractéristiques physiologiques et phénotypiques des mastocytes, telles que l'expression du récepteur FcεRI à forte affinité pour les IgE et la production d'histamine, les basophiles agissent comme modulateurs primaires, ainsi qu'amplificateurs de l'inflammation (S. J. Galli, 2000, K. D. Stone *et al.*, 2010b). Comme les mastocytes qui résident dans les tissus périphériques, les basophiles, nommées ainsi dû à la présence de granules basiques cytoplasmique, se développent dans la moelle osseuse, puis quittent pour la circulation en attendant d'être sollicités vers les tissus périphériques suite à une réponse allergique ou à la présence d'une menace parasitaire. Par contre, il est à souligner qu'à la différence des basophiles, les mastocytes mûrent résident davantage au niveau du tissu. L'un des rôles les plus importants de ces granulocytes est la production d'interleukine 4 (IL-4) qui stimule

et favorise l'activation, ainsi que la différenciation des cellules T auxiliaires (Th2) à partir de cellules T CD4⁺ naïves. À leur tour, ces cellules T différenciées produisent des cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) qui sont cruciales dans l'immunité antiparasitaire, ainsi que les réponses d'hypersensibilités (Paul *et al.*, 2010, J. Zhu *et al.*, 2010).

1.2 L'inflammation

L'inflammation est une réponse vitale suivant une blessure, une infection ou un traumatisme (Ward *et al.*, 1999). Il s'agit d'un processus immunitaire complexe qui se manifeste par les signes cardinaux suivants : rougeur, chaleur, œdème et douleur. En soi, l'inflammation est une réponse normale du système immunitaire inné qui a pour but de restreindre les dommages cellulaires et tissulaires (Hurley, 1972). Ce premier sous-système fait appel à la réponse cellulaire qui met en scène autant les cellules d'origine hématopoïétique et non hématopoïétique, ainsi qu'à la réponse humorale. Par exemple, les granulocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et cellules tueuses naturelles (NK) orchestrent la réponse cellulaire, alors que les composantes du complément ou encore, le phénomène d'opsonisation des pathogènes via les anticorps correspondent à une réponse humorale. Cette série d'opérations seconde les premiers événements inflammatoires qui s'instaurent d'abord par une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et une augmentation du débit sanguin. Ces événements sont rendus possibles, entre autres, grâce à l'activation des mastocytes. Lorsqu'activées par un peptide antigénique, ces leucocytes sécrètent plusieurs agents vaso actifs qui possèdent des propriétés pro inflammatoires, telles que l'histamine, des protéases, la prostaglandine D2, les leucotriènes, l'héparine et quelques cytokines (Dvorak, 1997, Froeschle *et al.*, 2002, Galli, 1993, Galli *et al.*, 2005, Holgate, 2000, Schwartz, 1987). Plus particulièrement, celles-ci synthétisent un éventail de cytokines (IL-1,2,5,6,8,9,13 et TNF), ainsi que le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) seulement quelques heures suivant la stimulation. Ensemble, ces éléments contribuent à favoriser la vasodilatation rendant les vaisseaux sanguins plus permissifs au recrutement des leucocytes. Dès lors, suivant le dénouement, deux types d'inflammation peuvent survenir: l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. Considérant que ce mémoire s'oriente principalement vers l'inflammation aiguë en tentant d'évaluer les répercussions d'une exposition aux NP chez les granulocytes, la description de la réponse inflammatoire aiguë sera privilégiée.

1.2.1 L'inflammation aigüe

Normalement, l'infection se résout naturellement par l'élimination de l'agresseur, ainsi que des acteurs inflammatoires qui ont contribué à la circonscription du pathogène, et ce, dans l'espoir de retrouver rapidement l'homéostasie au foyer infectieux. Ce processus physiologique normal se déclenche rapidement en quelques heures et entraîne plusieurs modifications physiologiques et cellulaires, telles que des modifications des réseaux vasculaires, l'infiltration cellulaire qui, elle-même, est modulée par les cytokines et chimiokines, l'amplification du recrutement leucocytaire par chimiotactisme, l'élimination de l'agresseur, l'initiation d'effets systémiques pour enfin se terminer optimalement par l'efferocytose (Ryan *et al.*, 1977).

La première étape du recrutement correspond à la détection des signaux précoces par les granulocytes. En particulier, les neutrophiles peuvent être activés et recrutés à partir de différents stimuli. Par exemple, les PAMP contient un large éventail de molécules regroupant de l'ADN, des protéines, des peptides N-formyle, des composantes de la matrice extracellulaire, de l'ATP et d'acide urique (Broggi *et al.*, 2015, Cordeiro *et al.*, 2013, de Oliveira *et al.*, 2016, Venereau *et al.*, 2015). De ce fait, suivant l'injure, un premier scénario proposé correspond à une réponse aux DAMPs qui, par conséquent, entraîne une activation de l'enzyme duoxase 1 (DUOX 1) exprimée chez les cellules épithéliales. Cette activation occasionne une augmentation d'un gradient crucial de peroxyde (H_2O_2) et cet accroissement permet d'oxyder la protéine SFK LYN chez le neutrophile qui, à son tour, déclenche une série de cascades signalétiques impliquant l'activation des protéines PI3K, RAC et ERK (Niethammer *et al.*, 2009). En définitive, cette activation module directement la migration des neutrophiles. En parallèle, cette augmentation de H_2O_2 stimule la production de ligands de la famille des chimiokines 8 (CXCL8), de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que de leucotriènes (LTB et 5-KETE). Ultimement, ces facteurs permettent de recruter les neutrophiles environnants. Afin que ces cellules parviennent au foyer inflammatoire, les neutrophiles en circulation migrent à travers la paroi endothéliale, un phénomène connu comme étant la transmigration. Contrairement aux neutrophiles résidents qui sont activés directement de façon autocrine et paracrine, les neutrophiles en circulation doivent être recrutés au foyer par des médiateurs solubles. Ce recrutement est rendu possible grâce aux cellules sentinelles, telles que les macrophages. Suivant la reconnaissance d'un pathogène, de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) ou de PAMPs, les macrophages résidents s'activent puis génèrent une réponse précoce en libérant des cytokines pro-inflammatoires (TNF-

α et l'IL-1). Ces facteurs solubles stimulent les cellules endothéliales vasculaires de façon à ce qu'elles expriment les molécules d'adhésion, telles que les molécules d'adhésion intercellulaires 1 (ICAM-1), les molécules d'adhésion vasculaires (VCAM-1) et E-sélectines (Thorp *et al.*, 1992). Il est également connu que les cellules endothéliales expriment les P-sélectines, ainsi que les ligands glycoprotéiques des P-sélectines (PSGL1) (Schmidt *et al.*, 2011). L'expression de ce large spectre de molécules adhérentes permet l'interaction entre les cellules endothéliales et les oligosaccharides composés de motifs sialyl Lewis^x retrouvés sur molécules d'adhésion des granulocytes, telles que LFA-1 et CR3, pour ainsi ralentir, puis freiner les leucocytes en circulation, tel qu'illustré à la figure 1 (Bevilacqua *et al.*, 1993, Ward *et al.*, 1999). À savoir, à l'exception des neutrophiles, les molécules d'adhésion VCAM-1 interagissent avec les intégrines (*Very Late Antigen*) VLA-4 chez les leucocytes activés (Ala *et al.*, 2003). Au fait, étant donné que l'adhésion consiste en une étape de première nécessité des éosinophiles, cette fonction sera détaillée davantage dans la section 2.1.3.1 du chapitre second. Suivant l'adhésion ferme, les leucocytes interagissent avec des protéines présentes sur les jonctions serrées telles que les protéines associées aux jonctions mêmes (ZO-1), les claudines et les occludines en plus des protéines adhérentes des jonctions serrées E-cadhérines et β et γ caténine (Dejana *et al.*, 2009, Vestweber *et al.*, 2009). Cette liaison transitoire avec les protéines de jonctions serrées permet aux granulocytes de transmigrer à travers la barrière endothéliale. Grâce à leur cytosquelette dynamique, ces myélocytes peuvent se restructurer en projetant des pseudopodes à travers les jonctions serrées, puis traverser pacifiquement les cellules endothéliales. Une fois arrivées au niveau de la matrice extracellulaire, les cellules digèrent celle-ci à l'aide de protéases, particulièrement les métalloprotéinases (MMPs), afin de se rendre au foyer infectieux (Fujisawa *et al.*, 1999, Sorokin, 2010). Suivant le recrutement d'une première vague de neutrophiles, une étape d'amplification subséquente permet de recruter une population importante de granulocytes. L'exécution de cette étape dépend d'un large panorama de cytokines et chimiokines, telles que CXCL2 (MIP-2), CXCL1 et CCL3 (Chou *et al.*, 2010, Nemeth *et al.*, 2016). Une fois au site infectieux, les granulocytes exercent plusieurs fonctions immunoprotectrices, puis meurent naturellement par apoptose. Cette mort cellulaire se déclenche suite à l'élimination du pathogène, et, grâce ce phénomène, les granulocytes peuvent être éliminés par les phagocytes professionnels afin de limiter l'inflammation au site d'invasion (Girard, 2015). Par conséquent, un dérèglement de l'apoptose peut causer des conséquences immunitaires graves. Lorsque le taux apoptotique des

granulocytes est élevé, une susceptibilité à l'invasion bactérienne est mise à l'avant, tandis qu'une diminution du taux apoptotique chez ceux-ci peut amplifier la réponse inflammatoire pouvant mener aux maladies auto-immunes (Duffin *et al.*, 2010, Girard, 2015, Savill, 1997). En parallèle, durant la résolution d'inflammation, la production de facteurs solubles pro inflammatoires est en répit, alors qu'une vague de facteurs solubles anti-inflammatoire (IL-10 et TGF- β) prend la relève (Fadok *et al.*, 1998). De ce fait, la compréhension du processus inflammatoire est cruciale afin de réduire ou de supprimer la réponse inflammatoire lorsque la réponse immunitaire est indésirée (rejet de greffe allographe) ou encore, exagérée (maladies auto-immunes) (Ward *et al.*, 1999).

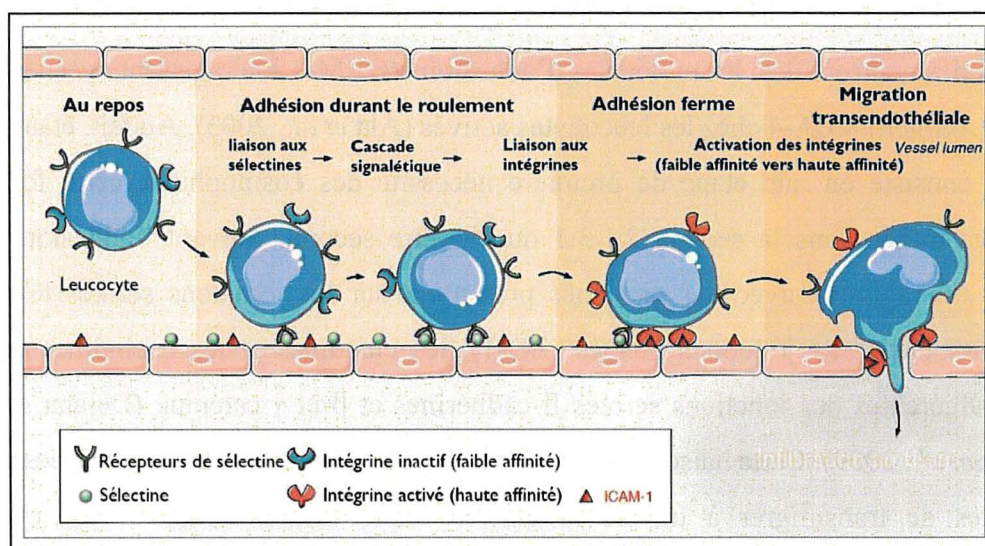


Figure 1. Étapes subséquentes au recrutement des neutrophiles au foyer infectieux. Adapté de (Lagarrigue *et al.*, 2016).

1.2.2 L'inflammation chronique

Malgré les efforts livrés par le système immunitaire, il est possible que les cellules du système immunitaire inné échouent leur fonction ou encore, résident au foyer malgré l'élimination du pathogène. La résilience des leucocytes au foyer inflammatoire empêche alors la résolution de l'inflammation aiguë, ce qui entraîne une série de complication physiologique qui peut s'étendre à travers des semaines, voire des années. C'est ce qui est connu comme étant l'inflammation chronique. Cette pathologie persistante est le résultat d'un échec de la résolution de l'inflammation aiguë et peut entraîner des conséquences sévères qui diffèrent selon la région physiologique concernée, telles que l'arthrite rhumatoïde, Lupus erythematosus systémique, sclérose en plaques, certains types de cancer, ainsi que l'asthme (Grivennikov *et al.*, 2010, Murdoch *et al.*, 2010, Straub *et al.*, 2016).

1.2.3 Allergies

Bien que le système immunitaire réplique à l'infiltration de pathogènes organiques, telles que les virus et les bactéries, cette défense peut également déclencher une réponse indésirable face à des agents environnementaux. En effet, le terme allergie correspond à une réponse immunitaire anormale dirigée contre les allergènes. Ces allergènes regroupent des composantes non infectieuses qui provoquent la production d'IgE issue de l'environnement tel que le gazon, le pollen, les particules de source animales, le latex, la nourriture, des composés médicamenteux et désormais les nanoparticules (NP) (Galli *et al.*, 2008, Larsen *et al.*, 2010b). La production de cette immunoglobuline sensibilise le sujet de sorte qu'une seconde exposition à la substance initiale déclenche une réaction allergique (Galli *et al.*, 2008). En général, cette production couplée à l'activation de cellules T auxiliaires 2 (Th2) caractérisent la pathologie. Il existe quatre types de réactions d'hypersensibilités dont chacune met en scène des acteurs clefs particuliers. Les réactions allergiques de type 1 impliquent les IgE produits par les mastocytes, alors que les réactions de type II et III mettent en relief les IgM ou les IgG qui sont issues des cellules possédant le récepteur Fc (Janeway *et al.*, 2009). Il existe également les allergies de type 4 qui impliquent les cellules T, puis les cellules effectrices. Suivant l'activation par les cellules Th1, les macrophages libèrent les facteurs solubles, alors qu'une activation par les cellules Th2 sollicite une réponse éosinophilique (Janeway *et al.*, 2009). Une activation par les cellules T cytotoxiques engendre un effet cytotoxique

généralisé (Janeway *et al.*, 2009). Étant donné que ce mémoire est centralisé sur les éosinophiles, la réponse d'hypersensibilité de type 4 impliquant les cellules Th2 sera mis de l'avant. Quelle que soit la réaction d'hypersensibilité, le déclenchement de cette réponse comporte trois phases.

La première étape correspond aux réactions de phase précoce où une réponse d'hypersensibilité de type 1 se manifeste dû à la présence d'IgE. Effectivement, les IgE se lient aux récepteurs FcεRI présents à la surface des mastocytes et des basophiles occasionnant leur activation et entraînent une libération de facteurs solubles (Kay, 2001, Kraft *et al.*, 2007). Ces médiateurs peuvent promouvoir le recrutement des leucocytes à la région concernée, ainsi que leur activation contribuant aux réactions de phase tardive (Kraft *et al.*, 2007). Cette réponse se produit en dedans de quelques minutes suivant l'exposition à l'allergène. Les conséquences peuvent soit être local (ex. épisode d'asthme aigu, urticaires) ou systémique (chocs anaphylactiques) et l'étendue des dommages varie de la vasodilatation jusqu'à la perte de fonction chez l'organe concerné (Galli *et al.*, 2008).

La seconde phase correspond aux réactions de phase tardive qui se développent entre deux à six heures et les effets atteignent leur apogée entre six et neuf heures suivant l'exposition à l'allergène. Elle correspond à la persistance des réactions de phase précoce et se caractérise spécifiquement par une accumulation locale et une activation des cellules Th2, des éosinophiles, des basophiles, ainsi que d'autres leucocytes en plus d'une production accrue de médiateurs persistants produits de novo par les cellules résidentes, tels que les mastocytes (Bonness *et al.*, 2007, Galli *et al.*, 2008, Kay, 2001).

La dernière phase consiste en l'instauration d'une inflammation chronique en réponse à un allergène. Lorsque les troubles d'hypersensibilités ne sont pas résolus dû à une exposition prolongée ou répétée, l'inflammation persiste et une accumulation de cellules issues du système immunitaire inné et adaptatif peut avoir lieu. Généralement, cette accumulation entraîne des modifications cellulaires qui, éventuellement, mènent à l'altération de la fonction de l'organe. Par exemple, dans le cas de l'asthme chronique, la dermatite atopique et la rhinite allergique, l'inflammation chronique cause un remodelage des tissus pouvant éventuellement perturber la fonction physiologique d'origine (Galli *et al.*, 2008, Leung *et al.*, 2004, Murdoch *et al.*, 2010, Pawankar *et al.*, 2004). D'ailleurs, ce remodelage peut être dû à la destruction involontaire du tissu environnant par les éosinophiles. De surcroît, les dépôts de protéines cationiques libérées par les

éosinophiles ont une fonction cytotoxique. En particulier, il a été démontré que les protéines basiques des éosinophiles (MBP) sont toxiques pour les cellules épithéliales des bronches et, comme de fait, ces MBP sont présents en quantité importante chez les patients qui ont succombé à l'asthme allergique chronique (Seminario *et al.*, 1994).

1.2.4 Contribution des éosinophiles : Un arsenal à double tranchant

Malgré qu'il existe plusieurs types d'allergies, tels que les chocs anaphylactiques, la rhinite et les allergies alimentaires, l'asthme et la dermatite topique suscitent un grand intérêt dû à l'implication des granulocytes, particulièrement les éosinophiles (Galli *et al.*, 2008). En effet, plusieurs évidences suggèrent une corrélation entre la présence d'éosinophiles et les pathologies inflammatoires (Gleich, 2000, Gleich *et al.*, 1979, Hernnas *et al.*, 1992, Martin *et al.*, 1996, Motojima *et al.*, 1989, Murdoch *et al.*, 2010, Pease *et al.*, 2001, Rankin *et al.*, 1992, Rosenberg *et al.*, 2007, Seminario *et al.*, 1994, Zagai *et al.*, 2007). Cette association s'explique par l'activation, la dégranulation, ainsi que le dépôt de protéines cationiques dans les tissus concernés. En effet, bien que la présence des éosinophiles est cruciale pour l'établissement d'une réponse inflammatoire, l'élimination d'un parasite ou d'un microorganisme par l'entremise de granules cytotoxiques et de production de radicaux libres, ces fonctions cellulaires sont également responsables des dommages histologiques qui surviennent lors des réactions allergiques, telles que l'asthme et le syndrome d'hyperéosinophilie (Gleich *et al.*, 1979). Il est à noter que l'asthme aigu est conséquence de l'activation des éosinophiles par la sécrétion d'IgE suivant l'activation des mastocytes et, lorsque persistant, l'asthme chronique est déclenché par l'activation des cellules Th2 qui activent à leur tour les éosinophiles (Janeway *et al.*, 2009). De ce fait, des thérapies exploitant désormais l'utilisation anti-IL5, activateurs classiques des éosinophiles, ont su diminuer le taux de ces granulocytes chez les asthmatiques, ce qui contribue à l'amélioration des symptômes liés à cette pathologie inflammatoire (Haldar *et al.*, 2009, Rosenberg *et al.*, 2007). En revanche, il est capital de mentionner que la présence des éosinophiles est absolument cruciale dans le développement de l'inflammation allergique des voies respiratoires, tel que démontré par des souris C57BL/6 transgéniques dépourvues de ces granulocytes. Effectivement, ceux-ci ont un rôle important dans le recrutement des cellules Th2 grâce à leur production de cytokines pro-inflammatoires, tel qu'illustré à la figure 2 (Jacobsen *et al.*, 2008, Walsh *et al.*, 2008). À leur tour, les cellules Th2 sécrètent les cytokines pro-inflammatoires qui permettent de moduler la réponse d'hypersensibilité. Par exemple, l'IL-4 est sécrétée pour réguler la commutation des IgE chez les

cellules B, alors que l'IL-5 permet d'activer et de recruter les éosinophiles tout en assurant leur survie (Barnes, 2001, Ngoc *et al.*, 2005, Steinke *et al.*, 2001). Quant à l'IL-13, celui-ci est responsable de l'inflammation et de la réponse d'hypersensibilité des voies respiratoires, d'augmenter la sécrétion de mucus, d'entraîner une fibrose subépithéliale en plus de causer l'augmentation de la production d'éotaxine, une puissante chimiokine nécessaire au recrutement des éosinophiles (Eum *et al.*, 2005, Pease *et al.*, 2001, Zhu *et al.*, 1999). Ainsi, la compréhension de l'implication des éosinophiles dans les pathologies inflammatoires des voies aériennes est inéluctable en recherche clinique.

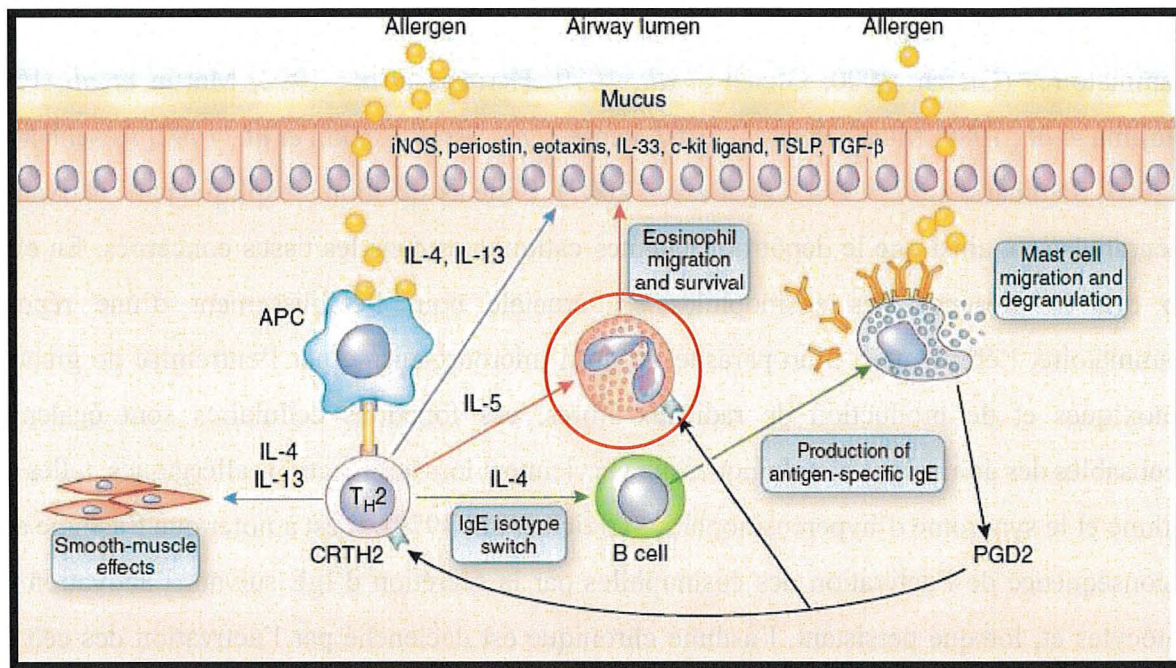


Figure 2. Les éosinophiles orchestrent l'activation de plusieurs leucocytes par l'entremise de la libération de cytokines. Adapté de (Wenzel, 2012).

CHAPITRE 2 : LES ÉOSINOPHILES

2.1 la maturation et le développement des éosinophiles

Ces cellules du système immunitaire inné naissent à partir de cellules souches multipotentes hématopoïétiques. En effet, ces cellules se différencient d'abord en progéniteurs communs myéloïdes, soit les myéloblastes regroupant les basophiles et les éosinophiles, puis, grâce à des facteurs de transcription additionnés aux médiateurs solubles, ces myéloblastes se différencient en progéniteurs dédiés vers une lignée éosinophilique (EoP) pour, éventuellement, en devenir des éosinophiles (Boyce *et al.*, 1995). Les EoP se distinguent de leur progéniteur par l'expression maintenue des récepteurs CD34, du récepteur IL-5 alpha (IL-5R α) et de CD117 et leur développement se situe principalement au sein de la moelle osseuse (Fulkerson *et al.*, 2014). La maturation des EoP résulte en un précurseur éosinophilique qui maintient la capacité proliférative tout en exprimant les marqueurs de surface IL-5R α et Siglec-F⁺ (Fulkerson *et al.*, 2014). Le dernier stade de maturation donne naissance aux éosinophiles exprimant les récepteurs précédents additionnés aux CCR3 (IL-5R α /Siglec-F⁺ /CCR3⁺) (Mori *et al.*, 2009, Voehringer *et al.*, 2007).

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation de ces cellules. D'abord, une expression accrue du promoteur PU.1 permet de commuter les cellules souches hématopoïétiques vers la lignée myéloïde en réprimant partiellement le promoteur lymphoïde GATA-1 (McNagny *et al.*, 2002, Nerlov *et al.*, 1998a). Quoique réprimé, le facteur de transcription GATA-1 est indispensable pour la différenciation des éosinophiles durant la myélopoïèse de telle sorte qu'il reprogramme les cellules de cordon ombilical CD34⁺ en éosinophiles chez les humains (Hirasawa *et al.*, 2002, Yamaguchi *et al.*, 1998). Parallèlement, le promoteur C/EBP permet la différenciation des cellules myéloïdes en éosinophiles (Nerlov *et al.*, 1998b). Ce même promoteur influence également la maturation des éosinophiles : alors qu'une activation partielle des progéniteurs permet de différencier les éosinophiles matures des éosinophiles immatures, une activation persistante force la maturation de ces granulocytes (Nerlov *et al.*, 1998b). En revanche, une dérégulation de ce facteur de transcription occasionne le développement abrupt de la leucémie myéloïde aigüe (Pabst *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, malgré l'importance de l'expression synergique de ces éléments, aucun facteur de transcription sélective aux éosinophiles n'a été déterminé. Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription XBP1 était propre à la différenciation des éosinophiles. En effet, l'importance de ce facteur de transcription a été mise de

l'avant à partir de souris transgéniques et de culture cellulaire (Bettigole *et al.*, 2015). Lorsque XBP1 était réprimé, les cellules myéloïdes échouent leur différenciation en éosinophiles sans influencer le sort des autres granulocytes. XBP1 est reconnu pour orchestrer un large éventail de cibles reliées au stress du réticulum endoplasmique. Entre autres, il est connu que le réticulum endoplasmique permet la régulation du calcium intracellulaire, de la biosynthèse des lipides, du repliement adéquat des protéines, ainsi que des modifications post-traductionnelle chez les cellules (Schwarz *et al.*, 2016). Or, durant la maturation des éosinophiles, ceux-ci sont confrontés à une production majeure de protéines qui, plus tard, seront séquestrées dans les granules respectifs. Cette production force les cellules à s'adapter aux alertes en provenance du RE et hormis les éosinophiles, l'absence ou la répression de ce gène n'entraîne pas la mort cellulaire démontrant son importance dans le développement des éosinophiles (Bettigole *et al.*, 2015, Shen *et al.*, 2015).

De concert avec les facteurs de transcription, les médiateurs solubles assurent également le développement, la différenciation et la maturation des éosinophiles. Parmi ceux-ci, les activateurs classiques des éosinophiles, soit l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF, participent au développement de ces derniers au sein de la moelle osseuse. Produit par les cellules Th2, l'IL-5 influence spécifiquement le développement des éosinophiles et, par conséquent, est reconnu comme étant un régulateur critique dans l'éosinophilie (Clutterbuck *et al.*, 1989). De concert avec l'éotaxine, soit le ligand des récepteurs CCR3, ces deux cytokines contribuent à la mobilisation des éosinophiles hors de la moelle osseuse et, lors des réactions allergiques, l'expression de ces derniers favorise le recrutement intensif de ces cellules dans les tissus concernés (Bouchaib Lamkhioued *et al.*, 2003, B. Lamkhioued *et al.*, 1997). De plus, suivant la maturation et le développement de ces granulocytes, l'influence de l'IL-5 sur ces derniers inhibe l'apoptose des éosinophiles matures en inactivant la protéine Bid, ce qui explique certains phénomènes émergents de l'éosinophilie (Segal *et al.*, 2007). Évidemment, l'activation de ces granulocytes peut s'effectuer par d'autres cytokines, telles que l'IL-13 et l'IL-4. En effet, il a été démontré que ces deux cytokines favorisent l'expression d'éotaxine en plus de VCAM-1 et, par conséquent, favorisent le recrutement des éosinophiles au niveau des muqueuses (Rosenberg *et al.*, 2007).

2.1.1 Importance et rôle des éosinophiles dans l'inflammation

Étant donné que les fonctions principales des éosinophiles seront détaillées dans la section 2.1.3, ce paragraphe sera axé sur la contribution de ces granulocytes dans l'inflammation par l'entremise de médiateurs cellulaires. De façon similaire aux neutrophiles, le recrutement des éosinophiles matures au site inflammatoire s'effectue selon les étapes préalablement détaillées dans la section 1.2.2. Suivant la maturation des éosinophiles dans la moelle osseuse, une fraction de ces granulocytes, quoique peu nombreux, peuvent soit migrer et résider vers l'intestin, les organes respiratoires, le cœur, le système neurologique et les organes lymphoïdes (Aceves *et al.*, 2008, Akuthota *et al.*, 2015, Janz *et al.*, 2009, Ogbogu *et al.*, 2007). Suivant le recrutement de ceux-ci par les activateurs classiques, l'activation des éosinophiles mène à la sécrétion de plus de 35 cytokines, chimiokines et facteurs de croissance contribuant à la réponse inflammatoire (Davoine *et al.*, 2014, Lacy *et al.*, 2000, Spencer *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, certains médiateurs ont été étudiés de façon exhaustive. Un résumé de ces derniers ainsi que de leurs fonctions est présenté dans le tableau ci-dessous. Tel que rapporté dans la section 1.2.4, le rôle des éosinophiles va au-delà de l'inflammation aiguë. Des réactions allergiques jusqu'à une défense parasitaire, virale ou bactérienne, il va sans dire qu'il s'agit de granulocytes multifonctionnels. De plus en plus d'évidences suggèrent que ces granulocytes peuvent également assurer une fonction de cellule présentatrice d'antigène professionnel (CPA) par une expression de complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II), ainsi que de corécepteurs (CD40, CD80 et CD86) qui ont pour but d'activer les cellules T naïfs (Akuthota *et al.*, 2010, Lucey *et al.*, 1989, Mawhorter *et al.*, 1993, Padigel *et al.*, 2006, Weller *et al.*, 1993).

2.2 La morphologie et la physiologie des éosinophiles

Issus de la moelle osseuse, les éosinophiles représentent une lignée granulocytaire hautement sollicitée durant les réactions allergiques ou antiparasitaires. Ces cellules immunitaires occupent jusqu'à 5% de la population leucocytaires périphériques chez une personne normale et cette population s'accroît au sein du tractus intestinal, les poumons et la peau (Blumenreich, 1990). En pathologie, le terme éosinophilie est accordé dans les cas où cette population périphérique excède le compte normal (>5% ou 450-550 cellules/ μ L (Blumenreich, 1990, Kovalszki *et al.*, 2016). Les éosinophiles matures ont une demi-vie qui varie entre 8 et 18 heures (Park *et al.*, 2010). Cependant, il est connu que sous l'influence de médiateurs solubles, la survie des éosinophiles peut s'étendre jusqu'à 14 jours (Park *et al.*, 2010). Durant cette courte durée de vie, ceux-ci migrent

vers les tissus concernés, puis terminent optimalement leur séjour par apoptose. Rares sont ceux qui retournent dans la circulation sanguine (Park *et al.*, 2010). De plus, ayant une forte affinité pour les colorants acides tels que l'éosine, ceux-ci se distinguent de ses cellules sœurs, soit les neutrophiles et les basophiles. Ainsi, cette affinité pour les composés acides se traduit par une coloration rougeâtre sous le microscope. Hormis les caractéristiques visibles, ces granulocytes expriment une variété de molécules de surfaces qui incluent les récepteurs pour les IgG et IgA, les récepteurs aux compléments, les récepteurs des cytokines (IL-3R, IL-5R, GM-CSFR, ainsi que des récepteurs pour IL-1 α , IL-2, IL-4, IFN- α , et TNF- α), des récepteurs de chimiokines (CCR1 et CCR3), les molécules d'adhésion (VLA4 α 4 β 7 et Siglec-8), les récepteurs aux leucotriènes et aux facteurs d'activation des plaquettes, des récepteurs Toll (TLR7 et TLR8) (Gupta *et al.*, 1976, Kelly *et al.*, 2003, Lamkhioed *et al.*, 1995, Stone *et al.*, 2010a). En plus de posséder un noyau bilobé qui borde une chromatine hautement condensée, ces leucocytes contiennent des granules cristalloïdes primaires et secondaires dans leur cytoplasme qui seront détaillées dans la prochaine section. Les éosinophiles sont équipés de protéines cationiques préformées contenues dans leurs granules et, suivant la perception d'un stimulus activateur, ces leucocytes libèrent rapidement leur chargement de façon sélective en exploitant un système vésiculaire hautement développé.

Représentant une faible population résiduelle (~7-10% des protéines totales) chez les éosinophiles, les protéines cristalloïdes de Charcot-Leyden /Galectine-10 (CLC/Gal-10) s'autocristallisent entre elles et forment des structures bipyramidales (Acharya *et al.*, 2014). Ces structures hydrophobes non cationiques constituent les granules primaires chez les éosinophiles. Malgré que le rôle de ces protéines ne soit pas totalement élucidé, l'activation des éosinophiles par IFN- γ induirait une colocalisation de CLC/Gal-10 en parallèle avec les EDN et, considérant que CLC/Gal-10 n'altère en aucune façon l'activité d'EDN, il serait probable que ces protéines de granules primaires agissent comme transporteur pour la séquestration et le transport vésiculaire des EDN (Doyle *et al.*, 2009).

Quant à elles, les granules secondaires contiennent une quantité importante de protéines cationiques préformées, telles que les peroxydases éosinophiliques (EPO), les protéines majeures basiques 1 et 2 (MBP 1-2), les protéines cationiques éosinophiliques (ECP), ainsi que des neurotoxines dérivées des éosinophiles (EDN). Seules les EPO et MBP-2 sont exprimées

exclusivement chez les éosinophiles, tandis que les EDN et les ECP sont faiblement exprimés chez les autres granulocytes et lymphocytes (Acharya *et al.*, 2014).

Lorsque les éosinophiles sont activés, l'un de leurs arsenal libéré correspond aux espèces oxygénées hautement réactives. La production d'oxydants par ces leucocytes s'effectue d'abord par la production de superoxyde via l'enzyme NADPH oxydase qui génère une molécule d' O_2^\bullet et, par l'entremise de l'enzyme superoxyde dismutase, résulterait en la production d'une molécule de H_2O_2 . À ce stade-ci, l'EPO, comme la myéloperoxydase chez les neutrophiles, exploite ce substrat de manière à produire des espèces oxydantes néfastes qui seront utilisées pour circonscrire l'invasion pathogénique. Parallèlement à sa fonction en tant qu'intermédiaire dans la génération de ROS, l'EPO en elle seule possède des effets cytotoxiques en agissant comme toxine cationique en absence de H_2O_2 et/ou d'un cofacteur halide (Henderson *et al.*, 1980b). Il est également connu que cette enzyme possède des propriétés pro et anti-inflammatoires. En effet, l'EPO peut notamment inhiber les médiateurs pro-inflammatoires, tel que les leucotriènes tout en stimulant la libération d'histamine par les mastocytes (Henderson *et al.*, 1980a, Henderson *et al.*, 1982). De plus, une surproduction d'EPO induit des effets cytotoxiques aux mastocytes elles-mêmes, aux pneumocytes, ainsi que les cellules tumorales (Zabucchi *et al.*, 1989). En plus, l'EPO assure les modifications post-traductionnelles des enzymes EPO, MBP-1, EDN et ECP via la nitration sur les résidus tyrosines spécifiques durant le développement et la maturation des éosinophiles. Ainsi, ces enzymes de granules spécifiques indispensables non seulement au fonctionnement immunitaire, mais veille également au développement adéquat des éosinophiles (Ulrich *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les protéines MBP, deux homologues sont présents chez les éosinophiles humains. Alors que MBP-1 est une protéine excessivement cytotoxique dû à sa charge positive élevée couplée à un contenu important en arginine, MBP-2 correspond à une protéine qui est significativement moins basique et qui est exclusive aux éosinophiles, servant de biomarqueur chez les patients souffrant d'éosinophilie (O'Donnell *et al.*, 1983, Plager *et al.*, 2006). Les protéines MBP ciblent les helminthes, cellules et bactéries en provoquant une perte d'intégrité de leur membrane lipidique (Gleich, 2000). Ensemble, malgré que MBP-1 est considérablement davantage exprimé que son homologue, celles-ci représentent jusqu'à 50% des protéines retrouvées dans les granules (Gleich, 2000). Parmi le vaste étendue d'effets indirects causés par

ces MBP, celles-ci sont notamment responsables d'induire la libération des anions superoxydes, la sécrétion d'IL-8 par les neutrophiles et la sécrétion d'histamine et de leucotriène C4 par les basophiles (Gleich, 2000, O'Donnell *et al.*, 1983, Page *et al.*, 1999, Rankin *et al.*, 1992).

Également exploitées comme biomarqueur pour la détection des pathologies occasionnant une éosinophilie, les ECP sont exprimées constitutivement chez ces granulocytes. En effet, l'ECP est sécrétée suivant la migration des éosinophiles activée de la circulation vers l'organe cible. Considérant le réseau complexe vésiculaire des éosinophiles, la dégranulation des ECP s'effectue sous l'influence de leucotriène B4 (LTB4), de facteurs d'activation des plaquettes (PAF), d'IL-5, des compléments C5a et C3a. Ces protéines appartiennent à la famille des RNase A et est significativement plus cationique les EDN. Tout comme les EDN, les ECP possèdent une activité neurotoxique reconnue comme étant le phénomène de Gordon qui se traduit par les symptômes suivants : perte de coordination, ataxie, paralysie (Fredens *et al.*, 1982). La forte affinité des ECP pour les lipopolysaccharides (LPS) structurant les parois bactériennes définit l'activité antibactérienne de ces protéines des granules secondaires (Torrent *et al.*, 2008). Quant à son activité RNase, celle-ci devient particulièrement cruciale pour la défense contre les virus, notamment les rhinovirus, les helminthes, les hémoflagellés, les virus à ARN simple brin. De plus, il est connu que les ECP sont cytotoxiques pour certaines cellules de l'hôte comme démontré sur les cellules épithéliales des voies respiratoires. Cette cytotoxicité justifie l'implication des éosinophiles dans les pathologies des voies respiratoires, telles que l'asthme et la fibrose en stimulant la libération de TGF- β 1 par les fibroblastes. Cette sécrétion contribue notamment à l'amplification de la réponse inflammatoire, ainsi qu'au remodelage des tissus fibroblastiques (Hernnas *et al.*, 1992, Motojima *et al.*, 1989, Zagai *et al.*, 2007).

Appartenant également à la famille des RNase A, les EDN ou RNase 2, sont responsables de plusieurs pathologies neurologiques et respiratoires. Caractérisée par une charge cationique inférieure à celle des autres protéines des granules secondaires éosinophiliques, cette différence limite la capacité de ces protéines à combattre les helminthes. Il est connu que ces protéines agissent particulièrement auprès des cellules dendritiques de manière à favoriser la libération de cytokines et de chimiokines inflammatoires, de facteurs de croissance, ainsi que de récepteurs solubles (Yang *et al.*, 2004). Quoique son rôle en tant que ribonucléase permet une immunoprotection contre les virus à ARN, les EDN sont également source de plusieurs

neuropathologies (Domachowske *et al.*, 1998). Entre autres, il est connu que les EDN endommagent sévèrement les neurones myélinisés chez les lapins, occasionnant des effets similaires rapportés par les ECP, soit le phénomène de Gordon (David T. Durack *et al.*, 1979). D'ailleurs, ces mêmes auteurs ont également démontré que les EDN endommagent les cellules de Purkinje et occasionnent une dégénérescence sévère de la matière blanche du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière selon un modèle murin (Durack *et al.*, 1981, Durack *et al.*, 1979). En addition, une autre étude montre une corrélation entre la présence d'EDN élevée et la manifestation des symptômes de sclérose latérale amyotrophique (ALS), ce qui accentue de plus en plus l'importance des maladies neuroinflammatoires impliquant les éosinophiles dans le développement de maladie neurodégénérative (Liu *et al.*, 2013).

Malgré que les granules primaires et secondaires contiennent un spectre étendu d'effecteurs, les éosinophiles misent également sur un réseau vésiculaire hautement développé. En effet, il existe des transporteurs vésiculaires (EoSV) au sein du cytoplasme des éosinophiles matures qui permet de faire le pont entre les granules et la membrane cytoplasmique. Lorsque ces leucocytes sont stimulés avec des activateurs classiques, tels que l'éotaxine, une augmentation de la quantité de ces structures, ainsi qu'une relocalisation de celles-ci permet de discerner un état d'alerte (Melo *et al.*, 2005). Ces structures tubulaires courbées de 150 à 300 nm bourgeonnent des granules en offrant plusieurs avantages qui sont exploités par les éosinophiles (Melo *et al.*, 2005). Ce qui avantage les éosinophiles à exploiter ces structures serait le fait que les EoSV ont un ratio surface/volume permettant de transporter une plus grande quantité de protéines à la surface de la cellule. De plus, ces structures accessoires sont plus efficaces pour le transport de longue portée contrairement aux petites vésicules de transport classiques, ce qui contribue à la libération rapide des médiateurs (Bonifacino *et al.*, 2003). Enfin, en plus d'être un réservoir de médiateurs, les EoSV montrent une capacité de recyclage de la membrane des granules suivant leur décharge. Ces structures sont fondamentales dans la dégranulation de type *piecemeal* dont sera le sujet principal de la section 2.1.3.1.

Tableau I. Sommaire des principaux médiateurs libérés par les éosinophiles.

Médiateur	Fonctions	Références
CCL3/MIP-1α	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Régulateur de la réponse inflammatoire ▪ Chimioattractants des leucocytes ▪ Provoquent la libération d’histamine par les basophiles 	(Costa <i>et al.</i> , 1993, Izumi <i>et al.</i> , 1997)
CCL5/RANTES	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Régulateur de la réponse inflammatoire ▪ Augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, promouvant la dégranulation, libération de superoxyde ▪ Chimioattractant 	(Kapp <i>et al.</i> , 1994, Lacy <i>et al.</i> , 1999, Rot <i>et al.</i> , 1992, Ying <i>et al.</i> , 1996)
Éotaxine	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, promouvant la dégranulation, production de superoxyde ▪ Chimioattractant des éosinophiles ▪ Activation des éosinophiles 	(El-Shazly <i>et al.</i> , 1998, Elsner <i>et al.</i> , 1996, Jose <i>et al.</i> , 1994)
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maintien de la réponse Th2 ▪ Commutation isotypique des IgG vers les IgE chez les cellules B ▪ Augmentation de l’expression de VCAM et VLA-4 	(Dubois <i>et al.</i> , 1994, Finkelman <i>et al.</i> , 1990, Schleimer <i>et al.</i> , 1992, K. D. Stone <i>et al.</i> , 2010b, G. M. Walsh <i>et al.</i> , 1991)
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recrutement des neutrophiles 	(Braun <i>et al.</i> , 1993)
GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prolongement de la viabilité des leucocytes ▪ Dégranulation ▪ Chimioattractant 	(Kita <i>et al.</i> , 1991, Levi-Schaffer <i>et al.</i> ,

		1995, Warringa <i>et al.</i> , 1991)
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Impliqué dans la différenciation des éosinophiles ▪ Prolongation de la durée de vie des éosinophiles ▪ Activation des éosinophiles 	(Ngoc <i>et al.</i> , 2005, Shalit <i>et al.</i> , 1995, Yamaguchi <i>et al.</i> , 1991)
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Provoque une réponse d'hypersensibilité des voies respiratoires ▪ Augmentation de la sécrétion de mucus ▪ Cause une fibrose subépithéliale ▪ Favorise la production d'éotaxine ▪ Élimination des parasites intestinaux (modèle murin) ▪ Commutation isotypique des IgG vers les IgE chez les cellules B 	(Eum <i>et al.</i> , 2005, Pease <i>et al.</i> , 2001, Punnonen <i>et al.</i> , 1993, Urban <i>et al.</i> , 1998, Z. Zhu <i>et al.</i> , 1999)

2.1.3 Fonctions des éosinophiles

2.1.3.1 Dégranulation

Tel que mentionné dans la section 2.1, les éosinophiles contiennent plusieurs granules dont l'intérêt de chacune s'oriente normalement vers l'immunoprotection. L'accumulation des protéines dans les granules éosinophiliques permet la libération rapide de ces arsenaux suivant l'activation de ces leucocytes (Bystrom *et al.*, 2002). Les éosinophiles ont des protéines cationiques préformées contenues dans leurs granules et, suivant le signal provoquant la dégranulation, les éosinophiles libèrent leur contenu selon différentes façons, tel que schématisé à la figure 3.

D'abord, l'exocytose (figure 3 A) se rapporte à la libération du contenu des granules suivant la fusion entre la membrane bordant les granules et la membrane cellulaire. Cet amalgame est assuré par l'interaction entre une protéine vésiculaire (v-SNARE) et deux t-SNARE situés sur la membrane cellulaire, puis grâce à la protéine Rab27a, les éosinophiles libèrent leur contenu dans le microenvironnement (Sollner *et al.*, 1993, Tolmachova *et al.*, 2004). Malgré qu'il s'agit de loin la méthode favorisée par ces leucocytes, l'exocytose est particulièrement importante lors de la réponse contre des pathogènes imposants, tels que les helminthes (Scepek *et al.*, 1994). Toutefois, la fusion membranaire s'applique également pour assembler deux ou plusieurs granules ensemble de manière à réunir leur contenu vésiculaire avant de les libérer (Hafez *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2017).

Quant à elle, la cytolyse est le résultat d'une dégranulation par l'entremise d'un dépôt direct de granules intacts sur la cible suivant la rupture de la membrane cellulaire. Cependant, il a été suggéré que ce mécanisme s'enclenche exclusivement chez les éosinophiles intervenants au niveau des voies respiratoires (Filley *et al.*, 1982). Certains chercheurs ont également identifié ce mécanisme comme étant une bombe à retardement de telle sorte à ce que malgré une mort cytolytique des éosinophiles, les granules sont rarement phagocytées (Erjefalt *et al.*, 1998). Au contraire, une fois évadées du cytoplasme, elles libèrent graduellement leur contenu dans la matrice extracellulaire, déclenchant une distribution étendue des protéines éosinophiliques. Pour ce faire, il a été rapporté que ces granules expriment les récepteurs aux IFN- γ et CCR3 et, suivant la liaison des ligands respectifs, ces granules sécrètent des protéines ECP via la voie signalétique MAPK (Neves *et al.*, 2008). En plus d'une fonction immunomodulatrice, cette

méthode sera également considérée non seulement par les éosinophiles, mais également par les granulocytes et les macrophages en réponse aux parasites (Erjefalt *et al.*, 1998, Nathan *et al.*, 1979, Racz *et al.*, 1982).

Enfin, la dégranulation de type *piecemeal* est la méthode de sécrétion la plus courante chez les éosinophiles et avec raison (Figure 3 B et C). Elle permet la dégranulation sélective et progressive de certaines composantes des granules par le biais de petites vésicules (EoSV), comme mentionnées précédemment dans la section 2.1. L'intrigue de cette sélectivité a été mise de l'avant par Spencer *et al* en stimulant les éosinophiles avec différents agonistes. Lorsque ces leucocytes sont activés par l'IFN- γ , des anticorps contre les récepteurs d'immunoglobuline-like 7 (LIR7) ou des anticorps dirigés contre CD9, la sécrétion d'IL-12 se produit en contraste à l'absence d'IL-4, tandis qu'une stimulation avec l'éotaxine, RANTES ou l'IL-16 provoque la sécrétion d'IL-4, mais pas d'IL-12 (Bandeira-Melo *et al.*, 2002, Bandeira-Melo *et al.*, 2001, Grewe *et al.*, 1998, Spencer *et al.*, 2006, Tedla *et al.*, 2003). Quant à la caractéristique progressive de cette sécrétion, elle s'accorde plutôt aux maladies chroniques contrairement à l'exocytose résultant en une sécrétion rapide et explosive qui est souvent consécutive aux chocs anaphylactiques. En particulier, ce type de dégranulation serait exploitée par les éosinophiles des réactions allergiques au niveau des voies respiratoires. En effet, environ 67% des éosinophiles résidents dans les tissus nasaux des patients souffrants de rhinite libèrent leur contenu par dégranulation *piecemeal* (Erjefalt *et al.*, 1999).

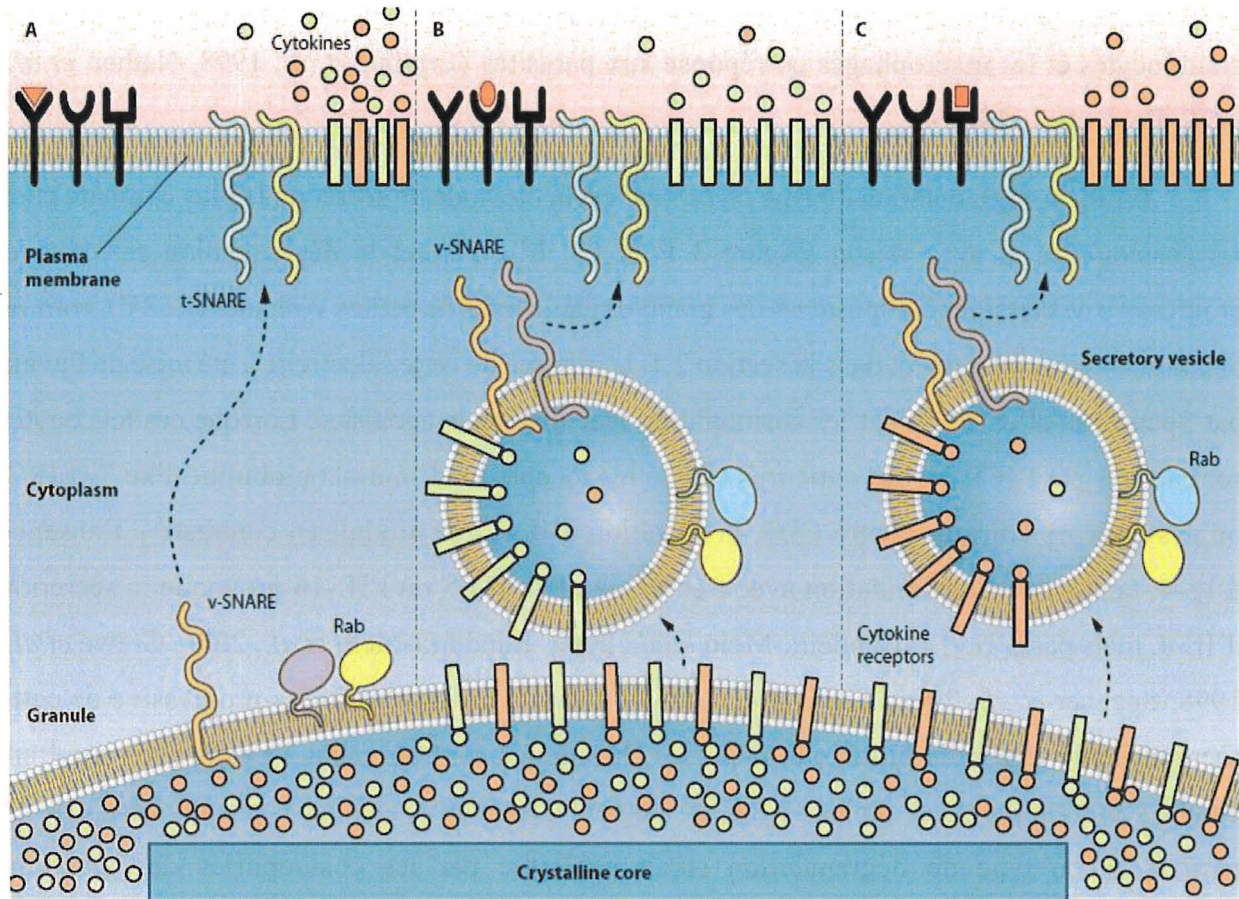


Figure 3. Représentation de différents types de sécrétion chez les éosinophiles humains où (A) représente l'exocytose classique et, en contrepartie, B et C représentent la dégranulation de type *piece meal*. Tiré de (Moqbel *et al.*, 2006).

2.1.3.1 Adhésion

L'adhésion consiste en une réponse primaire et fondamentale des granulocytes afin de solliciter la présence de ces derniers dans les foyers inflammatoires. Ce phénomène s'initie, entre autres, par la modulation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des granulocytes activés. Advenant le cas où ces leucocytes sont interpellés au foyer d'inflammation, ceux-ci y parviennent d'abord en s'adhérant faiblement aux cellules endothéliales. Cette adhésion est rendue possible grâce à l'interaction entre les molécules d'adhésions P-sélectines ligands glycoprotéiques 1 (PSGL-1) à la surface des éosinophiles et les L-sélectines et P-sélectines présentées sur les endothéliocytes. Suivant l'activation des granulocytes par les activateurs classiques, tels que PAF et l'IL-5, le roulement des leucocytes se produit. Cette fois-ci, une adhésion ferme entre $\alpha 4\beta 1$ et VCAM-1 est couplée à une augmentation d'affinité entre les intégrines $\beta 2$ et ICAM-I, puis, subséquentement, le détachement des intégrines $\alpha 4\beta 1$ des VCAM-I permet le détachement des éosinophiles des endothéliocytes. Il a été proposé que l'expression exclusive de VCAM-I chez les éosinophiles est à la source du recrutement spécifique de ces granulocytes (Thornhill *et al.*, 1991). Enfin, la présence de chimio attractants permet la migration des éosinophiles adhérents à travers la barrière endothéliale. Cette migration peut s'effectuer soit via les jonctions serrées qui séparent ces dernières ou encore, à travers cellules endothéliales (Dejana *et al.*, 2009, Shahabuddin *et al.*, 2000, Vestweber *et al.*, 2009). Suite à cette migration, ces granulocytes entrent en contact avec les protéines de la matrice extracellulaire. Contrairement à la barrière endothéliale, ces éléments forment un grand réseau de protéines fibrillaires qui ont pour but d'activer davantage les éosinophiles (Wardlaw *et al.*, 1994). D'ailleurs, il a été démontré, de façon *in vitro*, que ces protéines procurent une activation exocrine, résultant à la sécrétion du contenu cytotoxique chez les éosinophiles, telles que les leucotriènes et de facteurs de croissance (GM-CSF et IL-3). Cependant, l'adhésion des granulocytes peut être modifiée par l'entremise d'une altération de l'expression des molécules d'adhésion ou une modification de l'affinité de ces dernières avec leurs ligands respectifs. Par exemple, toutes molécules, incluant les NP, pourraient occasionner une augmentation excessive de la capacité d'adhésion des éosinophiles. De ce fait, cette augmentation pourrait être à la source de différentes pathologies où une infiltration anormale d'éosinophiles est évaluée, telles que l'anémie à hématies falciformes, l'asthme chronique et la rhinite (Canalli *et al.*, 2004, Håkansson *et al.*, 1995, Johansson, 2014, Johansson *et al.*, 2013, Silveira-Lemos *et al.*, 2006,

Wardlaw *et al.*, 1994). Un tableau résumé des principaux ligands, ainsi que leurs récepteurs respectifs est présenté ci-dessous.

Tableau II. Principaux ligands et leurs récepteurs des éosinophiles. Adapté et traduit de (Wardlaw *et al.*, 1994)

	Récepteurs des éosinophiles	Récepteurs des cellules endothéliales	Protéines de la matrice
Intégrines	VLA-4	VCAM-1	Fibronectine
	VLA6		Laminine
	$\alpha 4\beta 7$	MadCAM-1	Fibronectine
	LFA-1	ICAM-1, ICAM-2	
	Mac-1	ICAM-1	Fibronogène
Immunoglobuline-like	PECAM	PECAM	Inconnues
	ICAM-3		Inconnues
	L-sélectines	GlyCam-1, CD34	Inconnues
Glucides	PSGL-1	P-sélectine	Inconnues
	Ligand E-sélectine	E-sélectine	Inconnues
Autre	CD44	Inconnues	Hyaluronate

2.1.3.2 Production de dérivés réactifs de l'oxygène

Les éosinophiles, tout comme la plupart des cellules immunitaires, ont la capacité de produire des ROS et des dérivés réactifs de l'azote (RNS) lorsqu'ils sont activés (Honda *et al.*, 2001, MacPherson *et al.*, 2001). Cette production correspond à un mécanisme de défense qui mise sur la perturbation de plusieurs composantes cellulaires. En soi, les ROS sont sollicités pour leur activité biocide et, par la bande, peuvent engendrer plusieurs effets indésirables allant d'une atteinte des cellules et tissus environnants jusqu'aux cancers en agissant sur l'apparition de ceux-ci ou encore, en promouvant leurs survies (Prasad *et al.*, 2017). De même, une perturbation de cette fonction peut occasionner plusieurs effets indésirables considérant l'implication variée de ces espèces réactives.

Sources et cibles des ROS

Dérivés d'une molécule d'oxygène, les ROS sont définis comme étant des métabolites partiellement réduits possédants une forte capacité oxydante. Cette particularité est attribuée à la présence d'au moins un électron non apparié qui orbite autour de la molécule oxygénée et, dans l'espoir de stabiliser les charges, le radical libre est activement à la quête d'un électron complémentaire. Les ROS les plus exploités dans les systèmes biologiques sont les anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochlorite ($HOCl$) (Thannickal *et al.*, 2000). Quant à leur production, ces derniers peuvent être générés à partir d'une source endogène ou exogène. Pour l'intérêt de ce mémoire, seules les sources endogènes de ROS seront abordées. Ces dernières sont générées au niveau de la mitochondrie, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique de la cellule. À cet instant, la production de différentes espèces réactives dépend d'abord d'une réduction d'une molécule d' O_2 , ce qui provoque la formation d'un radical libre $O_2^{\bullet-}$. Cette réduction est assurée par une variété d'enzyme, telles que l'enzyme membranaire NADPH oxydase, la xanthine oxydase ou encore, par l'entremise de la chaîne des transports des électrons. Dès lors, le radical libre subit une cascade oxydative qui résulte en d'autres dérivés réactifs. D'abord, l'enzyme superoxyde dismutase génère une molécule de peroxyde d'hydrogène, puis ce dérivé peut être transformé en radical hydroxyle par des réactions d'oxydation Haber-Weiss et/ou Fenton. En plus des ROS, les systèmes biologiques comptent également sur les RNS. Les molécules NO^{\bullet} sont, la plupart du temps, relativement stable. Par contre, en présence d' $O_2^{\bullet-}$, ces radicaux azotés profitent de chaque

occasion afin de s'apparenter avec leur complice de sorte à former plusieurs dérivés azotés hautement réactifs, tels que le peroxynitrite (ONOO^-) (Di Meo *et al.*, 2016).

Dès lors, dû à leur nature hautement réactive, ces espèces sont exploitées par plusieurs systèmes biologiques. Effectivement, les ROS/RNS peuvent causer des dommages oxydatifs aux lipides, protéines et ADN résultant en un stress oxydatif. D'une perspective moléculaire, les ROS affectent l'intégrité membrane par la peroxydation des lipides où les lipides insaturés deviennent des lipides polaires hydroperoxydes (Schieber *et al.*, 2014). Dû à cette transformation, une perte de l'intégrité membranaire est alors observée occasionnant des effets allant d'une libération des composantes solubles du cytoplasme jusqu' à la mort cellulaire. En ce qui concerne les dommages à l'ADN, les ROS, notamment les $\text{O}_2^{\bullet-}$ et les radicaux hydroxyles, réagissent avec les bases azotées menant à des lésions et possiblement à une instabilité génomique (Cooke *et al.*, 2003). Les ROS ont également la capacité d'affecter les protéines en oxydant les résidus méthionines, cystéine et tryptophane résultant en une inactivation des protéines, une fragmentation de la chaîne peptidique, l'altération des charges, ainsi qu'un changement de conformation (Dean *et al.*, 1985, Kelly *et al.*, 2003). De ce fait, un stress oxydatif peut entraîner une modification des voies signalétiques promouvant le fonctionnement, voire même la survie de la cellule (Levine *et al.*, 2000).

Quoique le rôle délétère de ces espèces est bien répertorié, la découverte de leur implication dans la signalisation cellulaire a permis d'enquêter sur leur contribution qui s'étend au-delà de leur effet néfaste. En effet, il est désormais connu que les ROS agissent comme messagers intracellulaires en interagissant avec les ions Ca^{2+} (Sauer *et al.*, 2001). Entre autres, il a été démontré que l'ajout de H_2O_2 à des concentrations nano molaires occasionne une augmentation subite de ces ions suivit d'une activation des protéines ERK1/2, ainsi qu'une stimulation de croissance (Mukherjee *et al.*, 1982, Sauer *et al.*, 2001). En revanche, une concentration micro molaire du même agoniste cause une libération de plus longue durée de Ca^{2+} , ce qui cause un arrêt du cycle cellulaire (Sauer *et al.*, 2001). Ce paradoxe signalétique consiste en un exemple qui justifie l'exploitation alternative des ROS par les cellules à leur avantage. Ainsi, étant donné que les ROS peuvent influencer l'activité cellulaire, un inducteur de ROS, tels que les NP, peut stimuler la libération de ces espèces réactives entraînant la modulation de l'activité des cellules environnantes.

Évidemment, il existe des mécanismes de défense qui sont exploités par les cellules afin de se protéger contre les dommages des ROS. Pour pallier aux effets indésirables des ROS endogènes, les cellules ont recours à des enzymes antioxydantes. Parmi celles-ci, le superoxyde dismutase convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, alors que la catalase et le glutathion peroxydase transforment le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau. Parallèlement, il existe également des éboueurs de ROS, tels que les peroxydredoxines et le système thioredoxine, ainsi que des antioxydants non enzymatiques. Alors que les peroxydredoxines capturent les ROS et les espèces azotés, le système thioredoxine fournit les électrons nécessaires aux peroxydredoxines (Holmgren, 2000, Zhao *et al.*, 2002).

Cependant, advenant que les ROS produits dépassent la capacité de prise en charge du système antioxydant, un excès de ces espèces réactives peut engendrer plusieurs conséquences, tel qu'un état de stress oxydatif après de la cellule. Dans la mesure du possible, la cellule tente de remédier aux dégâts, mais, lorsque les répercussions deviennent trop importantes, la cellule meurt naturellement par apoptose (Finkel, 2003). Bien que regrettable pour la cellule, le stress oxydatif peut être avantageux pour certaines avenues. Par exemple, lorsque la quantité de cellules pro-inflammatoires excède la norme physiologique durant les périodes d'asthmes, il est désormais connu qu'une production accrue d'oxyde nitrique et de peroxyde atténue l'inflammation des voies respiratoire en induisant l'apoptose chez les éosinophiles (Ilmarinen-Salo *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 2015, Xianzhi Zhang *et al.*, 2003).

2.1.3.3 Phagocytose

Bien que cette fonction cellulaire n'ait pas été évaluée dans ce projet, la phagocytose est un mécanisme intégral des éosinophiles et, par conséquent, elle se doit d'être mentionnée. Les éosinophiles, tout comme les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages sont reconnus pour phagocyter plusieurs organismes et particules étrangers. Chez les éosinophiles, ce phénomène est couplé avec la dégranulation et met en scène des enzymes lysosomales. Par contre, malgré que les éosinophiles puissent phagocyter et manifester clairement un effet bactéricide, ces granulocytes ne sont pas en mesure d'irradier les infections bactériennes en l'absence des neutrophiles. En effet, une efficacité inférieure est remarquable chez les éosinophiles et, alors que la phagocytose des neutrophiles dépend du CD16 et CD32, celle des éosinophiles mise sur le marqueur CD35 (Hatano *et al.*, 2009). Néanmoins, il a été démontré que ces granulocytes ont la capacité de phagocyter et de détruire les parasites, tels que *Trypanosoma dionisii* en présence d'antisérum (Thorne *et al.*, 1979). L'un des principaux mécanismes exploités par les éosinophiles repose sur l'interaction entre les récepteurs du complément 3 (CR3) (Fischer *et al.*, 1986). Dès la liaison avec son ligand, un recrutement accru de la protéine tyrosine kinase Syk a lieu et, de concert, ce recrutement occasionne l'activation d'un vaste éventail signalétique qui mène ultimement à un modulation de l'activité de la cellule (Chan *et al.*, 1996).

2.1.4 Lignée cellulaire AML 14.3D10 : une imitation étroite des éosinophiles.

Pour l'intérêt des études *in vitro*, il est loin d'être marginal d'exploiter les cellules cancéreuses dues aux nombreux avantages que celles-ci présentent. Dû au nombre limité d'éosinophiles dans la circulation sanguine, l'utilisation d'un grand volume de sang est souvent nécessaire pour obtenir une quantité limitée de granulocytes éphémères. Or, l'établissement de la lignée cellulaire AML14 qui a été modélisée à partir des éosinophiles humains a été fructueux pour les avènements en recherche. Cette lignée cellulaire a été isolée et développée en 1992 à partir d'un homme âgé de 68 ans diagnostiqué avec une leucémie aigüe myéloïde de type FAB M2. La particularité de cette leucémie est le fait que les myéloblastes du sang et de la moelle osseuse ne partageaient aucune caractéristique des éosinophiles différenciés. En effet, la morphologie des AML14 ne montrait aucune évidence des éosinophiles différenciés. Une analyse par cytométrie en flux a permis de révéler que ces cellules n'exprimaient pas le CD34 qui, rappelons-le, correspondent à un marqueur de différenciation des éosinophiles. Par contre, celles-ci exprimaient les marqueurs CD33, CD13 et, faiblement, le CD14. Ce qui porte à croire qu'il s'agissait d'une lignée éosinophilique repose sur la capacité de celles-ci à exhiber plusieurs caractéristiques qui se rapprochaient davantage à celles des éosinophiles lorsque ces dernières ont été incubées en présence de cytokines sollicitées les progéniteurs éosinophiliques, soit l'IL-13, l'IL-5 et le facteur de croissance GM-CSF. En soi, ces caractéristiques correspondent à la présence de granules secondaires immatures, la présence de récepteurs pour les médiateurs mentionnés précédemment, ainsi que la présence d'ARN messagers traduisant pour les protéines MBP, EDN, ECP, EPO et CLC. Aussi, ces cellules expriment les molécules de surface P-sélectine glycoprotéine ligand 1, Mac-1, VLA-4, E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 (Wang *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que l'une des réponses intégrales de ces cellules correspond à la flambée oxydative, une faculté également partagée avec les éosinophiles matures (Mahajan *et al.*, 2013). Dès lors, malgré que les AML14 aient été cultivés depuis un certain temps, aucun clone n'a encore isolé pour établir une lignée stable. De cette lacune a émergé la lignée AML14.3D10 à partir d'une cellule AML14 qui avait une capacité proliférative supérieure (double aux 48h) tout en partageant le plus de caractéristiques avec les éosinophiles matures. Cependant, il est à noter que les AML14.3D10 n'expriment plus le récepteur pour l'IL-3 sans pour autant affecter le développement de celles-ci. En addition, ces cellules expriment les intégrines $\beta 2$ qui peuvent être activées indépendamment de la voie MEK/ERK grâce à l'interaction entre la phospholipase A2 cytosolique (Cpla2) et les

protéines kinase c, ce qui confirme l'intérêt de leur utilisation pour les expériences d'adhésion. De surcroît, il a également été confirmé et démontré par les recherches de notre laboratoire que ces cellules sont en mesure de produire l'IL-8 en réponse à divers agents notamment les NP, justifiant leur utilité comme modèle *in vitro* (Vallières *et al.*, 2016).

2.1.5 Le cytosquelette des granulocytes

Tout comme les autres composantes d'une cellule, le cytosquelette, particulièrement celui des granulocytes, est au cœur de plusieurs fonctions. Étant des cellules hautement dynamiques, les granulocytes misent sur la réorganisation de cette structure malgré sa fonction d'ossature. L'activation des neutrophiles via les agents chimio attractants provoque des changements au niveau de la forme du neutrophile, la migration, la dégranulation et la phagocytose. Ces fonctions intégrales nécessitent inévitablement un réarrangement hautement dynamique du cytosquelette (Omann *et al.*, 1987). Hormis les fonctions basales des granulocytes, il a été démontré que le cytosquelette est fortement impliqué dans l'inflammation. Par exemple, lorsque les granulocytes entrent en apoptose, ceux-ci sont confrontés à un réarrangement de cette structure afin de présenter des protéines entières et/ou clivées à la surface de leur membrane cellulaire (Simon *et al.*, 2013). Cette présentation permet d'identifier les cibles d'efferocytose. De manière intrinsèque, le cytosquelette consiste en un amalgame de microfilaments, de microtubules et de filaments intermédiaires qui, succinctement, seront détaillés dans les prochains paragraphes.

Les microfilaments sont composés de monomères d'actines (43 kDa) hautement conservés à travers l'évolution et mesurent 7 nm de diamètre. En soi, l'unité d'actine est une protéine globulaire possédant un site de liaison pour l'ATP et un site pour les ions bivalents. Au sein des cellules non musculaires, tel est le cas présent, l'actine forme un cortex à la périphérie de la cellule. Cette structure est principalement composée de fibres de stress qui interagissent avec la matrice extracellulaire (Virtanen *et al.*, 1982). De plus, cette structure forme un système énergétique nécessaire pour la motilité cellulaire, définissant leur rôle indispensable dans l'activation des granulocytes (Virtanen *et al.*, 1982). Au repos, les microfilaments d'actine, appelés F-actines, se trouvent dans un état d'équilibre avec les monomères d'actines. Dès l'instant où la formation de microfilament est exigée, l'assemblage s'effectue en deux étapes : la nucléation et l'élongation. D'une part, le premier événement consiste en la formation lente d'un oligomère d'actines. Cette étape limitante est notamment dépendante des complexes des protéines associées à l'actine 2 et 3 (Arp2/3) (Ma *et al.*, 1998, Mullins *et al.*, 1998). D'autres part, l'élongation est la phase la plus

rapide et met en scène l'ajout des monomères au site de nucléation. À cette étape, l'ATP est hydrolysée, permettant la formation du microfilament. Ce phénomène propre à l'actine correspond à la polymérisation de l'actine. Jusqu'à présent, la polymérisation de la F-actine au niveau de la lamella des granulocytes migratoires débute par la transduction du signal suivant l'activation de ceux-ci par les récepteurs chimiotactiques couplés aux protéines G (GPCRs) interagissant avec les complexes Arp2/3 occasionne un large éventail de voies signalétiques, telles que MAPK, ROCK, PKC, calmoduline et PI3K (Ma *et al.*, 1998). Il a été démontré qu'une inhibition de ces voies signalétiques engendre une diminution de la capacité de roulement, de la polymérisation d'actine et une modification de la morphologie du marqueur VCAM-1 chez les cellules AML14.3D10 (Myou *et al.*, 2002). Hormis la polymérisation de l'actine, la relocalisation de l'actine chez les neutrophiles activée est d'autant plus importante. En effet, lors de la chimiotaxie, il a été démontré que, par le biais du complexe Arp2/3, l'actine se relocaliserait aux foyers cellulaires où la réponse à la chimiotaxie est la plus élevée (Mullins *et al.*, 1998).

Les microtubules sont des cylindres creux dont le diamètre intérieur et extérieur se chiffre à 15 et 25 nm respectivement (Tucker, 1984). Également hautement conservée à travers l'évolution, ces structures sont caractérisées par une extrémité C-terminal très acide. Les filaments de microtubules sont constitués d' α et de β tubulines dont le poids moléculaire se chiffre à 56 kDa et 54 kDa (Rogers *et al.*, 1992). Ces monomères s'assemblent de façon hétérodimérique : chaque dimer contient un site d'affinité pour la GTP, mais seul, la β tubuline contient une activité GTPase. La formation de microtubules s'effectue selon les mêmes étapes que la formation de microfilaments, mais, quoique limitante, l'assemblage des oligomères est fortement influencé par deux cations : le magnésium et le calcium (Padilla *et al.*, 1990). Alors que le magnésium est obligatoire au processus, l'ajout de calcium inhibe la formation des oligomères. Les microtubules se propagent à travers le cytoplasme allant du noyau jusqu'à la surface de la membrane cellulaire. D'ailleurs, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi témoignent particulièrement de leur présence (Rogers *et al.*, 1992). De ce fait, ils sont notamment impliqués pour le transport vésiculaire, ainsi que les l'endocytose et l'exocytose justifiant leur intérêt pour l'étude de certaines fonction cellulaire, tels que la production de ROS, la phagocytose et la sécrétion d'agents anti et pro-inflammatoires.

Quant à eux, les filaments intermédiaires mesurent 10 nm et, quoique les caractéristiques de ces protéines diffèrent selon les types cellulaires, ces structures filamenteuses sont essentielles pour combler les espaces vides dans la cellule, ainsi que pour réguler la fonction cellulaire et nucléaire. Grâce à leur stabilité nettement supérieure à celles des microfilaments et des microtubules, celles-ci assurent la communication entre le noyau et la membrane plasmique (Bloemendal *et al.*, 1989). Les filaments intermédiaires sont apolaires contrairement aux structures précédentes et, comme de fait, ils sont peu nombreux dans la cellule. Cependant, en contraste avec les autres microstructures, les filaments intermédiaires s'assemblent selon deux mécanismes proposés : la co-translation à proximité du noyau et l'assemblage rapide de monomères (Georgatos *et al.*, 1987). Également à l'opposé des autres microstructures, l'assemblage des filaments intermédiaires est indépendant des nucléotides et, par conséquent, ne requiert pas l'hydrolyse de la GTP, ni de l'ATP. Ainsi, alors que la polymérisation de la G-actine (microfilaments) et de l' α et β tubuline (microtubules) requiert l'hydrolyse des nucléotides, la polymérisation des filaments intermédiaire s'effectue indépendamment de cette réaction (Coulombe *et al.*, 2000).

En ce sens, il a préalablement été démontré par l'équipe du Dr. Girard que certaines protéines du cytosquelette des neutrophiles sont clivées, puis externalisées lors de la mort cellulaire, telles que la vimentine, la gelsoline, la lamine B1, l'eitrine, la moésine, ainsi que certaines protéines associées aux microfilaments (MFAP) (Girard *et al.*, 1996, Moisan *et al.*, 2006). Dès lors, il est évident que le cytosquelette est fortement impliqué dans l'inflammation et la perturbation de cette structure fondamentale peut entraîner plusieurs conséquences. Par exemple, lors d'un stress oxydatif, le réseau d'actine est perturbé par l' H_2O_2 causant une désorganisation de l'organisation cellulaire de concert à un bourgeonnement de la membrane cellulaire (Rogers *et al.*, 1992). Indirectement, ce même stress peut également affecter l'intégrité des microfilaments par l'entremise des protéines associées à l'actine qui sont régulées par la phosphorylation, ainsi que des ions Ca^{2+} (Rogers *et al.*, 1992). Il a également été démontré que dans des cas cliniques d'inflammation chronique, tels que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren et le lupus systémique érythémateux, des anticorps de classe IgG et IgM dirigés contre les protéines des filaments intermédiaires, telles que la vimentine et l' α -fodrin ont été décelés (Watanabe *et al.*, 1999). Il est suggéré que la présence de ces autoanticorps orienterait le système immunitaire contre ces protéines et, de ce fait, causerait la manifestation de désordres auto-immuns.

Le cytosquelette est, entre autres, une structure dynamique qui assure une intégrité aux granulocytes. Il est donc concevable qu'une atteinte à l'une des composantes de cette structure entraîne une répercussion non seulement au niveau de la structure cellulaire, mais également aux fonctions de celles-ci. Malgré que les nanoparticules soient traitées dans les prochaines sections, quelques effets connus à ce jour entre ces agents et le cytosquelette sera soulignés dans ce paragraphe. D'un côté, les nanotubes de carbones à parois uniques induisent une agglomération des filaments d'actines chez les cellules HeLa causant une altération durant la division cellulaire tout en provoquant un retard de prolifération (Holt *et al.*, 2010). L'étendue des dommages associés aux NP font également sujet d'étude relevant du domaine neurologique où les NP d'argents entraîne une perte de la β -tubuline et de la F-actine expliquant, en partie, la cytotoxicité observée suivant l'exposition (Fenglian Xu *et al.*, 2013b). En contrepartie, les NP d'or de 20 nm entraînent la dégradation des protéines du cytosquelette vimentine, lamine B1 et gelsoline sans pour autant provoquer leur externalisation (Noël *et al.*, 2016). Les NP peuvent également affecter le cytosquelette de manière indirecte en agissant sur l'interaction de certains récepteurs endocytaires. Il a également été démontré que les NP de Fer et de gélatine causent une réorganisation des protéines F-actine et β -tubuline chez les fibroblastes suivant l'endocytose. De même, les nanotubes d'or recouverts de bromide d'hexadecyltriméthylammonium causeraient également une agglomération de l'actine, ainsi qu'une redistribution de la β -tubuline dans le cytosol. Par conséquent, ces agents diminuent la fluidité cellulaire (micromotilité) (Tarantola *et al.*, 2009). Hormis les protéines structurales du cytosquelette, il est également connu que certaines NP occasionnent des répercussions sur le cytosquelette de manière indirecte. Par exemple, les NP d'oxyde de fer altèrent l'expression des kinases d'adhésion focales (FAK) à la baisse et étant donné leur implication dans l'adhésion cellulaire, cette fonction se voit alors corrompue (Soenen *et al.*, 2010). Cette même NP favoriserait également la production de ROS qui, lorsqu'excessive, altère le cytosquelette, augmente la perméabilité cellulaire et réorganise les microtubules (Apopa *et al.*, 2009). À travers ces études qui représentent un répertoire non exhaustif, il est évident que les effets entre les NP et l'armature cellulaire est un point culminant qui se doit d'être élucidé et, par conséquent, cette relation sera mise en évidence dans l'article de ce mémoire.

CHAPITRE 3 : LES NANOPARTICULES

L'utilisation de NP est en plein essor depuis les dernières années qui s'observent à travers différentes disciplines, telles que l'aérospatiale, la médecine, l'électronique, la biologie et bien d'autres (Mitchell *et al.*, 2007, Tomishko *et al.*, 2009). Les caractéristiques qui les rendent intéressantes dans l'application médicale reposent sur leur ratio de surface/masse, leurs propriétés quantiques, ainsi que leurs habiletés d'absorber et de transporter différents composés, tels que les médicaments, les marqueurs et les protéines (Lungu *et al.*, 2014). Les NP se définissent comme étant des substances de taille dont les trois dimensions sont inférieures à 100 nm (Lungu *et al.*, 2014). Les NP dont au moins deux dimensions sont plus petites que 100 nm sont considérées comme étant des nanomatériaux (ex. nanotubes de carbones) (De Jong *et al.*, 2008). De plus, les NP peuvent être chargées positivement ou négativement, ce qui leur confère des propriétés différentes. En lien avec leur charge de surface, les NP peuvent également être recouvertes de substance modifiant le potentiel zêta de celle-ci. Considérant qu'il existe une grande variété de NP, la toxicodynamique et la toxicocinétique de ces dernières sont complexes, particulièrement au niveau du métabolisme. Les NP peuvent être synthétisées à partir de différentes matières, tels les phospholipides, les lipides, l'acide lactique, le dextran, le chitosan, les divers polymères, le carbone, la silice et les métaux (Lungu *et al.*, 2014). En dépit de leurs origines, la caractérisation des NP est abstraite. Succinctement, quoique plusieurs méthodes sont utilisées pour cataloguer les NP selon différentes propriétés (taille, forme, rotation, émission d'une longueur d'onde), la caractérisation de ceux-ci demeure particulièrement complexe. Cependant, le nombre de dimensions permet de grossièrement les distinguer selon trois classes. Les NP à une dimension, à deux dimensions (ex. les nanotubes de carbone) et à trois dimensions (ex. dendrimères, points quantiques, fullerènes) (Lungu *et al.*, 2014). Depuis les dernières années, la recherche en nanotoxicologie a su occuper une place importante parmi les articles publiés. Il est désormais connu que les NP engendrent plusieurs effets qui, sommes toutes, sont loin d'être dérisoires au sein de l'organisme. Se situant parmi les NP dont l'exploitation a su faire profit au cours des dernières années, les NP de Pd seront exclusivement développées pour ce présent mémoire.

3.1 Les nanoparticules de palladium

3.1.1 Caractéristiques

Le Pd est un métal noble qui fait partie du groupe d'éléments du platine regroupant également la platine, l'iridium, osmium, le rhodium et le ruthénium. Ce métal de transition possède la température de fusion la plus basse, ainsi qu'une densité inférieure aux autres éléments de sa catégorie. Ces caractéristiques confèrent à celui-ci plusieurs aspects intéressants, dont une stabilité électrique, une haute résistance à l'usure et des propriétés catalytiques exceptionnelles. En général, les NP des métaux nobles sont synthétisées selon différentes apparences de leur coquille et, grâce à ces différentes conformations, leur stabilité est supérieure autres NP. Particulièrement, les NP de Pd sont des métaux cubiques centrés, ce qui leur confère un large éventail de formes géométriques variées, tel qu'illustré à la figure 4 (Agostini *et al.*, 2014, Niu *et al.*, 2010, Teranishi *et al.*, 1998, Cun Zhu *et al.*, 2013).

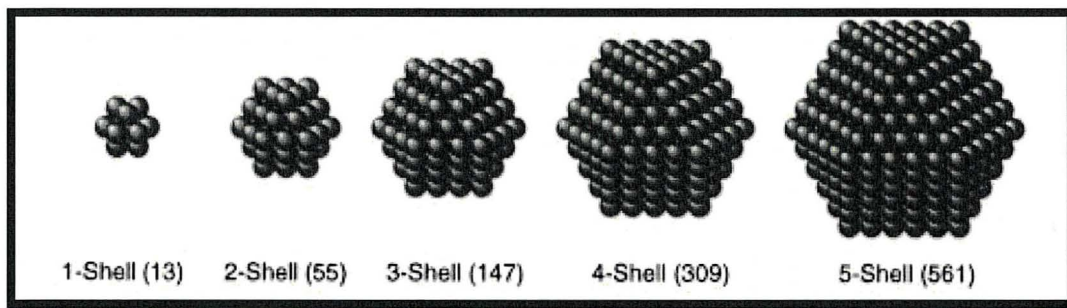


Figure 4. Représentation des NP de Pd selon leur configuration. Tiré de (Teranishi *et al.*, 1998).

Le Pd existe sous trois états d'oxydation : Pd⁰ (métallique), Pd²⁺ et Pd⁴⁺ et, grâce à ces états, ces NP sont fortement attrayantes pour diverses applications qui seront élaborées dans la section 3.1.3. Malgré sa rareté, cet élément est naturellement retrouvé dans la croûte terrestre ($\leq 1 \pm 10 \mu\text{g/kg}$) et dans la mer ($\leq 1 \text{ng/kg}$). Les NP de Pd peuvent se retrouver dans l'environnement sous forme de fractions particulaires ultrafines (en deçà de 100 nm) et, étant donné leur petite taille, l'inhalation de cet élément est incontestable (Sébastien Rauch *et al.*, 2002a). Dès lors, la corrélation entre l'infiltration l'inflammation des voies respiratoires et l'exposition à ces NP est inévitable. Il va sans dire que cette inflammation est mesurable à partir du dénombrement d'éosinophiles qui, pour la plupart, témoigne d'une réponse allergique (asthme), tel que mentionné au début de ce mémoire.

3.1.2 Synthèse et production

Tel qu'introduit au paragraphe précédent, les NP de Pd sont retrouvées naturellement. Hormis la récolte naturelle, les NP de palladium sont synthétisées à partir de différentes méthodes qui produisent des NP de Pd pour diverses applications. En effet, les propriétés intrinsèques des NP de métaux nobles sont principalement régies par leur taille, leur forme, leur composition et leur cristallinité (Chen *et al.*, 2010, Xiong *et al.*, 2007, Yarulin *et al.*, 2012). De ce fait, les méthodologies visant à modifier la taille et la grosseur de NP a bénéficié d'un intérêt grandissant depuis les dernières années. Il est connu que plusieurs méthodes permettent la variation de ces deux caractéristiques, telles que des méthodes hydrothermiques, photochimiques, *seed-mediated*, réduction de poly-ol, réduction chimique ou électrique des ions métalliques en présence de stabilisateur, décomposition thermique et l'ablation au laser (Chen *et al.*, 2010, Murphy *et al.*, 2005, Sébastien Rauch *et al.*, 2002a, Sun *et al.*, 2002, Teranishi *et al.*, 1998, Satoshi Yoshida *et al.*, 1999b). Il est à noter qu'actuellement, la méthode favorisée pour la production des NP de Pd correspond à la *seed mediated* étant donné qu'il s'agit d'une méthode rapide, efficace et qui peut s'effectuer à température pièce, en présence d'eau et d'air et, en plus de ces avantages de fabrications, peut produire différentes formes géométriques de NP de Pd (Chen *et al.*, 2010).

3.1.3 Utilisation courante

L'exploitation de ce métal est en plein essor depuis les dix dernières années à un tel point où son utilisation a doublé lors des dix dernières années. La demande mondiale de ce métal noble se chiffre à 300 tonnes en 1999 et ne cesse d'augmenter. L'une des raisons de leur exploitation grandissante repose sur le fait que la production de ces NP est fortement dispendieuse et, hormis la nouvelle production à grande échelle, une grande proportion de ce métal est recyclée. La mise en valeur de cet élément doit son mérite aux diverses applications possibles dû à ses nombreuses propriétés attrayantes. Par exemple, étant données les réglementations de l'industrie automobile qui, à travers les années, deviennent de plus en plus restrictives, obligent les fabricants à diminuer l'émission des voitures. Ainsi, les NP de Pd sont sollicités comme catalyseurs de contrôles d'émission. De plus, ils sont notamment utilisés comme catalyseur industriel. Ce métal est également utilisé dans les équipements électriques comme composés actifs et passifs. Les NP de Pd jouent également un rôle important comme éboueur d'hydrogène (Adams *et al.*, 2011). Néanmoins, son exploitation ne se limite pas seulement aux industries de fabrications. D'ailleurs, ces NP sont aussi utilisées dans les appareils dentaires et dans la fabrication les bijoux. À savoir,

le premier cas d'asthme bronchique dû à une exposition au Pd a été rapporté chez un homme portant des alliages dentaires à base de ce métal (Satoshi Yoshida *et al.*, 1999b). Cependant, malgré cette corrélation, aucun article n'a encore investigué l'interaction entre ces deux acteurs qui, pourtant, fait preuve d'un grand intérêt en nano toxicologie.

3.1.4 Exposition et toxicité connue

Les sources d'expositions des NP de Pd ont été bien répertorié à travers les dernières années, mais pour les besoins de ce mémoire, seules les expositions pouvant affecter directement les humains et, par conséquent, les éosinophiles, ne seront détaillées. D'abord, étant donné que la production et l'exploitation de ces éléments ne sera pas freiné d'aussitôt, des résultats d'analyse révèlent que des traces de Pd ont été décelées dans la neige et dans la glace à près de 2770 Pd/L par année (Kielhorn *et al.*, 2002). De plus, ces éléments se trouvent également dans l'air ambiant ($15\text{pg}/\text{m}^3$) et dans la poussière ($0.8\text{ ng}/\text{g}$) (Kielhorn *et al.*, 2002). Considérant la présence des NP de Pd dans l'air, il est estimable que l'exposition maximale par inhalation de NP de Pd au quotidien se chiffre à $0.3\text{ng}/\text{personne}/\text{jour}$ en assumant que le volume d'inhalation quotidien est rapporté à 22m^3 (Kielhorn *et al.*, 2002). Il est aussi connu que ces NP se retrouvent dans le sol particulièrement près des routes selon des concentrations variant entre 0.7 à $47\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ (Kielhorn *et al.*, 2002). Au niveau des dépôts dans les égouts, selon les pays, les concentrations retrouvées varient entre 20 et $450\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$. En ce qui a trait à l'exposition aux NP de Pd via l'alimentation, l'ingestion de ces éléments est relativement faible comparativement aux autres voies d'exposition ; la quantité maximale estimée suivant l'ingestion d'aliments contenant des traces de Pd se chiffre en deçà de $2\text{ }\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$ (Kielhorn *et al.*, 2002). La voie d'exposition qui montre probablement le plus grand potentiel toxicologique se trouve au niveau alliages dentaires où une les valeurs se chiffrent entre 1.5 et $15\text{ }\mu\text{g}/\text{personne}/\text{jour}$. Évidemment, les sources de raffineries, de procédés et de recyclages sont également sujettes à une exposition importante de NP de Pd, mais étonnamment, les valeurs rapportées dans l'air ambiant de ces industries sont nettement inférieures à celles de l'exposition buccale.

En 2018, les chercheurs Leso et Iavicoli ont répertorié différents effets toxicologiques tout en mentionnant les effets potentiellement à risque des NP de Pd non seulement du règne animal, mais aussi du règne végétal (Leso *et al.*, 2018). De ce fait, certains travaux de leur revue de littérature seront abordés dans les paragraphes suivants. Selon des études qui mettent en scène des modèles végétaux, il est connu que les NP de Pd dont la taille se chiffre entre 1 et 12 nm occasionnent du stress abiotique, une diminution de la croissance des feuilles d'orge et ces structures, lorsque développées, sont plus rigides (Battke *et al.*, 2008). Une autre étude a démontré qu'au niveau de la germination et la croissance des laitues, les sujets exposés aux NP de Pd sous forme de matrice d'hydroxyde d'aluminium pendant 15 jours manifestent une altération du ratio feuille/racine affectant possiblement leur croissance (Shah V., 2009). Quoique la croissance végétale n'est pas le vif du sujet dans le prochain article, la production et la performance du pollen chez les plants de kiwi sont affectées à la baisse lorsque ces plants sont exposés aux NP mesurant entre 5 et 10 nm. De plus, ces mêmes plants montrent une diminution de la viabilité lorsque les concentrations de NP se chiffrent à 1.0 ± 0.3 mg/L (Speranza *et al.*, 2010). Même s'il est important, voire cruciale de se pencher sur les effets toxicologiques des NP sur le règne végétal, il en demeure que les effets évalués pour ce présent mémoire gravitent autour des cellules humaines, plus précisément, les cellules immunitaires.

De façon imminente, les effets délétères suivant l'exposition aux NP de Pd auraient des impacts sur l'inflammation. Manifestement, plusieurs NP ont pour cible les granulocytes et il n'en est pas moins pour les NP de Pd. Par contre, étant donné que très peu d'études porte une attention particulière entre l'interaction des NP de Pd et les granulocytes, encore moins les éosinophiles, il est concevable d'étudier les autres acteurs avec lesquels les granulocytes interagissent. Étant donné qu'il s'agit de NP, le Pd peut traverser les membranes épithéliales et endothéliales afin de se loger au niveau des organes, de la circulation sanguine et lymphatique et même au niveau du système nerveux (Oberdorster *et al.*, 2005).

De ce fait, quelques études *in vitro* ont démontré ces répercussions qui sont loin d'être négligeables. Par exemple, étant donné que les éosinophiles misent sur l'interaction avec les cellules épithéliales bronchiques lors des réponses allergiques, Wilkinson et al ont démontré une altération de la physiologie des cellules tapissant les bronches en étudiant la réponse cellulaire auprès de la lignée A549. En présence de NP de Pd, la viabilité de celles-ci est diminuée de façon importante, et ce, par apoptose. De plus, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de prostaglandines, soit l'IL-8 et les PGE₂ est modulée à la hausse (Kai E. Wilkinson *et al.*, 2011a). Par conséquent, la libération d'IL-8 pourrait instaurer un état inflammatoire transitoire, sollicitant une première vague de neutrophiles qui, de façon collatérale, font appel aux éosinophiles. Ayant également un effet pro-inflammatoire, une autre étude a montré que les NP de Pd induisent la libération d'IFN- γ tout en inhibant la production de TNF- α chez les cellules mononuclées sanguines périphériques (Reale *et al.*, 2011). Selon un constat similaire, la présence de NP de Pd cause une production excessive de ROS auprès des leucocytes de monocytes THP-1 (Nicole Neubauer *et al.*, 2015b). D'autres études ont investigué la libération de cytokines auprès des PBMC et la tendance montre une diminution de la production des cytokines TNF- α et IL-17 sans pour autant altérer la viabilité cellulaire chez les PBMC (Boscolo *et al.*, 2010, Reale *et al.*, 2011). Bien sûr, des auteurs ont également utilisé des lignées cellulaires, telles que les HeLa et en présence de NP de Pd seules ou en conjonction avec le Pt, la viabilité cellulaire se voit diminuée (Dahal *et al.*, 2015, Ghosh *et al.*, 2015). Également chez la lignée cellulaire A2780 qui est reconnue comme modèle de cellules cancéreuses ovariennes, suivant une exposition à 6 $\mu\text{g/mL}$, la viabilité cellulaire, une production de ROS importante est détectable et l'apoptose est induite (Gurunathan *et al.*, 2015). Quoiqu'il s'agisse de modèle intéressant et qu'il en demeure que les études sur les NP de Pd doivent être davantage développées, comme mentionné plus haut, les effets sur les cellules immunitaires dont les éosinophiles et la lignée cellulaire A549 sera mis de l'avant.

À travers ces articles qui pointent les effets pro-inflammatoires des NP de Pd, aucune étude n'a su déterminer le profil modulateur de la biologie des éosinophiles. Entre autres, l'intérêt d'investiguer la toxicité de ces agents sur les éosinophiles repose sur l'évidence d'une infiltration de ces granulocytes dans les poumons suivant l'inhalation des NP et, comme de fait, cette exposition a fait le premier cas d'asthme bronchique.

Une étude *in vivo* montre qu'une administration intraveineuse de cet élément occasionne une dysfonction significative des tubules rénaux, alors qu'une autre étude a montré qu'une dose de 12 µg/kg cause la production de plusieurs cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF et INF- γ) dans le sérum des rats (Iavicoli *et al.*, 2015). Cependant, la provenance de ces cytokines n'a pas été déterminée, laissant place à la possibilité que les neutrophiles et les éosinophiles prennent part à l'origine de ces cytokines immunomodulatrices. Malgré que toutes les évidences émergentes suggèrent un effet sur le système immunitaire et, considérant que la voie d'exposition majoritaire aux NP de Pd est par inhalation, cette lacune d'études motive la rédaction de l'article scientifique présenté dans ce présent mémoire qui, hors de tout doute, fournit des résultats pionniers quant à la compréhension des effets des NP de Pd sur les éosinophiles en utilisant un modèle cellulaire (AML 14.3D10). Ainsi, l'article présenté permet d'acquérir une vision plus éclaircie et contribue inévitablement à la compréhension des effets de ces métaux nobles sur la physiologie des éosinophiles.

3.2 Problématique, hypothèse et objectifs de recherche

Problématique

Il est connu que certaines NP provoquent une modification délétère quant à la physiologie des granulocytes. Cependant, il en demeure que les études en nano-immunologie sont lacunaires auprès des éosinophiles. Tel que mentionné plus haut, les éosinophiles, malgré qu'ils soient présents à faible occupation, possèdent la capacité d'orchestrer plusieurs réactions inflammatoires, notamment au niveau des voies respiratoires. Étant donné que les NP de Pd sont acheminés auprès de l'hôte par inhalation et sachant que les éosinophiles sont les premières cellules sollicitées dans les voies respiratoires, il est concevable que ces NP puissent altérer la physiologie des éosinophiles et indirectement, pourraient occasionner une modification de la réponse inflammatoire.

Hypothèse

À la lumière des travaux précédents, nous émettons l'hypothèse suivante : les NP de Pd ont la faculté d'altérer plusieurs fonctions cellulaires des éosinophiles humains et des AML14.3D10.

Objectifs

Cibler les effets des NP de Pd sur la viabilité des éosinophiles et des AML14.3D10, ainsi que sur les fonctions cellulaires suivantes : le réarrangement du cytosquelette, l'adhésion et la production de ROS.

SECTION 2 : ARTICLE

CHAPITRE 4: ACTIVATION OF HUMAN EOSINOPHILS WITH PALLADIUM NANOPARTICLES (PD NPS): IMPORTANCE OF THE ACTIN CYTOSKELETON IN PD NPS-INDUCED CELLULAR ADHESION

4.1 Présentation de l'article

Titre en français

Les nanoparticules de palladium activent les éosinophiles humains : L'importance du cytosquelette dans l'adhésion cellulaire provoquée par ces métaux nobles.

Auteurs

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

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

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

Contribution: analyse des résultats d'adhésion pour les éosinophiles.

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

Contribution: Préparation des NP.

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

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

Journal de publication : Environmental Toxicology and Pharmacology, article publié en date du 11 décembre 2017.

Résumé en français

Le palladium est connu pour être libéré dans l'environnement sous forme de particules fines et ultrafines volatiles, et ce, en provenance des convertisseurs catalytiques des automobiles. Par conséquent, cette disponibilité occasionne une augmentation de l'exposition à ces métaux nobles. D'ailleurs, il est connu que Pd peut causer des réactions allergiques chez les individus qui ont été

exposés à ces NP par différentes voies d'exposition. Des études ont démontré une infiltration à la hausse d'éosinophiles au niveau des voies respiratoires suivant une exposition *in vivo* chez les rongeurs à partir de modèles d'allergies et d'inflammation. Étant donné l'importance de l'implication des éosinophiles dans les réactions allergiques, l'asthme et d'autres pathologies respiratoires, il est étonnant de constater que l'effet direct des NP de Pd à l'échelle nanométrique est lacunaire. De ce fait, le but de cette étude consiste à déterminer le profil modulateur des NP de Pd sur la biologie des éosinophiles humains. D'une part, grâce à la caractérisation des NP de Pd par un système dynamique de dispersion de la lumière révèle la présence d'agrégats lorsque les NP sont suspendus dans différentes solutions selon l'expérience en mire. Les NP de Pd (0,5 à 150 µg/mL) n'induisent pas de nécrose, ni d'apoptose significative chez les éosinophiles, tel que démontré par le test d'exclusion du bleu de trypan, par cytométrie en flux à l'aide de FITC-annexine V et d'iodure de propidium, ainsi que par constat morphologique au microscope optique. De même, contrairement aux contrôles positifs, Pd n'induit pas la production de ROS, mais ciblerait plutôt le cytosquelette d'actine étant donné que l'actine se relocalise à l'intérieur de la cellule comparativement aux témoins négatifs, tel qu'illustré par microscopie à fluorescence. Clairement, les NP de Pd augmentent l'adhésion des éosinophiles sur les cellules endothéliales humaines EA.hy926. En utilisant un inhibiteur de la polymérisation d'actine qui est la cytochalasine D, le phénomène d'adhésion a été renversé. Nos résultats indiquent que les NP de Pd peuvent cibler le cytosquelette et augmentent l'adhésion des éosinophiles humains selon un mécanisme dépendant de l'actine. Ces résultats suggèrent les éosinophiles humains peuvent être activés par les NP de Pd, mettant en relief l'importance d'investiguer le mécanisme par lequel les NP peuvent altérer la biologie de cellules humaines impliquées dans les allergies, l'asthme et d'autres pathologies respiratoires ainsi que d'autres problèmes inflammatoires.

4.2 Activation of human eosinophils with palladium nanoparticles (Pd NPs): importance of the actin cytoskeleton in Pd NPs-induced cellular adhesion.

4.2.1 Abstract

Palladium (Pd) is known to be released into the environment in the fine and ultrafine (at the nanoscale) airborne particle fractions mainly from automobile catalytic converters leading to an increase human exposure to this noble metal. It was reported that Pd can induce allergic reactions in individuals exposed to it via different ways. Some studies reported an increased number of eosinophils into airways following NP exposure *in vivo* in rodent models of allergies and inflammation. Knowing the importance of eosinophils in allergies, asthma and other lung diseases, it is surprising to observe that the direct effect of Pd at the nanoscale in eosinophils has been poorly documented.

The aim of this study was to determine how Pd NPs will affect the biology of human eosinophils. Characterization of Pd NPs by dynamic light scattering indicates the presence of some aggregates when suspended in diverse solutions used here for the different experiments. Pd NPs did not significantly induce cell necrosis and apoptosis in eosinophils (0.5-150 µg/ml) as assessed by trypan blue exclusion assay, flow cytometry after staining with FITC-annexin V and propidium iodide and by morphological observations by optical microscopy.

Pd NPs, unlike the positive controls, did not induce reactive oxygen species (ROS) but were found to target the actin cytoskeleton, since actin was differently re-located intracellularly when compared to untreated cells as determined by fluorescence microscopy. Clearly, Pd NPs were found to increase adhesion of eosinophils onto human endothelial EA.hy926 cells. Using cytochalasin D, a cell-permeable and potent inhibitor of actin polymerization, this ability to increase adhesion was drastically reversed. Our results indicate that Pd NPs can target the cytoskeleton and increase the adhesion of human eosinophils by an actin-dependent mechanism. These findings show that human eosinophils can be activated by Pd NPs emphasizing the importance of fully investigating how these NPs could alter the biology of human cells involved in allergies, asthma and other lung diseases as well as in various other inflammatory disorders.

Keywords: inflammation; eosinophils; nanoparticle; palladium; adhesion

4.2.2 Introduction

Nanoparticles (NPs) possess an increased surface area and small size over their corresponding bulk materials given them unique properties. Since few years, the use of NPs in several sectors is increasing very rapidly. For examples, the potential applications of NPs in optical, biomedical, and electronic fields are gaining increasing interest (Arora *et al.*, 2012, Chaloupka *et al.*, 2010). Palladium (Pd) is a noble metal that belongs to the platinum group elements (PGEs) that also include platinum, iridium, osmium, rhodium and ruthenium. Although Pd is mainly used in the automobile industry as an active catalyst material in automobile catalytic converters, it also has applications in jewelry, electronics, dentistry, only to name a few (Ravindra *et al.*, 2004). Of note, Pd is a common component of dental alloys and the first case of exacerbation of bronchial asthma caused by Pd allergy was reported several years ago (S. Yoshida *et al.*, 1999a). Pd could be released into the environment in the fine and ultrafine (smaller than 100 nm) airborne particle fractions (S. Rauch *et al.*, 2002b). Because of the presence of Pd at such nanoscale and since inhalation represents one of the major routes of human exposure to Pd NPs, some recent studies aiming at better understanding their impact on health have reported some adverse effects of Pd NPs, including inflammation. For example, Pd NPs were found to reduce the cell viability and to induce apoptosis in primary human bronchial epithelial cells as well as to increase the production of the pro-inflammatory IL-8 chemokine (K. E. Wilkinson *et al.*, 2011b). While Pd salts were found to inhibit cytokine release from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of non-atopic women, Pd NPs were found to increase the release of IFN- γ (Boscolo *et al.*, 2010). In one other study, the production of reactive oxygen species (ROS) from human monocytic leukemia THP-1 cells was increased by Pd NPs (N. Neubauer *et al.*, 2015a). In vivo, intravenous administration of Pd NPs was reported to cause significant renal tubular dysfunction in rats (Fontana *et al.*, 2015). In one other study, the highest tested concentration of Pd NPs (12 $\mu\text{g}/\text{kg}$) increased the production of several cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF and INF- γ) measured in the rat serum (Iavicoli *et al.*, 2015). Despite these observations indicating that Pd and/or Pd-NPs possess pro-inflammatory properties and that Pd is known to induce allergies (Iguchi *et al.*, 2016, Kobayashi *et al.*, 2013), no study reported how Pd could alter the biology of eosinophils known to exert an important role in lung diseases and diverse allergies. Such lack of information in the literature could, however, be explained by the fact that nanotoxicology is a relatively recent discipline that has gained increasing attention only in the recent few years

(Oberdorster *et al.*, 2005). Of note, an increase number of eosinophils was observed in response to NP exposure in airway rodent models of allergies including cerium dioxide (CeO₂), nickel oxide (NiO), zinc oxide (ZnO), copper oxide (Sevier *et al.*), titanium dioxide (TiO₂) and silica NPs (Brandenberger *et al.*, 2013, Cho *et al.*, 2010, S. T. Larsen *et al.*, 2010a, Roy *et al.*, 2013). Despite all of the above observations, in addition to an older study reporting occupational asthma caused by palladium 18 years ago (Daenen *et al.*, 1999), although not at the nanoscale, it is surprising that the direct effect of Pd NP on the biology of human eosinophils, cells greatly involved in lung diseases including asthma, has been neglected. Although inhalation is probably the primary route of human exposure to NPs and that lungs would capture them, NPs possess the capacity to cross membranes and then being distributed throughout the body, including blood circulation.

Recently, using the human eosinophilic cell line AML14.3D10, we reported that ZnO and nanosilver (20 nm) NPs induced apoptosis and cytoskeleton breakdown as evidenced by the cleavage of lamin B1. These NPs were found to increase the production of different analytes including the potent pro-inflammatory CXCL8 (IL-8) chemokine. In contrast, TiO₂, CeO₂, and nanosilver of 70 nm NPs did not alter the apoptotic rate as well as the production of pro-inflammatory cytokines, indicating that distinct NPs do not activate similarly human eosinophils. More recently, using freshly isolated human eosinophils, we demonstrated that, unlike AML-14.3 D10 cells, ZnO NPs delayed eosinophil apoptosis by inhibiting caspases and by preventing caspase-4 and Bcl-xL degradation. In addition, treatment with ZnO NPs did not induce production of reactive oxygen species but increase *de novo* protein synthesis as well as the production of the pro-inflammatory IL-1 β and IL-8 cytokines. Taking together, the results of this study establish for the first time that human eosinophils represent potential new direct targets to NPs. More recently, although we performed a study focusing on the ability of TiO₂ NPs to increase the adhesion of human eosinophils onto endothelial cells, several other NPs were found to increase such eosinophil adhesion, including Pd NPs, yet by an unknown mechanism (M. Murphy-Marion *et al.*, 2017). In the present study, in order to increase our knowledge on the mode of action of Pd NPs, we investigated how they affect the biology of both human eosinophilic AML-14.3D10 cells and freshly isolated mature human eosinophils.

4.2.3 Materials and Methods

Chemicals.

RPMI-1640, HEPES, penicillin/streptomycin (P/S), *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), sodium pyruvate, Hoechst 33342 and cytochalasin D (CD) were purchased from Sigma-Aldrich, (Saint-Louis, Missouri). Recombinant human GM-CSF and eotaxin, IL-5 was purchased from Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) and FITC-phalloidin from Invitrogen/Life Technologies Inc. (Burlington, ON).

Pd NPs.

An aqueous solution of Pd NPs of 1.5 mg/ml, stabilized by sodium polyacrylate was purchased from Sciventions Inc. (Toronto, ONT, Canada). According to the manufacturer, the particle size is 1-10 nm (90%) as determined by transmission electron microscopy.

Characterization of Pd NPs by dynamic light scattering.

The size distribution and zeta potential of Pd NPs were determined using a Zetasizer Nano-ZS (model ZEN3600) from Malvern Instruments Inc. (Westborough, MA). Measurements were performed with NPs in suspension in HBSS, RPMI-1640 and RPMI-1640 + 10% human serum according to the tested functions, at a concentration of 100 µg/ml, as detailed under. In addition, measurements were performed with Pd NPs suspended in and RPMI-1640 + 10% human serum + sodium pyruvate, the culture medium for AML14.3D10 cells.

Human EA.hy926 and AML14.3D10 cell cultures.

The human umbilical vein cell line, EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%. Human eosinophilic AML14.3D10 cells (referred to as 3D10 cells hereafter) were generated and kindly provided by Drs. C. C. Paul and M. Baumann (Wright State University, Dayton, OH) (Baumann *et al.*, 1998) and were used as we previously published (Lavastre *et al.*, 2005, Vallieres *et al.*, 2016). In brief, 3D10 cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in the same buffer as above with addition of 1M sodium pyruvate. Cells were cultivated at a density between 2 x 10⁵ and 1 x 10⁶/ml, and the medium was

changed three times per week. Before performing the different experiments, the cell viability was systematically verified by trypan blue exclusion and was found to routinely be >98%.

Eosinophil isolation.

Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Granulocytes were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque, to obtain neutrophils and eosinophils as previously described (Lavastre *et al.*, 2005). When >5% of eosinophils were detected in granulocyte enriched preparations, as determined by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ), eosinophils were separated from neutrophils by negative immunomagnetic selection using anti-human CD16-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Purity after eosinophil isolation was routinely >96% and cell viability was always greater than 98%, as determined by trypan blue exclusion before and after treatment with NPs.

Cell viability

Human 3D10 cells and freshly isolated human eosinophils (1×10^6 cells/ml of RPMI-10% autologous serum) were incubated at 37 °C in 5% CO₂ in 12-well plates during 24h in the presence of buffer or increasing concentrations (0-150 µg/ml) of Pd NPs. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay.

Detection of intracellular ROS

Human 3D10 or eosinophils (1×10^6 cells/ml) were suspended in HBSS containing 10µM CM-H₂DCFDA for 15 min at 37°C as previously published (Simard *et al.*, 2011). Cells were then washed twice before being incubated in the presence of buffer or 50 or 150 µg/ml Pd-NPs for 0-90 min. PMA (0.1µg/ml) was used as a positive control. Fluorescence was recorded using a FACScan. ROS production was expressed as MFI.

Assessment of cell necrosis and apoptosis.

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

Actin localisation.

F-actin expression was used to identify cells activation in response to Pd NPs. Briefly, 10^6 /mL of 3D10 cells were incubated for 5, 15 and 30 minutes at 37°C with buffer (Ctrl) or Pd NPs in a final volume of 500 µL. Eotaxin, at 100 ng/mL, was used as a positive control. Cells were then fixed and permeabilized with 0.01% digitonin and 4% paraformaldehyde before being washed twice by centrifugation. Afterwards, they were co-incubated with 2 units of FITC-phalloidin and 5 µg/mL of Hoechst 33342 dye for 20 min at 4°C light protected. Cells were then centrifuged onto microscope slides before adding ProLong Gold antifade reagent and actin localization was assessed by monitoring FITC-phalloidin expression by fluorescent microscopy.

Cell adhesion.

Eosinophils or 3D10 cells were treated 30 min with buffer (Ctrl), GM-CSF or 100 µg/ml Pd NPs prior treatment or not with 1 µg/ml cytochalasin D (a cell-permeable and potent inhibitor of actin polymerization), and then labeled for 30 min with 5µM calcein-AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Eosinophils or 3D10 cells adhesion onto EA.hy926 cells was measured essentially as we have previously published using human A549 cells as substrate (M. Pelletier *et al.*, 2005). The number of adherent cells was calculated by counting the number of fluorescent cells from five randomly selected high-power fields (x 400) observed with a photomicroscope Leica DMRE equipped with an ebq 100 dc epifluorescent condenser. Images were taken with a Cooke Sensicam High performance camera coupled to the Image Pro-plus® (version 4.0) program.

Statistical Analyses.

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

4.2.4 Results

Characterization of Pd NPs.

As illustrated in **Table 1**, the DLS analysis reveals that the size distribution of Pd NPs in RPMI + serum ± sodium pyruvate was trimodal but bimodal in H₂O or HBSS and unimodal in RPMI alone. The data indicate that the size distribution was > 100 nm and therefore not considered as ‘NPs’ according to the definition that a NP should possess its three dimensions under 100 nm. Large aggregates (> 200 nm) were observed only in a small portion (<3%) when Pd NPs were suspended in HBSS. Curiously, more than ~90% of the size distribution of the Pd NPs suspended in H₂O alone was with a size of 446.9 ± 14.1 nm, a size not considered as NPs. The PDI indicates that the distribution type is relatively moderate (H₂O, HBSS, RPMI) to broadly (RPMI + serum ± sodium pyruvate) polydisperse and the zeta potential values indicate that the Pd NPs suspensions are not really stable.

Table 1. Characterization of Pd NPs by dynamic light scattering.

Buffer	Size (nm)	% intensity	PDI ^b	zeta potential (Namvar <i>et al.</i>)
H₂O	446.9 ± 14.1 ^a	90.1 ± 2.7	0.35 ± 0.04	-33.1 ± 2.3
	76.5 ± 8.5	9.9 ± 2.7		
HBSS	251.4 ± 10.4	98.2 ± 1.7	0.27 ± 0.02	-18.9 ± 2.7
	2611.8 ± 3629	2.7 ± 0.9		
RPMI	291.1 ± 3.6	100 ± 0	0.41 ± 0.01	-19.3 ± 0.3
RPMI +serum	135.3 ± 18.3	48.8 ± 2.0	0.8 ± 0.007	-0.2 ± 0.2
	16.8 ± 2.7	35.7 ± 0.5		
	4.5 ± 0.4	14.8 ± 2.8		
RPMI +serum + SP^c	143.2 ± 23.7	49.7 ± 6.0	0.8 ± 0.004	-0.01 ± 0.005
	16.7 ± 5.4	38.2 ± 3.6		
	770.5 ± 1326	12.0 ± 9.1		

^aResults are means ±SD from three different lectures. NP were suspended at 100 µg/ml in the indicated buffer and measurements were performed at 37 °C.

^bPolydispersity index; ^csodium pyruvate

Pd NPs are not cytotoxic for human 3D10 eosinophilic cells.

We first determined if Pd NPs can alter the cell viability of 3D10 cells in concentration ranging from 0.5 to 150 µg/ml, concentrations of NPs commonly used *in vitro* by us (Goncalves *et al.*, 2010, Noel *et al.*, 2016, L. R. Silva *et al.*, 2016a) and others (Arora *et al.*, 2009, Kurtz-Chalot *et al.*, 2017, Rosas-Hernandez *et al.*, 2009), including Pd NPs (Dahal *et al.*, 2015). As illustrated in **Fig. 1A**, the cell viability of 3D10 cells was always greater than ~85% as determined by trypan blue exclusion assay in response to the Pd NPs treatment for up to 24h of incubation at all tested concentrations ranging from 0.5-150 µg/ml. Hereafter, otherwise specified, we selected the concentration of 100 µg/ml for the *in vitro* assays not only for comparison purposes with other

kinds of NPs, but also since we previously used such a concentration for treating human neutrophils with different NPs (Babin *et al.*, 2013, Goncalves *et al.*, 2010, Goncalves *et al.*, 2014, Noel *et al.*, 2016, Poirier *et al.*, 2014) and, more recently, human eosinophils (L. R. Silva *et al.*, 2016a). Since Pd or Pd NPs were previously reported to induce cytotoxicity and ROS production in a limited number of studies (especially at the nanoparticle size), in cells other than human eosinophils (N. Neubauer *et al.*, 2015a, Schmid *et al.*, 2007), we next decide to study their effects on the ROS production. As illustrated in **Fig. 1B**, Pd NPs do not induce ROS production in 3D10 cells after 1 to 60 min of treatment. Cells were, however, responsive since, as expected (Armstrong *et al.*, 2002), treatment with H₂O₂, use as positive control, induces a strong ROS production already after 1 min of stimulation.

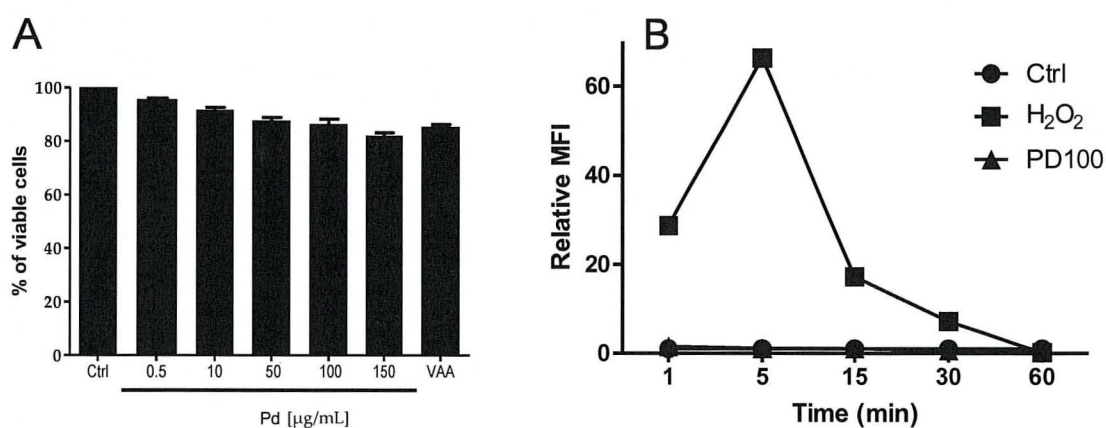


Figure 1. PD NPs do not alter cell viability and ROS production in human 3D10 cells.

Cells were incubated with buffer (Ctrl), the indicated concentrations of Pd NPs or with 1 μ g/ml of the proapoptotic plant lectin *Viscum album* agglutinin-1 (VAA) for 24h to determined cell viability (A) or with buffer (Ctrl), 1M H₂O₂ used as positive control or 100 μ g/ml Pd NPs (PD100) for the indicated periods of time for measuring ROS production (B) as described in materials and methods. Results are means \pm SEM (A, n=3 and B, n=5).

Pd NPs do not alter the apoptotic rate in 3D10 cells.

Because some NPs were recently found to induce 3D10 cell apoptosis (Vallieres *et al.*, 2016) and since apoptotic cells also exclude trypan blue and are therefore in a way considered to be viable, we next determined the apoptotic rate of 3D10 cells after treatment with Pd NPs using two different methods. Using the flow cytometry procedure, Pd NPs did not alter the apoptotic rate of 3D10 cells (**Fig. 2A**) in concentration ranging from 0-150 $\mu\text{g/ml}$. Indeed, the number of annexin-V positive cells, (early apoptosis, upper panel) and annexin-V/PI positive cells (late apoptosis, bottom panel) did not significantly change when compared with control cells. Also, Pd NPs did not induce cell necrosis (PI positive cells, middle panel). As expected (Vallieres *et al.*, 2016), VAA-I was found to increase apoptosis ($\sim 70\%$ for both early and late apoptosis) and to weakly induce some cell necrosis ($< 2\%$) in 3D10 cells. **Fig. 2B** shows the results obtained by the morphological observations to confirm that Pd NPs have no significant effect on apoptosis. Again, VAA-I was found to induce apoptosis.

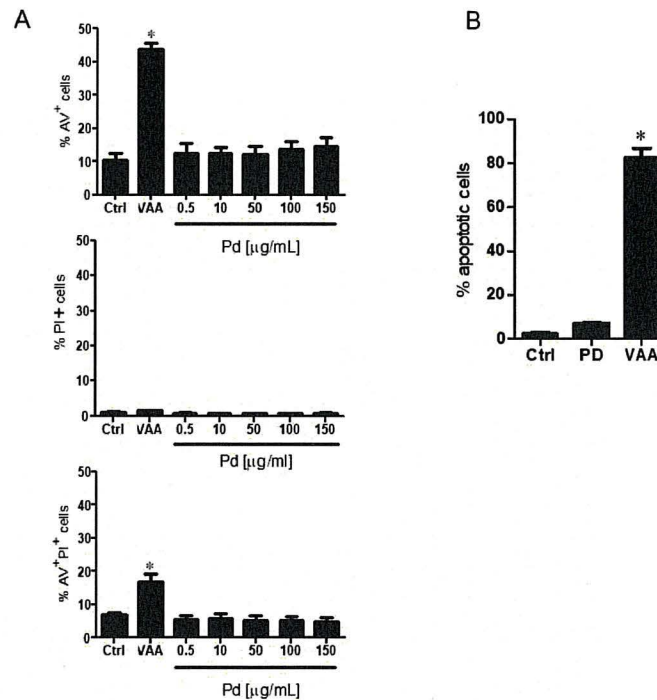


Figure 2. Pd NPs do not induce apoptosis and necrosis in 3D10 cells.

Cells were incubated with buffer (Ctrl), 1 $\mu\text{g/ml}$ VAA-1 (VAA) or the indicated concentrations of Pd NPs (A) or 100 $\mu\text{g/ml}$ (B), for 24h. Apoptosis and necrosis were then determined by flow cytometry after staining with FITC annexin V/PI (A) or apoptosis by cytology as described in materials and methods. See representative example of population determination on dot plot (Annexe 1). Results are means \pm SEM (A, n=4; B, n=3).

Pd NPs induce cytoskeleton rearrangement in 3D10 cells.

Different types of NPs were previously found to alter the actin cytoskeleton in human granulocytes (Abrikossova *et al.*, 2012, Babin *et al.*, 2013), but this has not been investigated in Pd NPs-induced human eosinophil cells. Using fluorescence microscopy, Pd NPs were clearly found induce actin cytoskeleton rearrangement in 3D10 cells (**Fig. 3**). Interestingly, when compared to untreated cells where the actin staining is observed mainly in the cytoplasm (**Fig. 3A**), the positive control eotaxin (Elsner, 1996, 8765040) was found to induce a re-localization of actin mainly at the cell membrane (**Fig. 3B**), whereas actin was intensively and diffusely stained in the cytoplasm after treatment of cells with Pd NPs (**Fig. 3C**). This indicates that Pd NPs can activate 3D10 cells.

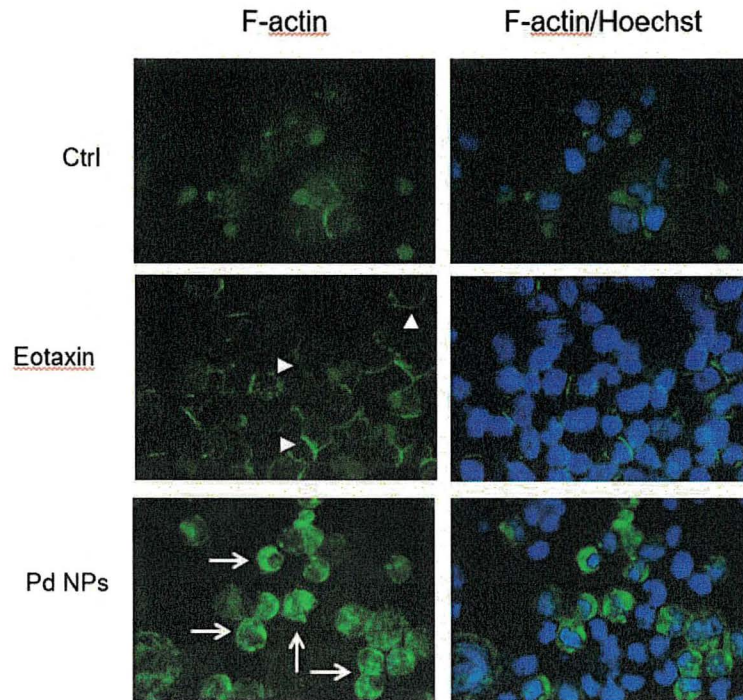


Figure 3. *Pd NPs induce actin re-localization.*

Cells were incubated with buffer (Ctrl), the positive control eotaxin (100 ng/mL) or Pd NPs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 minutes. Cells were then centrifuged onto microscope slides and actin localization was monitored by fluorescence microscopy after staining with FITC-phalloidin as described in materials and methods. Cells treated with eotaxin show mainly a cortical localization of actin with a slight increase of fluorescence signal (arrowheads) whilst those treated with Pd NPs show a disperse redistribution of F-actin with an increase of fluorescence intensity (arrows). Hoechst 33342 dye was used to distinguish cells nuclei and to show absence of cell death/apoptosis. Results are from one representative experiment out of 4.

Pd NPs induces adhesion of 3D10 cells onto endothelial cells.

Knowing that Pd NPs activate actin reorganization in 3D10 cells and since we recently demonstrated that several types of NPs, including Pd NPs, can increase adhesion of human eosinophils onto endothelial cells (M. Murphy-Marion *et al.*, 2017), we next decide to answer whether or not Pd NPs could also increase adhesion of 3D10 cells and to determine the importance of the actin cytoskeleton during this biological process. As illustrated in **Fig. 4**, treatment of cells with Pd NPs was found to significantly increase 3D10 cell adhesion onto human EA.hy926 endothelial cells by a factor of 1.6 ± 0.2 (mean \pm SEM, n=6) which is close to 1.8 ± 0.2 obtained after treatment of 3D10 cells with the cytokine GM-CSF used as a positive control (M. Murphy-Marion *et al.*, 2017). Pre-treatment of cells with cytochalasin D, a cell-permeable and potent inhibitor of actin polymerization, was found to reverse the effect of Pd NPs to a value close cells untreated or treated with the inhibitor alone.

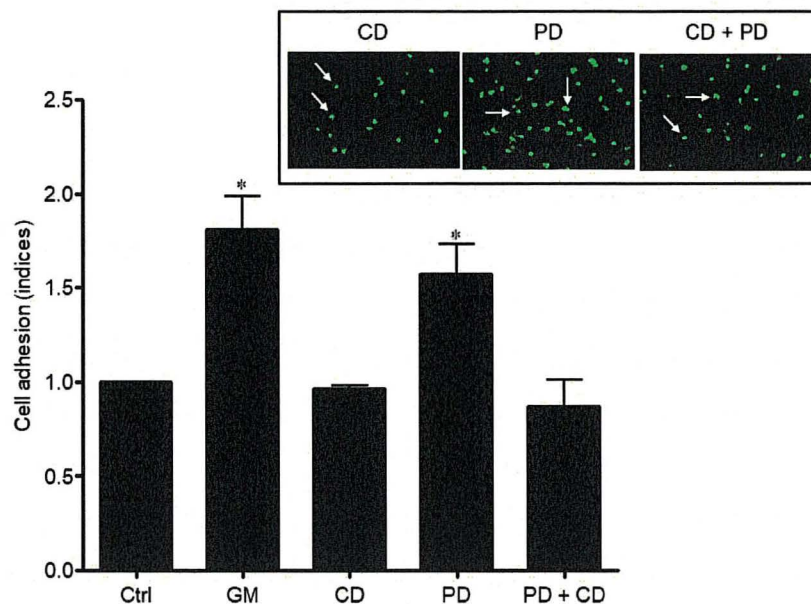


Figure 4. Pd NPs induce 3D10 cell adhesion by an actin-dependent mechanism.

3D10 cells were pre-incubated for 30 min with buffer or CD and then treated for 30 min with equivalent volume of buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM) or Pd NPs and then cell adhesion was determined as described in materials and methods. Results are expressed as indices (means \pm SEM, n=6). Inset, typical images obtained by fluorescence microscopy where each dot (arrow) represents one adherent 3D10 cell. Note that pre-treatment with CD decreases the number of adherent cells induced by Pd NPs close to that of untreated cells.

Interaction Pd NPs-human eosinophils: role of actin cytoskeleton in Pd NP-induced eosinophil adhesion.

We next decided to determine whether or not Pd NPs will act similarly on mature human primary eosinophils. However, before that, we first study potential cytotoxic and apoptotic effect in the same experimental conditions used with 3D10 cells. As illustrated in **Fig. 5A**, Pd NPs did not significantly alter cell viability of eosinophils and did not induce ROS production (**Fig. 5B**). In contrast to 3D10 cells having a basal level of apoptosis of ~10% (**Fig. 2**), human eosinophils are known to undergo spontaneous apoptosis explaining why the basal level is rather close to 30-50% (**Fig. 5C** and **Fig. 5D**) 3, as expected after 24h of culture without agent other than serum (L. R. Silva *et al.*, 2016a). This basal level was not altered by Pd NPs in contrast to zinc oxide NPs that we recently demonstrated to delay eosinophil apoptosis (L. R. Silva *et al.*, 2016a). Indeed, as assessed by flow cytometry (**Fig. 5C**), Pd NPs did not alter both the early and late apoptotic rate of human eosinophils and did not also induce cell necrosis. **Fig. 5D** shows the results obtained by the morphological observations. By this essay, we found that Pd NPs did not significantly alter the basal apoptotic rate ($38.8 \pm 2.3\%$ for Pd NPs vs $29.9 \pm 0.5\%$ for control). As expected, VAA-1 significantly increased the basal apoptotic level to $92.0 \pm 1.5\%$ (Lavastre *et al.*, 2005), whereas ZnO NPs decreased it to $10.3 \pm 2.3\%$ (L. R. Silva *et al.*, 2016a). Although we previously documented that several NPs, including Pd NPs can increase the adhesion of human eosinophils onto EA.hy926 endothelial cells, the mechanism involved in Pd NP-induced adhesion was not investigated (M. Murphy-Marion *et al.*, 2017). Here, we first confirmed that indeed Pd NPs increase eosinophil adhesion. **Fig. 6A** shows that, Pd NPs at and increase the ability of eosinophils to adhere by a factor of 1.5 ± 0.1 (mean \pm SEM, n=4) when used at 50 $\mu\text{g/ml}$ and 1.7 ± 0.4 at 100 $\mu\text{g/ml}$. Then, as for 3D10 cells, we investigated the role of actin in this process. **Fig. 6B** demonstrates clearly that the ability of Pd NPs to increase cell adhesion was also reversed with the use of cytochalasin D, indicating the importance of the actin cytoskeleton.

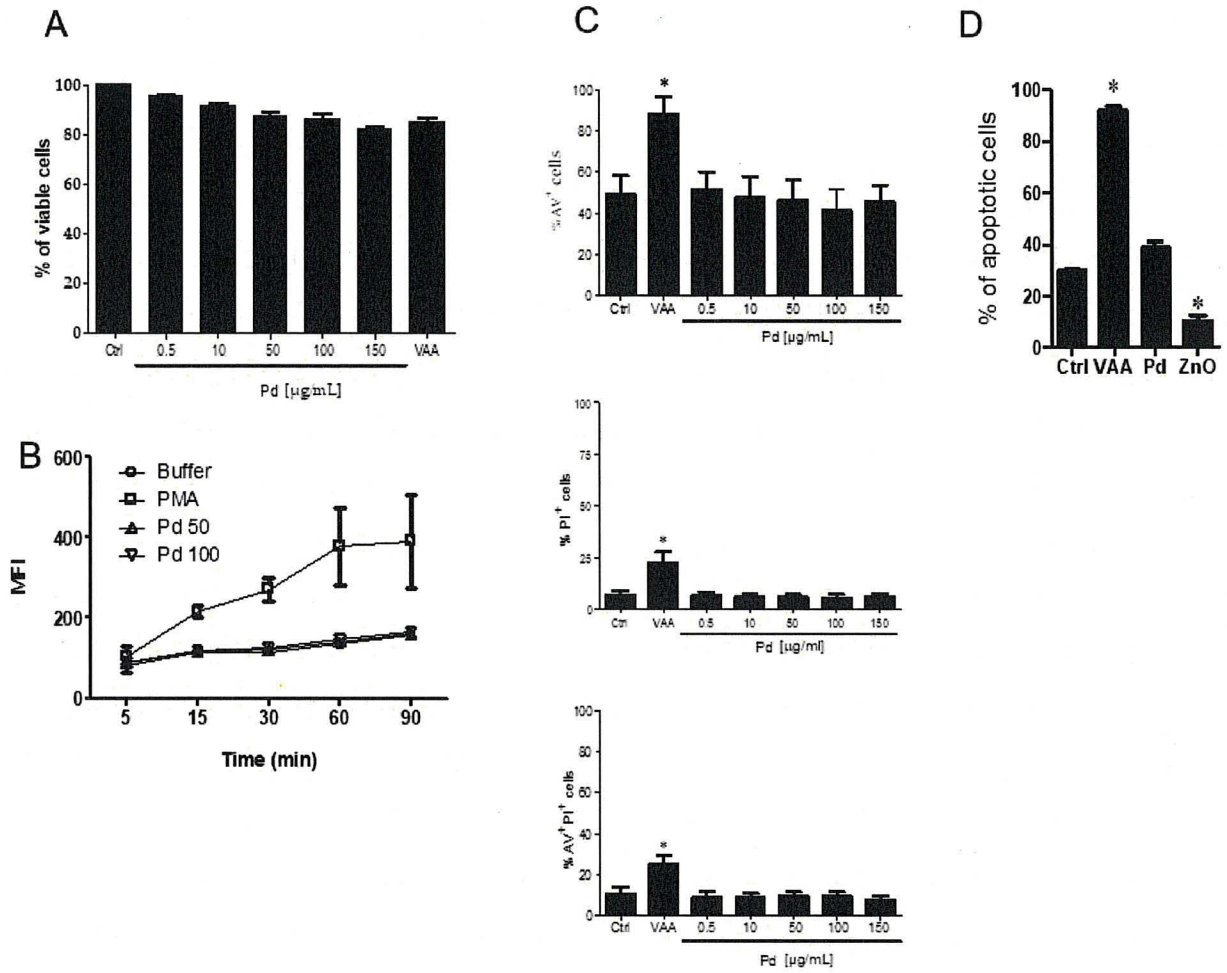


Figure 5. Pd NPs are not cytotoxic and do not induce ROS production or apoptosis in human eosinophils.

Freshly isolated human eosinophils were treated with buffer (Ctrl) or the indicated agonists and cell viability (A), ROS production (B), apoptosis/necrosis (C) and apoptosis (D) were determined as described in materials and methods. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$).

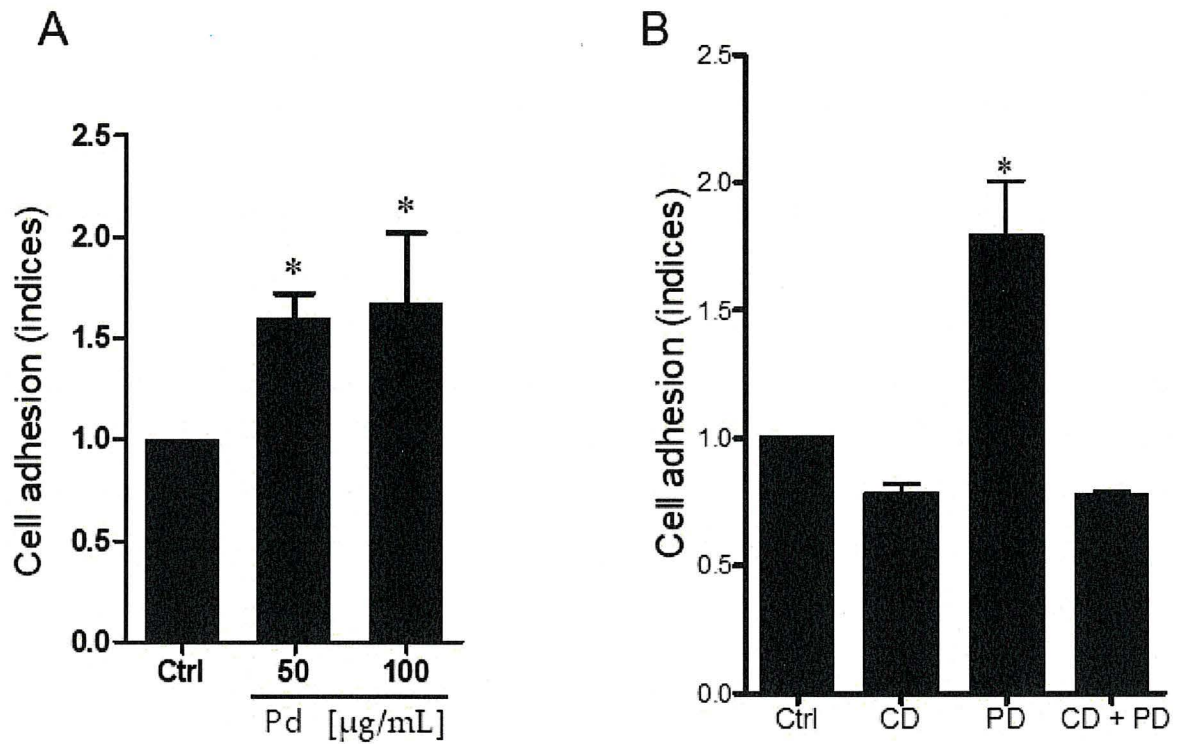


Figure 6. Pd NPs increase the eosinophil adhesion by an actin-dependent mechanism.

Freshly isolated human eosinophils were incubated with buffer (Ctrl) or Pd NPs for 30 min (A) or pre-incubated for 30 min with buffer or CD and then treated for 30 min with equivalent volume of buffer (Ctrl) or Pd NPs (B) and then cell adhesion was determined as described in materials and methods. Results are expressed as indices (means \pm SEM, n=4).

4.2.5 Discussion

The effect of Pd NPs on the biology of eosinophils has been largely neglected. Here, we show that Pd NPs are not cytotoxic at concentrations up to 150 $\mu\text{g/ml}$ in both human 3D10 eosinophilic and primary eosinophil cells *in vitro*. In addition, at these concentrations, Pd NPs did not modulate cell apoptosis. Although the literature regarding cytotoxic effects of NPs in human eosinophils *in vitro* is not well documented, using 3D10 cells for screening purposes to identify NPs modulating cells of eosinophilic origin, we previously reported that among the following NPs, CeO_2 , ZnO, TiO_2 , silver NPs of 20 nm (AgNP_{20}) or AgNP_{70} , only ZnO and AgNP_{20} were found to induce 3D10 cell apoptosis at concentration ranges similar to that used here for Pd NPs (100 $\mu\text{g/ml}$) (Vallieres *et al.*, 2016). All other NPs, have no effect on apoptosis when compared to untreated cells. Paradoxically, we recently demonstrated that ZnO NPs were rather found to delay or suppressed human eosinophil apoptosis (L. R. Silva *et al.*, 2016a). This indicates that, for a given specific NP, namely ZnO, 3D10 cells and eosinophils could respond differently *in vitro*. Although this could not be clearly explained at the moment, we cannot simply refer to the fact that 3D10 cells are dividing cells of cancerous origin as opposed to mature non-dividing eosinophils. Indeed, herein, Pd NPs act similarly in 3D10 cells and eosinophils at least for having no modularity effect on apoptosis. Interestingly, when studying regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils, Kang and collaborators show that serotonin induced rolling of both 3D10 cells and eosinophils on vascular cell adhesion molecule-1 *in vitro* (B. N. Kang *et al.*, 2013). Here, based on the cell viability, cytotoxicity and apoptosis data, it was not surprising that Pd NPs did not induce ROS production in 3D10 and eosinophil cells. In contrast to our results, Pd NPs were reported to be cytotoxic in human skin malignant melanoma A375 cells, even at concentrations lower than 100 $\mu\text{g/ml}$ (Alarifi *et al.*, 2017). Moreover, the authors reported an induction of oxidative stress in A375 cells based on ROS production after treatment with Pd NPs, but after 24 and 48h. Here, we did not measure an accumulation of ROS over such a long period but we rather investigate the respiratory burst that normally, at least in granulocytes like eosinophils, occurred rapidly within few minutes. At least one study reported that Pd, although not at the NP scale, was able to induce ROS production in human neutrophils after only few minutes of treatment (Theron *et al.*, 2004). In our hands, we previously reported that NPs such as ZnO did not induce ROS production in neutrophils, whereas AgNP_{15} did (Goncalves *et al.*, 2014). Since ROS production is frequently associated with granulocyte apoptosis (Fossati *et al.*, 2003, Geering *et al.*, 2011), it was

not surprising here to find that Pd NPs do not modulate apoptosis in 3D10 and eosinophil cells. Even if these observations on NPs-induced ROS production clearly indicate that different types of NPs can act differently, we also demonstrated previously that despite the fact that both AgNP₂₀ and AgNP₇₀ were able to induce ROS production at similar levels in human neutrophils, AgNP₂₀ were found to induce apoptosis whereas AgNP₇₀ delay this biological process (Poirier *et al.*, 2015). This indicates that the mode of action of a given NP is very complex and cannot be generalized even in a particular cell type. Yet, the roles of Pd NPs on the ROS production and apoptosis have not been investigated in human neutrophils.

Although the literature regarding the effect of Pd NPs on cell apoptosis is not abundant, studies indicate that Pd NPs can induce apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells (Yuan *et al.*, 2017), human skin malignant melanoma A375 cells (Alarifi *et al.*, 2017), human MCF-7 breast cancer and cervical adenocarcinoma HeLa cells (X. F. Zhang *et al.*, 2016) and human ovarian cancer A2780 cells (Gurunathan *et al.*, 2015). It is interesting to note that all these studies were performed with cancerous cell lines. However, at least one study reported that inhibition of cell growth was not associated with the induction of apoptosis in normal diploid rat fibroblasts and lung carcinoma human epithelial cell lines (Iavicoli *et al.*, 2017). Therefore, even if we also performed experiments regarding the role of Pd NPs on cancerous 3D10 eosinophilic cells in this study, our experiments conducted in parallel with mature human non-dividing eosinophils are, to the best of our knowledge, the firsts reported in the literature. In fact, the role of Pd NPs on the biology of primary human immune cells has not been the object of intense studies. Nevertheless, using peripheral blood mononuclear cells from Pd-sensitized women, one study reported that in lipopolysaccharide-stimulated cells, Pd NPs were found to enhance the production of interferon- γ and decrease tumor necrosis-alpha cytokine production (Reale *et al.*, 2011). Herein, we did not study the effect of Pd NPs on the cytokine production in 3D10 or eosinophil cells. However, we previously reported that among CeO₂, ZnO, TiO₂, AgNP₂₀ or AgNP₇₀ only ZnO and AgNP₂₀ were found to increase the production of different chemokines and cytokines, including the potent pro-inflammatory CXCL8 (IL-8) chemokine (Vallieres *et al.*, 2016). In human eosinophils, only one study reported that ZnO NPs can increase the production of IL- β and IL-8 cytokines (L. R. Silva *et al.*, 2016a). It will be of interest in future to determine whether or not Pd NPs could induce cytokine production in human eosinophils and, if so, to identify which ones.

Although the mode of action of NPs is still unclear, the cytoskeleton appears to be an important target to NPs-induced granulocytes. Indeed, we (Babin *et al.*, 2013, Noel *et al.*, 2016, Vallieres *et al.*, 2016) and others (Abrikossova *et al.*, 2012) reported that NPs can alter the F-actin cytoskeleton leading to changes in cell shape or induce cytoskeleton breakdown as evidence by the degradation of several cytoskeletal proteins during NPs-induced granulocyte apoptosis. Here, Pd NPs were also found to alter the actin cytoskeleton in granulocytes, although differently than the positive control eotaxin (**Fig. 3**), agreeing with the above observations. As previously specified, the role of NPs on the biology of human eosinophils has not been the object of intense studies. However, in a recent study focusing on the mechanisms involved in TiO₂-induced adhesion of eosinophils, we reported that other NPs were also able to increase adhesion, including Pd NPs, although to a lesser extent (M. Murphy-Marion *et al.*, 2017). In addition, we demonstrate in this study that Pd NPs increase adhesion not only of primary eosinophils but also 3D10 eosinophilic cells onto endothelial cells, a cellular process in which actin is known to exert crucial roles (Bengtsson *et al.*, 1993, B. N. Kang *et al.*, 2013, Q. Wang *et al.*, 2001). Therefore, our results using CD to inhibit actin polymerization are in agreement with the importance of the actin cytoskeleton in Pd NPs-induced adhesion.

4.2.6 Conclusion

On the basis of these findings, it can be concluded that Pd NPs could interfere with the inflammatory process at least by increasing eosinophil adhesion onto endothelial cells at concentrations that are not cytotoxic and that do not induce cell apoptosis. We believe that these initial findings regarding the direct effects of Pd NPs on the biology of human eosinophils are encouraging to initiate other studies aiming at better understanding the cellular and molecular mechanisms involved in Pd NPs-induced allergies and inflammation. Increasing our knowledge in this area will be useful to better define the risk assessment and human health.

4.2.7 Acknowledgment

The study was partially supported by grants from the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4.2.8. References

- Abrikossova, N.; Skoglund, C.; Ahren, M.; Bengtsson, T.; Uvdal, K. Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology* 2012;23:0957-4484
- Alarifi, S.; Ali, D.; Alkahtani, S.; Almeer, R.S. ROS-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Palladium Nanoparticles in Human Skin Malignant Melanoma Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017;2017:8439098
- Armstrong, J.S.; Steinauer, K.K.; Hornung, B.; Irish, J.M.; Lecane, P.; Birrell, G.W.; Peehl, D.M.; Knox, S.J. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 2002;9:252-263
- Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;236:310-318
- Arora, S.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;258:151-165
- Babin, K.; Antoine, F.; Goncalves, D.M.; Girard, D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett* 2013;221:57-63
- Baumann, M.A.; Paul, C.C. The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 1998;16:16-24
- Bengtsson, T.; Jaconi, M.E.; Gustafson, M.; Magnusson, K.E.; Theler, J.M.; Lew, D.P.; Stendahl, O. Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur J Cell Biol* 1993;62:49-58
- Boscolo, P.; Bellante, V.; Leopold, K.; Maier, M.; Di Giampaolo, L.; Antonucci, A.; Iavicoli, I.; Tobia, L.; Paoletti, A.; Montalti, M.; Petrarca, C.; Qiao, N.; Sabbioni, E.; Di Gioacchino, M. Effects of palladium nanoparticles on the cytokine release from peripheral blood mononuclear cells of non-atopic women. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2010;24:207-214
- Brandenberger, C.; Rowley, N.L.; Jackson-Humbles, D.N.; Zhang, Q.; Bramble, L.A.; Lewandowski, R.P.; Wagner, J.G.; Chen, W.; Kaplan, B.L.; Kaminski, N.E.; Baker, G.L.; Worden, R.M.; Harkema, J.R. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:26
- Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A.M. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Trends in biotechnology* 2010;28:580-588
- Cho, W.S.; Duffin, R.; Poland, C.A.; Howie, S.E.; MacNee, W.; Bradley, M.; Megson, I.L.; Donaldson, K. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 2010;118:1699-1706

- Daenen, M.; Rogiers, P.; Van de Walle, C.; Rochette, F.; Demedts, M.; Nemery, B. Occupational asthma caused by palladium. *Eur Respir J* 1999;13:213-216
- Dahal, E.; Curtiss, J.; Subedi, D.; Chen, G.; Houston, J.P.; Smirnov, S. Evaluation of the catalytic activity and cytotoxicity of palladium nanocubes: the role of oxygen. *ACS applied materials & interfaces* 2015;7:9364-9371
- Fontana, L.; Leso, V.; Marinaccio, A.; Cenacchi, G.; Papa, V.; Leopold, K.; Schindl, R.; Bocca, B.; Alimonti, A.; Iavicoli, I. The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats. *Nanotoxicology* 2015;9:843-851
- Fossati, G.; Moulding, D.A.; Spiller, D.G.; Moots, R.J.; White, M.R.; Edwards, S.W. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol* 2003;170:1964-1972
- Geering, B.; Simon, H.U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 2011;18:1457-1469
- Goncalves, D.M.; Chiasson, S.; Girard, D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1002-1008
- Goncalves, D.M.; Girard, D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicol In Vitro* 2014;28:926-931
- Gurunathan, S.; Kim, E.; Han, J.W.; Park, J.H.; Kim, J.H. Green Chemistry Approach for Synthesis of Effective Anticancer Palladium Nanoparticles. *Molecules* 2015;20:22476-22498
- Iavicoli, I.; Farina, M.; Fontana, L.; Lucchetti, D.; Leso, V.; Fanali, C.; Cufino, V.; Boninsegna, A.; Leopold, K.; Schindl, R.; Brucker, D.; Sgambato, A. In vitro evaluation of the potential toxic effects of palladium nanoparticles on fibroblasts and lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2017;42:191-199
- Iavicoli, I.; Fontana, L.; Corbi, M.; Leso, V.; Marinaccio, A.; Leopold, K.; Schindl, R.; Sgambato, A. Exposure to Palladium Nanoparticles Affects Serum Levels of Cytokines in Female Wistar Rats. *PLoS One* 2015;10:e0143801
- Iguchi, N.; Takeda, Y.; Sato, N.; Ukichi, K.; Katakura, A.; Ueda, K.; Narushima, T.; Higuchi, S.; Ogasawara, K. The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy. *Int Immunopharmacol* 2016;35:70-76
- Kang, B.N.; Ha, S.G.; Bahaie, N.S.; Hosseinkhani, M.R.; Ge, X.N.; Blumenthal, M.N.; Rao, S.P.; Sriramarao, P. Regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils. *PLoS One* 2013;8:e54840
- Kobayashi, H.; Kumagai, K.; Eguchi, T.; Shigematsu, H.; Kitaura, K.; Kawano, M.; Horikawa, T.; Suzuki, S.; Matsutani, T.; Ogasawara, K.; Hamada, Y.; Suzuki, R. Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy. *PLoS One* 2013;8:e76385
- Kurtz-Chalot, A.; Villiers, C.; Pourchez, J.; Boudard, D.; Martini, M.; Marche, P.N.; Cottier, M.; Forest, V. Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 2017;75:16-24
- Larsen, S.T.; Roursgaard, M.; Jensen, K.A.; Nielsen, G.D. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106:114-117

- Lavastre, V.; Chiasson, S.; Cavalli, H.; Girard, D. Viscum album agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol* 2005;130:527-535
- Murphy-Marion, M.; Girard, D. Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway. *Immunobiology* 2017;
- Namvar, F.; Rahman, H.S.; Mohamad, R.; Baharara, J.; Mahdavi, M.; Amini, E.; Chartrand, M.S.; Yeap, S.K. Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. *Int J Nanomedicine* 2014;9:2479-2488
- Neubauer, N.; Palomaeki, J.; Karisola, P.; Alenius, H.; Kasper, G. Size-dependent ROS production by palladium and nickel nanoparticles in cellular and acellular environments - An indication for the catalytic nature of their interactions. *Nanotoxicology* 2015;9:1059-1066
- Noel, C.; Simard, J.C.; Girard, D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro* 2016;31:12-22
- Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823-839
- Pelletier, M.; Girard, D. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* 2005;141:315-325
- Poirier, M.; Simard, J.C.; Antoine, F.; Girard, D. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J Appl Toxicol* 2014;34:404-412
- Poirier, M.; Simard, J.C.; Girard, D. Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol* 2015:1-11
- Rauch, S.; Morrison, G.M.; Moldovan, M. Scanning laser ablation-ICP-MS tracking of platinum group elements in urban particles. *Sci Total Environ* 2002;286:243-251
- Ravindra, K.; Bencs, L.; Van Grieken, R. Platinum group elements in the environment and their health risk. *Sci Total Environ* 2004;318:1-43
- Reale, M.; Vianale, G.; Lotti, L.V.; Mariani-Costantini, R.; Perconti, S.; Cristaudo, A.; Leopold, K.; Antonucci, A.; Di Giampaolo, L.; Iavicoli, I.; Di Gioacchino, M.; Boscolo, P. Effects of palladium nanoparticles on the cytokine release from peripheral blood mononuclear cells of palladium-sensitized women. *Journal of occupational and environmental medicine* 2011;53:1054-1060
- Rosas-Hernandez, H.; Jimenez-Badillo, S.; Martinez-Cuevas, P.P.; Gracia-Espino, E.; Terrones, H.; Terrones, M.; Hussain, S.M.; Ali, S.F.; Gonzalez, C. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 2009;191:305-313
- Roy, R.; Kumar, S.; Verma, A.K.; Sharma, A.; Chaudhari, B.P.; Tripathi, A.; Das, M.; Dwivedi, P.D. Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a Th2 response in Balb/c mice. *Int Immunol* 2013;13:13
- Schmid, M.; Zimmermann, S.; Krug, H.F.; Sures, B. Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environment international* 2007;33:385-390

- Sevier, C.S.; Cuzzo, J.W.; Vala, A.; Aslund, F.; Kaiser, C.A. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol* 2001;3:874-882
- Silva, L.R.; Girard, D. Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and IL-8. *Toxicol Lett* 2016;259:11-20
- Simard, J.C.; Simon, M.M.; Tessier, P.A.; Girard, D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 2011;186:3622-3631
- Theron, A.J.; Ramafi, G.J.; Feldman, C.; Grimmer, H.; Visser, S.S.; Anderson, R. Effects of platinum and palladium ions on the production and reactivity of neutrophil-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1408-1417
- Vallieres, F.; Simard, J.C.; Noel, C.; Murphy-Marion, M.; Lavastre, V.; Girard, D. Activation of human AML14.3D10 eosinophils by nanoparticles: Modulatory activity on apoptosis and cytokine production. *J Immunotoxicol* 2016;13:817-826
- Wang, Q.; Chiang, E.T.; Lim, M.; Lai, J.; Rogers, R.; Janmey, P.A.; Shepro, D.; Doerschuk, C.M. Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. *Blood* 2001;97:660-668
- Wilkinson, K.E.; Palmberg, L.; Witasp, E.; Kupczyk, M.; Feliu, N.; Gerde, P.; Seisenbaeva, G.A.; Fadeel, B.; Dahlen, S.E.; Kessler, V.G. Solution-engineered palladium nanoparticles: model for health effect studies of automotive particulate pollution. *ACS Nano* 2011;5:5312-5324
- Yoshida, S.; Sakamoto, H.; Mikami, H.; Onuma, K.; Shoji, T.; Nakagawa, H.; Hasegawa, H.; Amayasu, H. Palladium allergy exacerbating bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1211-1212
- Yuan, Y.G.; Peng, Q.L.; Gurunathan, S. Combination of palladium nanoparticles and tubastatin-A potentiates apoptosis in human breast cancer cells: a novel therapeutic approach for cancer. *Int J Nanomedicine* 2017;12:6503-6520
- Zhang, X.F.; Yan, Q.; Shen, W.; Gurunathan, S. Trichostatin A Enhances the Apoptotic Potential of Palladium Nanoparticles in Human Cervical Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 2016;17

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Le projet de ce présent mémoire avait comme objectif de déterminer les effets des NP de Pd chez les éosinophiles humains et leurs modèles cellulaires AML14.3D10. Les résultats obtenus permettent donc de confirmer l'hypothèse de départ. Les NP de Pd altèrent plusieurs fonctions cellulaires chez les éosinophiles et les AML14.3D10. Plus spécifiquement, il était question de cibler les différentes réponses cellulaires qui pouvaient être altérées par la présence de ces NP, soit le réarrangement du cytosquelette, l'adhésion et la production de ROS. À la lumière des résultats obtenus, il a été démontré que les NP de Pd n'étaient pas cytotoxiques ni pour les éosinophiles humains, ni pour les 3D10 aux concentrations utilisées allant jusqu'à 150 µg/mL. Ceci dit, nous nous sommes penchés sur des concentrations exagérées de l'exposition réelle et, même si ces concentrations se chiffrent bien au-dessus de ce qui a été documenté, la viabilité cellulaire n'était pas en péril. De plus, étant donné que les expériences ont été effectuées *in vitro* et considérant la durée de vie limitée des éosinophiles humains, les résultats obtenus sont réfractaires d'une incubation en deçà de 24h. Bien entendu, en modifiant ces deux paramètres, les effets à long terme couplés à des concentrations différentes peuvent altérer la viabilité cellulaire.

Nous avons également montré que ces NP ne modulent pas l'apoptose chez ces deux types cellulaires. L'intérêt d'investiguer la cytotoxicité de ces NP repose sur les cas préalablement répertoriés au sein de notre laboratoire. En effet, parmi la variété de NP, certaines ont la capacité d'induire l'apoptose chez les 3D10, notamment les NP d'argent de 20 nm et de ZnO. Cependant, l'effet engendré varie d'un même type cellulaire à un autre. Par exemple, en prenant les NP de ZnO en référence, cet agoniste induit l'apoptose de façon inquiétante auprès des macrophages, des cellules ovariennes cancéreuses (SKOV3), des cellules adénocarcinomes pulmonaires humains (LTEP-a-2), des hépatocytes carcinome (HepG2) et des cellules cancéreuses de glandes mammaires (MCF-7) (Bae *et al.*, 2011, Bai *et al.*, 2017, Wahab *et al.*, 2014, Caixia Wang *et al.*, 2015, Wilhelmi *et al.*, 2013). En revanche, elles induisent le phénomène paradoxal qui se traduit par un retard de l'apoptose spontanée chez les neutrophiles de même que chez les éosinophiles humains (Goncalves *et al.*, 2014, L. R. Silva *et al.*, 2016a). De ce fait, l'investigation à l'ordre d'une lignée cellulaire a été pertinente et, étant donné qu'il s'agit d'un sujet encore en plein développement, l'utilisation des 3D10 permet de cribler, sans pour autant être chronophage, les effets avant-gardistes de certaines NP sur les éosinophiles humains. En addition, les résultats

obtenus augurent une avenue promettante pour des modèles d'études en nano-immunobiologie. Bien que les NP de Pd ne causaient pas de cytotoxicité, ceci consiste en une perspective engageante. En effet, l'équipe de Miller et collaborateurs ont démontré le potentiel antitumoral des NP de Pd (II) lorsque celles-ci étaient associées à une drogue chimio thérapeutique, l'alloxandorubicin (DOX). L'administration systémique dans un modèle murin de ce complexe résulte en une accumulation au sein de la tumeur couplée à une atteinte à l'ADN des cellules tumorales, une toxicité atténuée auprès du cœur et de la moelle osseuse comparativement à la formulation standard de doxorubicine, ce qui suggère une avenue promettante de l'exploitation des NP de Pd (Miller *et al.*, 2017).

De concert avec les comportements variés auprès de plusieurs lignées et types cellulaires, les caractéristiques mêmes de la nanoparticule peuvent être nuancées selon milieu dans laquelle ces agonistes se trouvent. Étant donné que l'architecture des NP varie selon la fabrication et l'origine conceptuelle, le comportement des NP de Pd se doit d'être caractérisé au préalable de la conception du modèle d'étude. En effet, il est connu que le pH, les particules présents au sein du milieu, la température, la forme des NP et même le temps consistent en des facteurs qui peuvent influencer le comportement des NP résultant en un agoniste qui, malgré les précautions, peut agir de façon complètement inopinée (Avramescu *et al.*, 2017). Dû à ce scepticisme, il est inévitable de caractériser les NP de Pd en amont des expériences. Selon le manufacturier, la taille des NP se chiffre entre 1 et 10 nm, mais la caractérisation dans notre laboratoire par le DLS en conclut autrement. Cependant, il est à noter que la caractérisation du manufacturier a été effectuée par microscope électronique en transmission. Ainsi, une caractérisation par microscope électronique en transmission aurait dû être considérée. Néanmoins, les tailles se chiffrent en moyenne dans les diamètres de 120 nm à 450 nm et ce, selon les différents milieux. Les tailles significativement supérieures s'expliquent par la tendance agglomérante des NP de Pd. Tel que mentionné plus tôt, les NP de Pd sont des éboueurs d'hydrogènes et, par le fait même, la présence de ces atomes dans les milieux aqueux peut possiblement polariser ces particules de sorte à favoriser l'assemblage de ceux-ci (Adams *et al.*, 2011). En addition, il est notamment connu que les NP de Pd ont tendance à s'agglomérer même en absence d'agent; c'est pourquoi l'ajout de stabilisateur est fortement suggéré (Martins *et al.*, 2014, Ozkar *et al.*, 2016). À travers la caractérisation, le potentiel zêta a également été évalué. Hormis en présence de sérum, la charge de surface des NP est sensiblement la même, soit entre 19mV et -33, ce qui signifie une stabilité qui se niche entre bien à modérée

selon les standards de Malvern. En présence de protéines biologiques, ces molécules s'agencent de manière à former une gaine autour des NP : une corona protéique. Cette corona modifie et contrôle le comportement des NP en altérant non seulement la taille des NP, mais également la charge de celle-ci, conformément à nos résultats obtenus (Sikora *et al.*, 2016). Bien sûr, il serait envisageable d'utiliser des nanoparticules dans une suspension qui permet d'éviter l'agglomération ou encore, de soniquer et de filtrer la suspension de palladium. Cependant, étant donné que les expériences s'œuvrent dans des conditions physiologiques et que l'agglomération est propice dans l'organisme, les résultats suggèrent un comportement qui peut se produire dans la circulation sanguine et dans les tissus.

Les cellules, incluant les granulocytes et les 3D10, misent sur leur cytosquelette pour accomplir une variété de fonctions cellulaires. Tel que mentionné dans l'article, il est connu que différentes NP altèrent le réseau d'actine du cytosquelette des granulocytes humains et ce phénomène est miroité chez les 3D10. Une polymérisation de l'actine s'observe chez les cellules traitées par une augmentation de la fluorescence. En comparaison avec le témoin, les NP de Pd causent une relocalisation du réseau d'actine : les filaments d'actines se localisent au niveau du cortex membranaire, puis se diffusent à travers la cellule en réponse en NP de Pd. Il n'est pas surprenant de constater une altération auprès de cette structure. En effet, comme mentionné dans la section 2.1.5, l'actine forme un cortex à la périphérie chez les cellules non musculaires. Au repos, les microfilaments d'actine se trouvent dans un état d'équilibre avec les monomères d'actines. Dès l'instant où la formation de microfilament est exigée, l'assemblage souligne l'état désormais actif des cellules. D'ailleurs, il est désormais connu que les NP d'argent de 20 nm causent la dégénération du cytosquelette des neurones corticaux et, de façon indirecte, certaines NP causent des effets cytotoxiques en ciblant le cytosquelette au premier abord (Kang *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2013a). De même, les NP organiques sont également capables d'affecter la F-actine et la β -tubuline (Gupta *et al.*, 2004). Ces effets qui menacent l'intégrité cellulaire ont servi comme tremplin pour notre investigation auprès du cytosquelette suivant l'exposition aux NP de Pd. Ainsi, l'augmentation et la relocalisation confirment que ces NP ont la capacité d'activer les 3D10, ce qui supporte davantage l'intérêt de l'article présenté.

Suivant cette révélation, un point culminant de l'article misait sur l'interaction entre les éosinophiles humains et les 3D10 avec les cellules endothéliales. À l'égal des neutrophiles, les éosinophiles et les 3D10 mettent à profit leur capacité d'adhésion lorsqu'elles sont sollicitées au foyer inflammatoire. L'activation des cellules migratoires est mise à profit par l'entremise du réarrangement du cytosquelette et, en accord avec les résultats obtenus, les éosinophiles et les 3D10 montrent une altération de cette structure. Récemment, il a été démontré que les NP de TiO₂ modulaient l'adhésion sur les cellules endothéliales à la hausse et il n'en est pas moins pour les NP de Pd (Murphy-Marion *et al.*, 2018). L'augmentation de cette capacité pourrait se traduire par une éosinophilie malgré que la population cellulaire demeure inchangée, tel qu'observé chez les patients souffrants de drépanocytose (anémie falciforme) (Canalli *et al.*, 2004). L'élucidation du mécanisme par lequel les NP agissent sur cette fonction, quoique nécessaire, peut également être une optique thérapeutique. En effet, suite aux résultats obtenus par Murphy et Girard, l'adhésion des éosinophiles influencée par les NP de TiO₂ s'opère selon la voie PI3K/Akt, une voie qui a été déterminée comme indispensable en utilisant un inhibiteur pharmacologique (Murphy-Marion *et al.*, 2018). Dès lors, tout comme les NP de TiO₂, l'adhésion cellulaire modulée par les NP de Pd fait nécessairement appel à une voie signalétique qui demeure indéterminée. De cette lacune pourrait héberger une solution à l'étendue importante des pathologies qui se manifestent au sein des voies respiratoires, tel que mentionné dans l'introduction. Hormis les voies signalétiques à la hausse, une augmentation des molécules d'adhésion à la surface des éosinophiles pourrait expliquer l'amplification de phénomène de recrutement. Vis-à-vis cette expression à la hausse, il a été établi que la présence d'autoanticorps dirigés contre certaines protéines d'adhésion pourrait être à la l'origine de plusieurs pathologies inflammatoires chroniques (Kim *et al.*, 2003, Nagao *et al.*, 2007, Nedelec *et al.*, 1990). La découverte du mécanisme d'action par lequel s'effectue l'adhésion s'avère donc utile pour établir un plan d'action afin de contrer le recrutement éosinophilique.

De façon complémentaire à l'adhésion cellulaire, la production de ROS consiste en un arsenal qui est fortement exploité par les granulocytes. Il a été démontré que les métaux nobles, tels que le Pd et la Pt ne provoquent pas nécessairement la production de ROS, mais agiraient plutôt sur la formation des formes pro-oxydatives en catalysant les réactions oxygènes dépendants (Theron *et al.*, 2004). Malgré que ces auteurs aient décelé une production cohérente de ROS chez les neutrophiles, il n'est pas surprenant que les éosinophiles et les 3D10 agissent différemment. Il est pertinent de rappeler que les NP se comportent différemment selon le milieu dans laquelle elles hébergent et, contrairement aux neutrophiles, les éosinophiles possèdent une acidité supérieure, ce qui peut influencer la disponibilité ionique des NP de Pd. Par conséquent, ceci pourrait moduler la production de ROS et atténuer l'étendue des effets des NP de Pd à cet égard. De surcroît, à raison des résultats obtenus pour la viabilité, la cytotoxicité et l'apoptose, il n'est pas surprenant de constater aucune production significative de ROS chez les éosinophiles et les 3D10. Normalement, la production de ROS est notamment associée à la mort cellulaire et vu que les résultats obtenus ne suggèrent pas de cytotoxicité, il était attendu que les NP de Pd n'affectent pas cette fonction cellulaire. Plusieurs travaux ont répertorié différents mécanismes par lesquels les NP peuvent produire des ROS. Par exemple, les NP d'argents de 20 et 70 nm induisent la production de ROS chez les neutrophiles, mais en dépit de cette conclusion, seules les NP d'Ag20 provoquent l'apoptose (Poirier *et al.*, 2016). L'une des raisons qui explique cette divergence consiste à la cible des organelles. En ce sens, dans le cas du ZnO, les ROS causent une diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie tout en augmentant le ratio des protéines mitochondriales Bax/Bcl2, ce qui mène à la voie apoptotique médiée par la mitochondrie. De concert, il a été rapporté que la quantité de ROS produits corrèle avec plusieurs caractéristiques de la NP, telles que la taille, la forme, la surface et la chimie (Dayem *et al.*, 2017). Étant donné les différences quant à la taille et au potentiel zêta de chacune des NP, il est concevable que les effets répertoriés puissent être mitigés. Tout compte fait, ces résultats divergents illustrent la complexité de notre étude et, advenant qu'une NP provoque la production de ROS, il est probable que les mécanismes d'action par lesquels agissent ces agents demeurent lacunaires laissant place à une avenue qui demeure encore indéfinissable pour le moment.

Dans le présent projet, plusieurs fonctions fondamentales n'ont pas été évaluées auprès des éosinophiles et de son modèle cellulaire. En particulier, l'une des fonctions immunomodulatrices des éosinophiles consiste en la dégranulation. Tel que mentionné au préalable, soit dans la section 2.1.3.1, les éosinophiles ont recouru à différents moyens pour libérer un panorama de protéines cytotoxiques. D'ailleurs, il a été démontré que les NP d'Ag de 5 nm et de 20 nm provoquent une libération redoutable des granules dérivées des mastocytes et des basophiles humains contribuant possiblement aux réponses allergiques (Johnson *et al.*, 2017). Dans les mêmes eaux de l'article, Babin et collaborateurs ont su mettre à profit le criblage des effets des NP sur les neutrophiles humains afin de faire briller la dégranulation à la hausse suivant l'exposition aux NP de TiO₂, de CeO₂ et de ZnO (Babin *et al.*, 2013). Or, suivant l'activation des éosinophiles et des 3D10, advenant que la dégranulation soit modulée à la hausse par les NP utilisées dans l'article présenté pour ce mémoire, ce phénomène serait complémentaire à l'augmentation d'adhésion des éosinophiles au sein des voies respiratoires. Par contre, étant donné que la production de ROS totaux mesurée n'était pas significativement plus élevée que les témoins et sachant que les ROS peuvent également être libérés durant la dégranulation, il aurait été normal que la dégranulation soit également similaire au témoin négatif. Il en demeure que ceci reste à être déterminé.

Bien que la portée de l'article suscite un intérêt considérable pour la recherche en nano-immunobiologie, il aurait été tout de même pertinent d'évaluer la production et la libération de cytokines. Comme mentionné plus tôt dans le tableau I de ce mémoire, les éosinophiles sont reconnus pour libérer une variété importante de médiateurs pro-inflammatoires. Or, en complément avec les fonctions qui sont modifiées à la hausse, une libération exagérée pourrait contribuer à l'établissement d'un état inflammatoire important suivant l'exposition aux NP de Pd dans les voies respiratoires. Ainsi, la pertinence d'évaluer cette fonction sécrétrice est loin d'être négligée. Il est connu que certaines NP provoquent, en parallèle l'activation des cellules, la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du ZnO. Suivant l'incubation avec ces NP, les éosinophiles humains sécrètent les cytokines IL-8 et IL-1 β (Luis Rafael Silva *et al.*, 2016b). De concert, le modèle cellulaire exploité dans le cours de ce projet peut également être influencé par la présence de NP, notamment les NP de ZnO et Ag 20 nm, et, suite à l'activation, il a notamment été démontré que ces deux NP induisent la libération d'IL-8, de RANTES, de MIP-1 α , de MIP-1 β , et d'IP-10. Ces épisodes de libération accrue s'observent également en présence de NP de Pd chez d'autres cellules immunitaires. En effet,

certain auteurs ont démontré que la présence de NP de Pd provoque la libération d'IL-2 et d'IL-4 chez les cellules mononuclées sanguines périphériques, des cytokines d'origine cellulaire Th1 et Th2 suggérant une réponse allergique à ces métaux qui s'échafaude (Minang *et al.*, 2006). De plus, cette libération de ces mêmes cytokines a été rapportée suivant une injection sous-cutanée dans un modèle murin tout en favorisant une réponse Th2 (Iavicoli *et al.*, 2006).

En conclusion, à travers ce projet de maîtrise, les résultats obtenus sont d'une grande portée en nanotoxicologie. Il a notamment été souligné que ces agonistes métalliques ciblent directement les éosinophiles humains ainsi que les 3D10. Malgré cette plateforme qui suggère la possibilité des NP de Pd à provoquer une réponse inflammatoire, il en demeure que plusieurs autres fonctions demeurent indéterminées chez les cellules immunitaires. Étant donné que les résultats obtenus consistent en des avancées pionnières en nano-immunobiologie, il était inconcevable d'évaluer la totalité des fonctions cellulaires. Par conséquent, nous avons ciblé les plus importantes pour les besoins de notre étude et les résultats escomptés permettent d'évaluer le mode d'action des NP qui, malgré leur utilisation en plein essor, reste nébuleux. Il aurait également été pertinent de valider les effets obtenus au sein des neutrophiles et leurs modèles cellulaires PLB985. Malgré que la voie d'exposition primaire aux NP de Pd consiste en l'inhalation, il se doit d'être mentionné que les neutrophiles composent jusqu'à 70% de la population des cellules en circulation périphérique. Dès lors, il est concevable qu'une altération de la physiologie de ces granulocytes puisse engendrer un panorama de complication immunitaire inquiétante. Bien que les tests *in vitro* permettent de caractériser et de cataloguer les effets des NP de Pd sur la physiologie des granulocytes, une avenue à considérer serait d'évaluer le dénouement qui se produit dans un modèle d'asthme *in vivo* utilisé. En ce sens, les constats suivant l'inhalation permettraient d'avoir une perspective plus approfondie de la toxicité factuelle d'une NP de Pd volatile. Nonobstant, les NP agissent de manière dissemblable qui, somme toute, affirme la complexité des études en nanotoxicologie. C'est pourquoi les résultats obtenus au courant de ce projet sont d'une contribution qui est loin d'être marginal pour l'aménagement d'une plateforme commerciale de NP de Pd dont les conséquences seront moins transparentes.

Références

- Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang G-M, Choi HY & Cho S-G (2017) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 18(1):120.
- Abrikosova N, Skoglund C, Ahren M, Bengtsson T & Uvdal K (2012) Effects of gadolinium oxide nanoparticles on the oxidative burst from human neutrophil granulocytes. *Nanotechnology* 23(27):0957-4484.
- Aceves SS & Broide DH (2008) Airway fibrosis and angiogenesis due to eosinophil trafficking in chronic asthma. *Current molecular medicine* 8(5):350-358.
- Acharya KR & Ackerman SJ (2014) Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. *The Journal of Biological Chemistry* 289(25):17406-17415.
- Adams BD & Chen A (2011) The role of palladium in a hydrogen economy. *Materials Today* 14(6):282-289.
- Agostini G, Piovano A, Bertinetti L, Pellegrini R, Leofanti G, Groppo E & Lamberti C (2014) Effect of Different Face Centered Cubic Nanoparticle Distributions on Particle Size and Surface Area Determination: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry C* 118(8):4085-4094.
- Akuthota P, Wang H & Weller PF (2010) Eosinophils as Antigen-Presenting Cells in Allergic Upper Airway Disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 10(1):14-19.
- Akuthota P & Weller PF (2015) Spectrum of Eosinophilic End-Organ Manifestations. *Immunology and allergy clinics of North America* 35(3):403-411.
- Ala A, Dhillon AP & Hodgson HJ (2003) Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *International Journal of Experimental Pathology* 84(1):1-16.
- Alarifi S, Ali D, Alkahtani S & Almeer RS (2017) ROS-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Palladium Nanoparticles in Human Skin Malignant Melanoma Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017:8439098.
- Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Shi X, Vallyathan V, Castranova V & Flynn DC (2009) Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol* 6:1.
- Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, Peehl DM & Knox SJ (2002) Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 9(3):252-263.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM & Paknikar KM (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 236(3):310-318.
- Arora S, Rajwade JM & Paknikar KM (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharmacol* 258(2):151-165.
- Avramescu ML, Rasmussen PE, Chénier M & Gardner HD (2017) Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environmental Science and Pollution Research* 24(2):1553-1564.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicology letters* 221(1):57-63.

- Bae HC, Ryu HJ, Jeong SH, Lee EY, Park Y-H, Lee KG, Choi BH, Maeng EH, Kim M-K & Son SW (2011) Oxidative stress and apoptosis induced by ZnO nanoparticles in HaCaT cells. *Molecular & Cellular Toxicology* 7(4):333-337.
- Bai DP, Zhang XF, Zhang GL, Huang YF & Gurunathan S (2017) Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *Int J Nanomedicine* 12:6521-6535.
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW & Weller PF (2002) IL-16 Promotes Leukotriene C₄ and IL-4 Release from Human Eosinophils via CD4- and Autocrine CCR3-Chemokine-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology* 168(9):4756.
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ & Weller PF (2001) Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166(8):4813-4817.
- Barnes PJ (2001) Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respiratory Research* 2(2):64-65.
- Batcke F, Leopold K, Maier M, Schmidhalter U & Schuster M (2008) Palladium exposure of barley: uptake and effects. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 10(2):272-276.
- Baumann MA & Paul CC (1998) The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 16(1):16-24.
- Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M & Cassatella MA (2010) Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *European journal of immunology* 40(9):2360-2368.
- Bengtsson T, Jaconi ME, Gustafson M, Magnusson KE, Theler JM, Lew DP & Stendahl O (1993) Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur J Cell Biol* 62(1):49-58.
- Bettigole SE, Lis R, Adoro S, Lee A-H, Spencer LA, Weller PF & Glimcher LH (2015) The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nature Immunology* 16:829.
- Bevilacqua MP & Nelson RM (1993) Selectins. *The Journal of clinical investigation* 91(2):379-387.
- Bjornsdottir H, Welin A, Michaelsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, Sundqvist M, Dahlgren C, Karlsson A & Bylund J (2015) Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 89:1024-1035.
- Bloemendal H & Pieper FR (1989) Intermediate filaments: known structure, unknown function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1007(3):245-253.
- Blumenreich MS (1990) The White Blood Cell and Differential Count. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, Rd, Walker HK, Hall WD & Hurst JW (Édit.) Butterworths
- Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing., Boston.
- Bonifacino JS & Lippincott-Schwartz J (2003) Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(5):409-414.
- Bonness S & Bieber T (2007) Molecular basis of atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 7(5):382-386.
- Boscolo P, Bellante V, Leopold K, Maier M, Di Giampaolo L, Antonucci A, Iavicoli I, Tobia L, Paoletti A, Montalti M, Petrarca C, Qiao N, Sabbioni E & Di Gioacchino M (2010) Effects of palladium nanoparticles on the cytokine release from peripheral blood mononuclear cells

- of non-atopic women. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 24(2):207-214.
- Boyce JA, Friend D, Matsumoto R, Austen KF & Owen WF (1995) Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med* 182(1):49-57.
- Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, Zhang Q, Bramble LA, Lewandowski RP, Wagner JG, Chen W, Kaplan BL, Kaminski NE, Baker GL, Worden RM & Harkema JR (2013) Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol* 10(1):26.
- Braun RK, Franchini M, Erard F, Rihs S, De Vries IJ, Blaser K, Hansel TT & Walker C (1993) Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *European journal of immunology* 23(4):956-960.
- Broggi A & Granucci F (2015) Microbe- and danger-induced inflammation. *Molecular immunology* 63(2):127-133.
- Bystrom J, Garcia RC, Hakansson L, Karawajczyk M, Moberg L, Soukka J & Venge P (2002) Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32(7):1082-1091.
- Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST & Costa FF (2004) Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Experimental hematology* 32(8):728-734.
- Chaloupka K, Malam Y & Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in biotechnology* 28(11):580-588.
- Chan AC & Shaw AS (1996) Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Current Opinion in Immunology* 8(3):394-401.
- Chaplin DD (2010) Overview of the Immune Response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2):S3-23.
- Chen H, Wei G, Ispas A, Hickey SG & Eychmüller A (2010) Synthesis of Palladium Nanoparticles and Their Applications for Surface-Enhanced Raman Scattering and Electrocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry C* 114(50):21976-21981.
- Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Bradley M, Megson IL & Donaldson K (2010) Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect* 118(12):1699-1706.
- Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y & Luster AD (2010) Lipid-Cytokine-Chemokine Cascade Drives Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Inflammatory Arthritis. *Immunity* 33(2):266-278.
- Clutterbuck EJ, Hirst EM & Sanderson CJ (1989) Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73(6):1504-1512.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M & Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17(10):1195-1214.
- Cordeiro JV & Jacinto A (2013) The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(4):249-262.
- Costa JJ, Matossian K, Resnick MB, Beil WJ, Wong DT, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF & Galli SJ (1993) Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha

- and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *The Journal of clinical investigation* 91(6):2673-2684.
- Coulombe PA, Bousquet O, Ma L, Yamada S & Wirtz D (2000) The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends in cell biology* 10(10):420-428.
- Daenen M, Rogiers P, Van de Walle C, Rochette F, Demedts M & Nemery B (1999) Occupational asthma caused by palladium. *Eur Respir J* 13(1):213-216.
- Dahal E, Curtiss J, Subedi D, Chen G, Houston JP & Smirnov S (2015) Evaluation of the catalytic activity and cytotoxicity of palladium nanocubes: the role of oxygen. *ACS applied materials & interfaces* 7(18):9364-9371.
- Davoine F & Lacy P (2014) Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity. *Frontiers in Immunology* 5:570.
- De Jong WH & Borm PJA (2008) Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine* 3(2):133-149.
- de Oliveira S, Rosowski EE & Huttenlocher A (2016) Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol* 16(6):378-391.
- Dean RT, Roberts CR & Jessup W (1985) Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides by free radicals. *Progress in clinical and biological research* 180:341-350.
- Dejana E, Tournier-Lasserre E & Weinstein BM (2009) The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell* 16(2):209-221.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P & Victor VM (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1245049.
- Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA & Rosenberg HF (1998) Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases* 177(6):1458-1464.
- Doyle CB & Ackerman SJ (2009) Lentiviral shRNA knockdown of Charcot-Leyden Crystal Protein/Galectin-10 Expression in Developing Human Eosinophils Impairs Granulogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123(2, Supplement):S270.
- Dubois GR, Bruijnzeel-Koomen CA & Bruijnzeel PL (1994) IL-4 induces chemotaxis of blood eosinophils from atopic dermatitis patients, but not from normal individuals. *The Journal of investigative dermatology* 102(6):843-846.
- Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C & Rossi AG (2010) Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunological reviews* 236:28-40.
- Dunne A & O'Neill LA (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003(171):re3.
- Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA & Gleich GJ (1981) Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(8 I):5165-5169.
- Durack DT, Sumi SM & Klebanoff SJ (1979) Neurotoxicity of human eosinophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(3):1443-1447.
- Dvorak AM (1997) New aspects of mast cell biology. *International archives of allergy and immunology* 114(1):1-9.

- El-Shazly A, Masuyama K, Nakano K, Eura M, Samejima Y & Ishikawa T (1998) Human eotaxin induces eosinophil-derived neurotoxin release from normal human eosinophils. *International archives of allergy and immunology* 117 Suppl 1:55-58.
- Elsner J, Hochstetter R, Kimmig D & Kapp A (1996) Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. *European journal of immunology* 26(8):1919-1925.
- Erjefalt JS, Andersson M, Greiff L, Korsgren M, Gizycki M, Jeffery PK & Persson GA (1998) Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 102(2):286-294.
- Erjefalt JS, Greiff L, Andersson M, Matsson E, Petersen H, Linden M, Ansari T, Jeffery PK & Persson CG (1999) Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. *American journal of respiratory and critical care medicine* 160(1):304-312.
- Ethuin F, Gerard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L & Chollet-Martin S (2004) Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84(10):1363-1371.
- Eum SY, Maghni K, Tolloczko B, Eidelman DH & Martin JG (2005) IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(3):L576-584.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY & Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* 101(4):890-898.
- Filley WV, Holley KE, Kephart GM & Gleich G (1982) *Identification by immunofluorescence of eosinophil granule MBP in lung tissues of patients with bronchial asthma.* 11-16 p
- Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology* 15(2):247-254.
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR & Paul WE (1990) Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8:303-333.
- Fischer E, Capron M, Prin L, Kusnierz JP & Kazatchkine MD (1986) Human eosinophils express CR1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C3. *Cellular immunology* 97(2):297-306.
- 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.
- Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR & Edwards SW (2003) The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J Immunol* 170(4):1964-1972.
- Fredens K, Dahl R & Venge P (1982) The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 70(5):361-366.
- Froeschle JE, Ruben FL & Bloh AM (2002) Immediate hypersensitivity reactions after use of tuberculin skin testing. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34(1):E12-13.

- Fujisawa T, Kato Y, Terada A, Iguchi K & Kamiya H (1999) Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils. *International archives of allergy and immunology* 120 Suppl 1:65-69.
- Fulkerson PC, Schollaert KL, Bouffi C & Rothenberg ME (2014) IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193(8):4043-4052.
- Galli SJ (1993) New concepts about the mast cell. *The New England journal of medicine* 328(4):257-265.
- Galli SJ (2000) Mast cells and basophils. *Current opinion in hematology* 7(1):32-39.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM & Tsai M (2005) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23:749-786.
- Galli SJ, Tsai M & Piliponsky AM (2008) The development of allergic inflammation. *Nature* 454(7203):445-454.
- Geering B & Simon HU (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18(9):1457-1469.
- Georgatos SD & Blobel G (1987) Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *The Journal of cell biology* 105(1):105-115.
- Ghosh S, Nitnavare R, Dewle A, Tomar GB, Chippalkatti R, More P, Kitture R, Kale S, Bellare J & Chopade BA (2015) Novel platinum-palladium bimetallic nanoparticles synthesized by *Dioscorea bulbifera*: anticancer and antioxidant activities. *Int J Nanomedicine* 10:7477-7490.
- Girard D (2015) Focussing on Neutrophils for Evaluating In vitro and In vivo Inflammatory Activities of Nanoparticles. *Nanomaterials - Toxicity and Risk Assessment*, Soloneski S & Larramendy ML (Édit.) InTech, Rijeka 10.5772/60703. p Ch. 03.
- Girard D, Paquet ME, Paquin R & Beaulieu AD (1996) Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 88(8):3176-3184.
- Gleich GJ (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 105(4):651-663.
- Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL & Steinmuller D (1979) Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 123(6):2925-2927.
- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2014) Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28(5):926-931.
- Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, Ruzicka T, Schopf E & Krutmann J (1998) Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161(1):415-420.
- Grivennikov SI, Greten FR & Karin M (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140(6):883-899.

- Gupta AK, Gupta M, Yarwood SJ & Curtis ASG (2004) Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts. *Journal of Controlled Release* 95(2):197-207.
- Gupta S, Ross GD, Good RA & Siegal FP (1976) Surface markers of human eosinophils. *Blood* 48(5):755-763.
- Gurunathan S, Kim E, Han JW, Park JH & Kim JH (2015) Green Chemistry Approach for Synthesis of Effective Anticancer Palladium Nanoparticles. *Molecules (Basel, Switzerland)* 20(12):22476-22498.
- Hafez I, Stolpe A & Lindau M (2003) Compound Exocytosis and Cumulative Fusion in Eosinophils. *Journal of Biological Chemistry* 278(45):44921-44928.
- Håkansson L, Björnsson E, Janson C & Schmekel B (1995) Increased adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 of eosinophils from patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 96(6):941-950.
- Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, Marshall RP, Bradding P, Green RH, Wardlaw AJ & Pavord ID (2009) Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *The New England journal of medicine* 360(10):973-984.
- Hatano Y, Taniuchi S, Masuda M, Tsuji S, Ito T, Hasui M, Kobayashi Y & Kaneko K (2009) Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117(2):115-123.
- Henderson WR, Chi EY & Klebanoff SJ (1980a) Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J Exp Med* 152(2):265-279.
- Henderson WR, Jong EC & Klebanoff SJ (1980b) Binding of eosinophil peroxidase to mast cell granules with retention of peroxidatic activity. *The Journal of Immunology* 124(3):1383.
- Henderson WR, Jorg A & Klebanoff SJ (1982) Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B₄, C₄, and D₄. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 128(6):2609-2613.
- Hernnas J, Sarnstrand B, Lindroth P, Peterson CG, Venge P & Malmstrom A (1992) Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures. *European journal of cell biology* 59(2):352-363.
- Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H & Iwama A (2002) Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med* 195(11):1379-1386.
- Holgate ST (2000) The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30 Suppl 1:28-32.
- Holmgren A (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants & redox signaling* 2(4):811-820.
- Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF & Dahl KN (2010) Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and ex vivo. *ACS Nano* 4(8):4872-4878.
- Honda K & Chihara J (2001) Eosinophil activation by eotaxin – eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* 54(12):1262-1269.
- Hurley JV (1972) *Acute inflammation*. Churchill Livingstone.
<https://books.google.ca/books?id=0ka4AAAAIAAJ>

- Iavicoli I, Carelli G, Marinaccio A, Magrini A, Fontana L, Boscolo P & Bergamaschi A (2006) The effects of sub-acute exposure to palladium on cytokines in male Wistar rats. *International journal of immunopathology and pharmacology* 19(4 Suppl):21-24.
- Iavicoli I, Farina M, Fontana L, Lucchetti D, Leso V, Fanali C, Cufino V, Boninsegna A, Leopold K, Schindl R, Brucker D & Sgambato A (2017) In vitro evaluation of the potential toxic effects of palladium nanoparticles on fibroblasts and lung epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 42:191-199.
- 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.
- Iguchi N, Takeda Y, Sato N, Ukichi K, Katakura A, Ueda K, Narushima T, Higuchi S & Ogasawara K (2016) The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy. *Int Immunopharmacol* 35:70-76.
- Ilmarinen-Salo P, Moilanen E & Kankaanranta H (2010) Nitric oxide induces apoptosis in GM-CSF-treated eosinophils via caspase-6-dependent lamin and DNA fragmentation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 23(4):365-371.
- Izumi S, Hirai K, Miyamasu M, Takahashi Y, Misaki Y, Takaishi T, Morita Y, Matsushima K, Ida N, Nakamura H, Kasahara T & Ito K (1997) Expression and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human eosinophils. *European journal of immunology* 27(4):816-824.
- Jacobsen EA, Ochkur SI, Pero RS, Taranova AG, Protheroe CA, Colbert DC, Lee NA & Lee JJ (2008) Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205(3):699-710.
- Janeway CA, Jr. & Medzhitov R (2002a) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Janeway CA & Medzhitov R (2002b) Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20(1):197-216.
- Janeway CA, Murphy K, Travers P, Masson PL & Walport M (2009) *Immunobiologie*. De Boeck Supérieur. <https://books.google.ca/books?id=19EOxVAmX4gC>
- Janz DR, O'Neal HR, Jr. & Ely EW (2009) Acute eosinophilic pneumonia: A case report and review of the literature. *Critical care medicine* 37(4):1470-1474.
- Johansson MW (2014) Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44(4):482-498.
- Johansson MW & Mosher DF (2013) Integrin activation States and eosinophil recruitment in asthma. *Frontiers in pharmacology* 4:33.
- Johnson MM, Mendoza R, Raghavendra AJ, Podila R & Brown JM (2017) Contribution of engineered nanomaterials physicochemical properties to mast cell degranulation. *Scientific Reports* 7:43570.
- Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ & Williams TJ (1994) Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 179(3):881-887.
- Kaisho T & Akira S (2002) Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589(1):1-13.
- Kang BN, Ha SG, Bahaie NS, Hosseinkhani MR, Ge XN, Blumenthal MN, Rao SP & Sriramarao P (2013) Regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils. *PLoS One* 8(1):e54840.

- Kang Y, Liu J, Song B, Feng X, Ou L, Wei L, Lai X & Shao L (2016) Potential Links between Cytoskeletal Disturbances and Electroneurophysiological Dysfunctions Induced in the Central Nervous System by Inorganic Nanoparticles. *Cellular Physiology and Biochemistry* 40(6):1487-1505.
- Kapp A, Zeck-Kapp G, Czech W & Schopf E (1994) The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *The Journal of investigative dermatology* 102(6):906-914.
- Kay AB (2001) Allergy and allergic diseases. First of two parts. *The New England journal of medicine* 344(1):30-37.
- Kelly FJ & Mudway IS (2003) Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino acids* 25(3-4):375-396.
- Kielhorn J, Melber C, Keller D & Mangelsdorf I (2002) Palladium – A review of exposure and effects to human health. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205(6):417-432.
- Kim J-H, Herlyn D, Wong K-k, Park D-C, Schorge JO, Lu KH, Skates SJ, Cramer DW, Berkowitz RS & Mok SC (2003) Identification of Epithelial Cell Adhesion Molecule Autoantibody in Patients with Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* 9(13):4782.
- Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS & Gleich GJ (1991) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* 174(3):745-748.
- Klein O, Roded A, Zur N, Azouz NP, Pasternak O, Hirschberg K, Hammel I, Roche PA, Yatsu A, Fukuda M, Galli SJ & Sagi-Eisenberg R (2017) Rab5 is critical for SNAP23 regulated granule-granule fusion during compound exocytosis. *Scientific Reports* 7(1):15315.
- Kobayashi H, Kumagai K, Eguchi T, Shigematsu H, Kitaura K, Kawano M, Horikawa T, Suzuki S, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y & Suzuki R (2013) Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy. *PLoS One* 8(10):e76385.
- Kovalszki A & Weller PF (2016) Eosinophilia. *Primary care* 43(4):607-617.
- Kraft S & Kinet JP (2007) New developments in FcεpsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 7(5):365-378.
- Kurtz-Chalot A, Villiers C, Pourchez J, Boudard D, Martini M, Marche PN, Cottier M & Forest V (2017) Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 75:16-24.
- Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF & Moqbel R (1999) Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. *Blood* 94(1):23-32.
- Lacy P & Moqbel R (2000) Eosinophil cytokines. *Chemical immunology* 76:134-155.
- Lagarigue F, Kim C & Ginsberg MH (2016) The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* 128(4):479.
- Lamkhioed B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Delespesse G & Renzi PM (2003) The CCR3 Receptor Is Involved in Eosinophil Differentiation and Is Up-Regulated by Th2 Cytokines in CD34⁺ Progenitor Cells. *The Journal of Immunology* 170(1):537.

- Lamkhioued B, Gounni AS, Gruart V, Pierce A, Capron A & Capron M (1995) Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *European journal of immunology* 25(1):117-125.
- Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepeda EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD & Hamid Q (1997) Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *The Journal of Immunology* 159(9):4593.
- Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA & Nielsen GD (2010a) Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(2):114-117.
- Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA & Nielsen GD (2010b) Nano Titanium Dioxide Particles Promote Allergic Sensitization and Lung Inflammation in Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 106(2):114-117.
- Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H & Girard D (2005) Viscum album agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol* 130(4):527-535.
- Leso V & Iavicoli I (2018) Palladium Nanoparticles: Toxicological Effects and Potential Implications for Occupational Risk Assessment. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2):503.
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I & Hamid QA (2004) New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation* 113(5):651-657.
- Levi-Schaffer F, Lacy P, Severs NJ, Newman TM, North J, Gomperts B, Kay AB & Moqbel R (1995) Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85(9):2579-2586.
- Levine RL, Moskovitz J & Stadtman ER (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB life* 50(4-5):301-307.
- Liu G-T, Hwang C-S, Hsieh C-H, Lu C-H, Chang SL-Y, Lee J-C, Huang C-F & Chang H-T (2013) Eosinophil-Derived Neurotoxin Is Elevated in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mediators of Inflammation* 2013:7.
- Lucey DR, Nicholson-Weller A & Weller PF (1989) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4):1348-1351.
- Lungu M, Neculae A, Bunoiu M & Biris C (2014) *Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment*. Springer International Publishing. <https://books.google.ca/books?id=J2UcBQAAQBAJ>
- Ma L, Rohatgi R & Kirschner MW (1998) The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15362-15367.
- MacPherson JC, Comhair SAA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, Samoszuk MK & Hazen SL (2001) Eosinophils Are a Major Source of Nitric Oxide-Derived Oxidants in Severe Asthma: Characterization of Pathways Available to Eosinophils for Generating Reactive Nitrogen Species. *The Journal of Immunology* 166(9):5763.
- Mahajan L, Pandit H, Madan T, Gautam P, Yadav AK, Warke H, Sundaram CS, Sirdeshmukh R, Sarma PU, Kishore U & Surolia A (2013) Human Surfactant Protein D Alters Oxidative Stress and HMGA1 Expression to Induce p53 Apoptotic Pathway in Eosinophil Leukemic Cell Line. *PloS one* 8(12):e85046.

- Martin LB, Kita H, Leiferman KM & Gleich GJ (1996) Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *International archives of allergy and immunology* 109(3):207-215.
- Martins CA, Fernández PS, Troiani HE, Martins ME, Arenillas A & Camara GA (2014) Agglomeration and Cleaning of Carbon Supported Palladium Nanoparticles in Electrochemical Environment. *Electrocatalysis* 5(2):204-212.
- Mawhorter SD, Pearlman E, Kazura JW & Boom WH (1993) Class II major histocompatibility complex molecule expression on murine eosinophils activated in vivo by *Brugia malayi*. *Infect Immun* 61(12):5410-5412.
- McNagny K & Graf T (2002) Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med* 195(11):F43-47.
- Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM & Weller PF (2005) Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6(11):1047-1057.
- Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S & Di Rago L (1996) Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88(10):3755-3764.
- Miller MA, Askevold B, Mikula H, Kohler RH, Pirovich D & Weissleder R (2017) Nanopalladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry. *Nature Communications* 8:15906.
- Minang JT, Arestrom I, Troye-Blomberg M, Lundeborg L & Ahlborg N (2006) Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clinical and experimental immunology* 146(3):417-426.
- Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW & McDonald JD (2007) Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. *Toxicological Sciences* 100(1):203-214.
- Moisan E & Girard D (2006) Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 79(3):489-498.
- Moqbel R & Coughlin JJ (2006) Differential Secretion of Cytokines. *Science & STKE* 2006(338):pe26.
- Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niino H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K & Akashi K (2009) Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 206(1):183-193.
- Motojima S, Frigas E, Loegering DA & Gleich GJ (1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *The American review of respiratory disease* 139(3):801-805.
- Mukherjee SP & Mukherjee C (1982) Similar activities of nerve growth factor and its homologue proinsulin in intracellular hydrogen peroxide production and metabolism in adipocytes. Transmembrane signalling relative to insulin-mimicking cellular effects. *Biochem Pharmacol* 31(20):3163-3172.
- Mullins RD, Heuser JA & Pollard TD (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6181-6186.

- Murdoch JR & Lloyd CM (2010) Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research* 690(1-2):24-39.
- Murphy-Marion M & Girard D (2017) Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway. *Immunobiology* 10.1016/j.imbio.2017.10.030.
- Murphy-Marion M & Girard D (2018) Titanium dioxide nanoparticles induce human eosinophil adhesion onto endothelial EA.hy926 cells via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt cell signalling pathway. *Immunobiology* 223(2):162-170.
- Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao J, Gou L, Hunyadi SE & Li T (2005) Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *The journal of physical chemistry. B* 109(29):13857-13870.
- Myou S, Zhu X, Boetticher E, Qin Y, Myo S, Meliton A, Lambertino A, Munoz NM, Hamann KJ & Leff AR (2002) Regulation of adhesion of AML14.3D10 cells by surface clustering of $\beta(2)$ -integrin caused by ERK-independent activation of cPLA(2). *Immunology* 107(1):77-85.
- Nagao T, Matsumura M, Mabuchi A, Ishida-Okawara A, Koshio O, Nakayama T, Minamitani H & Suzuki K (2007) Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrology Dialysis Transplantation* 22(1):77-87.
- Namvar F, Rahman HS, Mohamad R, Baharara J, Mahdavi M, Amini E, Chartrand MS & Yeap SK (2014) Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. *Int J Nanomedicine* 9:2479-2488.
- Nathan CF, Brukner LH, Silverstein SC & Cohn ZA (1979) Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. *J Exp Med* 149(1):84-99.
- Nedelec J, Boucraut J, Garnier JM, Bernard D & Rougon G (1990) Evidence for autoimmune antibodies directed against embryonic neural cell adhesion molecules (N-CAM) in patients with group B meningitis. *Journal of neuroimmunology* 29(1-3):49-56.
- Nemeth T & Mocsai A (2016) Feedback Amplification of Neutrophil Function. *Trends in immunology* 37(6):412-424.
- Nerlov C & Graf T (1998a) PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & development* 12(15):2403-2412.
- Nerlov C, McNagny KM, Doderlein G, Kowenz-Leutz E & Graf T (1998b) Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes & development* 12(15):2413-2423.
- Neubauer N, Palomaeki J, Karisola P, Alenius H & Kasper G (2015a) Size-dependent ROS production by palladium and nickel nanoparticles in cellular and acellular environments - An indication for the catalytic nature of their interactions. *Nanotoxicology* 9(8):1059-1066.
- Neubauer N, Palomaeki J, Karisola P, Alenius H & Kasper G (2015b) Size-dependent ROS production by palladium and nickel nanoparticles in cellular and acellular environments - An indication for the catalytic nature of their interactions. *Nanotoxicology* 9(8):1059-1066.
- Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RC, Reynolds L, Ghiran I, Mahmudi-Azer S, Odemuyiwa SO, Dvorak AM, Moqbel R & Weller PF (2008) Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18478-18483.

- Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST & Celedon JC (2005) Cytokines, allergy, and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 5(2):161-166.
- Niethammer P, Grabher C, Look AT & Mitchison TJ (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459(7249):996-999.
- Niu W, Zhang L & Xu G (2010) Shape-Controlled Synthesis of Single-Crystalline Palladium Nanocrystals. *ACS Nano* 4(4):1987-1996.
- Noël C, Simard J-C & Girard D (2016) Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicology in Vitro* 31:12-22.
- Noel C, Simard JC & Girard D (2016) Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol In Vitro* 31:12-22.
- O'Donnell MC, Ackerman SJ, Gleich GJ & Thomas LL (1983) Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J Exp Med* 157(6):1981-1991.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7):823-839.
- Ogbogu PU, Rosing DR & Horne MK, 3rd (2007) Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes. *Immunology and allergy clinics of North America* 27(3):457-475.
- Omann GM, Allen RA, Bokoch GM, Painter RG, Traynor AE & Sklar LA (1987) Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiological reviews* 67(1):285-322.
- Ozkar S & Finke RG (2016) Palladium(0) Nanoparticle Formation, Stabilization, and Mechanistic Studies: Pd(acac)(2) as a Preferred Precursor, [Bu(4)N](2)HPO(4) Stabilizer, plus the Stoichiometry, Kinetics, and Minimal, Four-Step Mechanism of the Palladium Nanoparticle Formation and Subsequent Agglomeration Reactions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 32(15):3699-3716.
- Pabst T & Mueller BU (2009) Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(17):5303-5307.
- Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA & Abraham D (2006) Eosinophils Can Function as Antigen-Presenting Cells To Induce Primary and Secondary Immune Responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infection and Immunity* 74(6):3232-3238.
- Padilla R, Maccioni RB & Avila J (1990) Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau. *Molecular and cellular biochemistry* 97(1):35-41.
- Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA & Thomas LL (1999) Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21(2):230-237.
- Park YM & Bochner BS (2010) Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 2(2):87-101.
- Paul WE & Zhu J (2010) How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10(4):225-235.
- Pawankar R, Nonaka M, Yamagishi S & Yagi T (2004) Pathophysiologic mechanisms of chronic rhinosinusitis. *Immunology and allergy clinics of North America* 24(1):75-85.
- Pease JE & Williams TJ (2001) Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol* 1(3):248-253.

- Pelletier M & Girard D (2005) Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* 141(2):315-325.
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S & Cassatella MA (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115(2):335-343.
- Perobelli SM, Galvani RG, Goncalves-Silva T, Xavier CR, Nobrega A & Bonomo A (2015) Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 48(8):665-675.
- Plager DA, Loegering DA, Checkel JL, Tang J, Kephart GM, Caffes PL, Adolphson CR, Ohnuki LE & Gleich GJ (2006) Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(10):7340-7345.
- 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 (2015) Silver nanoparticles of 70 nm and 20 nm affect differently the biology of human neutrophils. *J Immunotoxicol* 10.3109/1547691x.2015.1106622:1-11.
- 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.
- Prasad S, Gupta SC & Tyagi AK (2017) Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters* 387:95-105.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R & de Vries JE (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8):3730-3734.
- Racz P, Tenner-Racz K, Buttner DW & Albiez EJ (1982) Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchocercal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmedizin und Parasitologie* 33(4):213-218.
- Rankin JA, Harris P & Ackerman SJ (1992) The effects of eosinophil-granule major basic protein on lung-macrophage superoxide anion generation. *J Allergy Clin Immunol* 89(3):746-752.
- Rauch S, Morrison GM & Moldovan M (2002a) Scanning laser ablation-ICP-MS tracking of platinum group elements in urban particles. *Science of The Total Environment* 286(1):243-251.
- Rauch S, Morrison GM & Moldovan M (2002b) Scanning laser ablation-ICP-MS tracking of platinum group elements in urban particles. *Sci Total Environ* 286(1-3):243-251.
- Ravindra K, Bencs L & Van Grieken R (2004) Platinum group elements in the environment and their health risk. *Sci Total Environ* 318(1-3):1-43.
- Reale M, Vianale G, Lotti LV, Mariani-Costantini R, Perconti S, Cristaudo A, Leopold K, Antonucci A, Di Giampaolo L, Iavicoli I, Di Gioacchino M & Boscolo P (2011) Effects of palladium nanoparticles on the cytokine release from peripheral blood mononuclear cells of palladium-sensitized women. *Journal of occupational and environmental medicine* 53(9):1054-1060.
- Reis AC, Alessandri AL, Athayde RM, Perez DA, Vago JP, Ávila TV, Ferreira TPT, de Arantes AC, de Sá Coutinho D, Rachid MA, Sousa LP, Martins MA, Menezes GB, Rossi AG,

- Teixeira MM & Pinho V (2015) Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death & Disease* 6:e1632.
- Rogers KR, Morris CJ & Blake DR (1992) The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51(4):565-571.
- Rosas-Hernandez H, Jimenez-Badillo S, Martinez-Cuevas PP, Gracia-Espino E, Terrones H, Terrones M, Hussain SM, Ali SF & Gonzalez C (2009) Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett* 191(2-3):305-313.
- Rosenberg HF, Phipps S & Foster PS (2007) Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119(6):1303-1310; quiz 1311-1302.
- Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ & Dahinden CA (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176(6):1489-1495.
- Roy R, Kumar S, Verma AK, Sharma A, Chaudhari BP, Tripathi A, Das M & Dwivedi PD (2013) Zinc oxide nanoparticles provide an adjuvant effect to ovalbumin via a Th2 response in Balb/c mice. *Int Immunol* 13:13.
- Ryan GB & Majno G (1977) Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* 86(1):183-276.
- Sadik CD, Kim ND & Luster AD (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* 32(10):452-460.
- Sauer H, Wartenberg M & Hescheler J (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 11(4):173-186.
- Savill J (1997) Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of leukocyte biology* 61(4):375-380.
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F & Cassatella MA (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological reviews* 177:195-203.
- Scepek S, Moqbel R & Lindau M (1994) Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. *Parasitology today (Personal ed.)* 10(7):276-278.
- Schieber M & Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology : CB* 24(10):R453-R462.
- Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Lusciuskas FW, Gimbrone MA, Jr., McIntyre BW & et al. (1992) IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148(4):1086-1092.
- Schmid M, Zimmermann S, Krug HF & Sures B (2007) Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environment international* 33(3):385-390.
- Schmidt EP, Lee WL, Zemans RL, Yamashita C & Downey GP (2011) On, Around, and Through: Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity. *Physiology (Bethesda, Md.)* 26(5):334-347.
- Schwartz LB (1987) Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. *Ann Allergy* 58(4):226-235.

- Schwarz DS & Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73:79-94.
- Segal M, Niazi S, Simons MP, Galati SA & Zangrilli JG (2007) Bid activation during induction of extrinsic and intrinsic apoptosis in eosinophils. *Immunology and cell biology* 85(7):518-524.
- Seminario MC & Gleich GJ (1994) The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Immunol* 6(6):860-864.
- Sevier CS, Cuozzo JW, Vala A, Aslund F & Kaiser CA (2001) A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nat Cell Biol* 3(10):874-882.
- Shah V. BI (2009) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut.* 197:143–148.
- Shahabuddin S, Ponath P & Schleimer RP (2000) Migration of Eosinophils Across Endothelial Cell Monolayers: Interactions Among IL-5, Endothelial-Activating Cytokines, and C-C Chemokines. *The Journal of Immunology* 164(7):3847.
- Shalit M, Sekhsaria S & Malech HL (1995) Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cellular immunology* 160(1):50-57.
- Shen Z-J & Malter JS (2015) XBP1, a novel regulator of the eosinophil lineage. *Nature immunology* 16(8):793-794.
- Sikora A, Shard AG & Minelli C (2016) Size and ζ -Potential Measurement of Silica Nanoparticles in Serum Using Tunable Resistive Pulse Sensing. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 32(9):2216-2224.
- Silva LR & Girard D (2016a) Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. *Toxicology letters* 259:11-20.
- Silva LR & Girard D (2016b) Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. *Toxicology letters* 259:11-20.
- Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira LFA & Corrêa-Oliveira R (2006) High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101:345-351.
- Simard JC, Simon MM, Tessier PA & Girard D (2011) Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 186(6):3622-3631.
- Simon MM, Simard JC & Girard D (2013) Viscum album agglutinin-I (VAA-I) increases cell surface expression of cytoskeletal proteins in apoptotic human neutrophils: moesin and ezrin are two novel targets of VAA-I. *Human & experimental toxicology* 32(10):1097-1106.
- Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology* 56(6):672-686.
- Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC & De Cuyper M (2010) High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 6(7):832-842.

- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P & Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418):318-324.
- Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews Immunology* 10:712.
- Spencer LA, Melo RC, Perez SA, Bafford SP, Dvorak AM & Weller PF (2006) Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9):3333-3338.
- Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL & Weller PF (2009) Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *Journal of leukocyte biology* 85(1):117-123.
- Speranza A, Leopold K, Maier M, Taddei AR & Scoccianti V (2010) Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd(II). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 158(3):873-882.
- Steinke JW & Borish L (2001) Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2(2):66-70.
- Stone KD, Prussin C & Metcalfe DD (2010a) IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2):S73-S80.
- Stone KD, Prussin C & Metcalfe DD (2010b) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S73-80.
- Straub RH & Schradin C (2016) Chronic inflammatory systemic diseases: An evolutionary trade-off between acutely beneficial but chronically harmful programs. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2016(1):37-51.
- Sun Y & Xia Y (2002) Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science (New York, N.Y.)* 298(5601):2176-2179.
- Tamassia N, Le Moigne V, Rossato M, Donini M, McCartney S, Calzetti F, Colonna M, Bazzoni F & Cassatella MA (2008) Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(9):6563-6573.
- Tarantola M, Schneider D, Sunnick E, Adam H, Pierrat S, Rosman C, Breus V, Sonnichsen C, Basche T, Wegener J & Janshoff A (2009) Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility. *ACS Nano* 3(1):213-222.
- Tedla N, Bandeira-Melo C, Tassinari P, Sloane DE, Samplaski M, Cosman D, Borges L, Weller PF & Arm JP (2003) Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3):1174-1179.
- Teranishi T & Miyake M (1998) Size Control of Palladium Nanoparticles and Their Crystal Structures. *Chemistry of Materials* 10(2):594-600.
- Thannickal VJ & Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6):L1005-1028.
- Theron AJ, Ramafi GJ, Feldman C, Grimmer H, Visser SS & Anderson R (2004) Effects of platinum and palladium ions on the production and reactivity of neutrophil-derived reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 36(11):1408-1417.

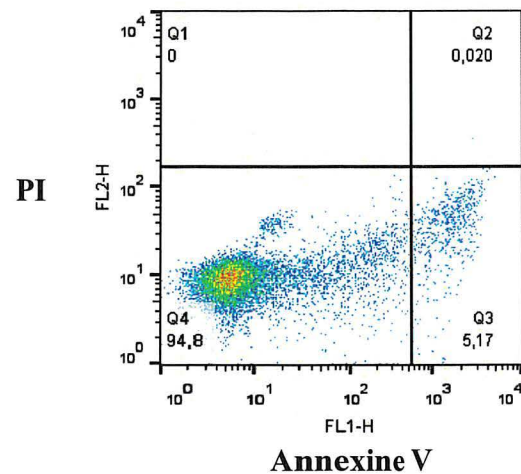
- Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ & Franks D (1979) Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. *Parasitology* 79(3):367-379.
- Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U & Haskard DO (1991) Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146(2):592-598.
- Thorp KM, Southern C, Bird IN & Matthews N (1992) Tumour necrosis factor induction of ELAM-1 and ICAM-1 on human umbilical vein endothelial cells--analysis of tumour necrosis factor-receptor interactions. *Cytokine* 4(4):313-319.
- Tolmachova T, Anders R, Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM, Huxley C & Seabra MC (2004) A general role for Rab27a in secretory cells. *Molecular biology of the cell* 15(1):332-344.
- Tomishko MM, Demicheva OV, Alekseev AM, Tomishko AG, Klinova LL & Fetisova OE (2009) Multiwall carbon nanotubes and their applications. *Russian Journal of General Chemistry* 79(9):1982.
- Torrent M, Navarro S, Moussaoui M, Nogues MV & Boix E (2008) Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans. *Biochemistry* 47(11):3544-3555.
- Tucker JB (1984) Spatial organization of microtubule-organizing centers and microtubules. *The Journal of cell biology* 99(1 Pt 2):55s-62s.
- 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.
- Urban JF, Jr., Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M & Finkelman FD (1998) IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8(2):255-264.
- Vallièrès F, Simard J-C, Noël C, Murphy-Marion M, Lavastre V & Girard D (2016) Activation of human AML14.3D10 eosinophils by nanoparticles: Modulatory activity on apoptosis and cytokine production. *Journal of Immunotoxicology* 13(6):817-826.
- Vallieres F, Simard JC, Noel C, Murphy-Marion M, Lavastre V & Girard D (2016) Activation of human AML14.3D10 eosinophils by nanoparticles: Modulatory activity on apoptosis and cytokine production. *J Immunotoxicol* 13(6):817-826.
- Venereau E, Ceriotti C & Bianchi ME (2015) DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 6:422.
- Vestweber D, Winderlich M, Cagna G & Nottebaum AF (2009) Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in cell biology* 19(1):8-15.
- Virtanen I, Vartio T, Badley RA & Lehto VP (1982) Fibronectin in adhesion, spreading and cytoskeletal organization of cultured fibroblasts. *Nature* 298(5875):660-663.
- Voehringer D, van Rooijen N & Locksley RM (2007) Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 81(6):1434-1444.
- Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA & Shin HS (2014) ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-

- 7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 117:267-276.
- Walsh ER, Sahu N, Kearley J, Benjamin E, Kang BH, Humbles A & August A (2008) Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma. *J Exp Med* 205(6):1285-1292.
- Walsh GM, Mermoud JJ, Hartnell A, Kay AB & Wardlaw AJ (1991) Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha 4 beta 1 (very late antigen-4) dependent. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 146(10):3419-3423.
- Wang C, Hu X, Gao Y & Ji Y (2015) ZnO Nanoparticles Treatment Induces Apoptosis by Increasing Intracellular ROS Levels in LTEP-a-2 Cells. *BioMed Research International* 2015:423287.
- Wang JG, Mahmud SA, Nguyen J & Slungaard A (2006) Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(12):8714-8722.
- Wang Q, Chiang ET, Lim M, Lai J, Rogers R, Janmey PA, Shepro D & Doerschuk CM (2001) Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. *Blood* 97(3):660-668.
- Ward PA & Lentsch AB (1999) The acute inflammatory response and its regulation. *Archives of Surgery* 134(6):666-669.
- Wardlaw AJ, Symon FS & Walsh GM (1994) Eosinophil adhesion in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 94(6):1163-1171.
- Warringa RA, Koenderman L, Kok PT, Kreukniet J & Bruijnzeel PL (1991) Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* 77(12):2694-2700.
- Watanabe T, Tsuchida T, Kanda N, Mori K, Hayashi Y & Tamaki K (1999) Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren syndrome and lupus erythematosus. *Archives of dermatology* 135(5):535-539.
- Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT & Finberg RW (1993) Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150(6):2554-2562.
- Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature medicine* 18(5):716-725.
- Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H, Schulze-Osthoff K, Nickel C, Stahlmecke B, Kuhlbusch TAJ, Scherbart AM, Esser C, Schins RPF & Albrecht C (2013) Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner. *PloS one* 8(6):e65704.
- Wilkinson KE, Palmberg L, Witasp E, Kupczyk M, Feliu N, Gerde P, Seisenbaeva GA, Fadeel B, Dahlén S-E & Kessler VG (2011a) Solution-Engineered Palladium Nanoparticles: Model for Health Effect Studies of Automotive Particulate Pollution. *ACS Nano* 5(7):5312-5324.
- Wilkinson KE, Palmberg L, Witasp E, Kupczyk M, Feliu N, Gerde P, Seisenbaeva GA, Fadeel B, Dahlen SE & Kessler VG (2011b) Solution-engineered palladium nanoparticles: model for health effect studies of automotive particulate pollution. *ACS Nano* 5(7):5312-5324.
- Xiong Y & Xia Y (2007) Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Palladium. *Advanced Materials* 19(20):3385-3391.

- Xu F, Piett C, Farkas S, Qazzaz M & Syed NI (2013a) Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Mol Brain* 6:29.
- Xu F, Piett C, Farkas S, Qazzaz M & Syed NI (2013b) Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Molecular Brain* 6(1):29.
- Yamaguchi Y, Ackerman SJ, Minegishi N, Takiguchi M, Yamamoto M & Suda T (1998) Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene. *Blood* 91(9):3447-3458.
- Yamaguchi Y, Suda T, Ohta S, Tominaga K, Miura Y & Kasahara T (1991) Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood* 78(10):2542-2547.
- Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, Fu Q, Tchernev VT, Wang M, Schweitzer B, Kingsmore SF, Patel DD, Oppenheim JJ & Howard OM (2004) Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173(10):6134-6142.
- Yarulin AE, Crespo-Quesada RM, Egorova EV & Kiwi-Minsker LL (2012) Structure sensitivity of selective acetylene hydrogenation over the catalysts with shape-controlled palladium nanoparticles. *Kinetics and Catalysis* 53(2):253-261.
- Ying S, Meng Q, Taborda-Barata L, Corrigan CJ, Barkans J, Assoufi B, Moqbel R, Durham SR & Kay AB (1996) Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *European journal of immunology* 26(1):70-76.
- Yoshida S, Sakamoto H, Mikami H, Onuma K, Shoji T, Nakagawa H, Hasegawa H & Amayasu H (1999a) Palladium allergy exacerbating bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103(6):1211-1212.
- Yoshida S, Sakamoto H, Mikami H, Onuma K, Shoji T, Nakagawa H, Hasegawab H & Amayasu H (1999b) Palladium allergy exacerbating bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103(6):1211-1212.
- Yuan YG, Peng QL & Gurunathan S (2017) Combination of palladium nanoparticles and tubastatin-A potentiates apoptosis in human breast cancer cells: a novel therapeutic approach for cancer. *Int J Nanomedicine* 12:6503-6520.
- Zabucchi G, Soranzo MR, Menegazzi R, Bertoincin P, Nardon E & Patriarca P (1989) Uptake of human eosinophil peroxidase and myeloperoxidase by cells involved in the inflammatory process. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 37(4):499-508.
- Zagai U, Dadfar E, Lundahl J, Venge P & Skold CM (2007) Eosinophil cationic protein stimulates TGF-beta1 release by human lung fibroblasts in vitro. *Inflammation* 30(5):153-160.
- Zhang X, Msc, Moilanen E, Lahti A, Hämäläinen M, Giembycz MA, Barnes PJ, Lindsay MA & Kankaanranta H (2003) Regulation of eosinophil apoptosis by nitric oxide: Role of c-Jun-N-terminal kinase and signal transducer and activator of transcription 5. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112(1):93-101.
- Zhang XF, Yan Q, Shen W & Gurunathan S (2016) Trichostatin A Enhances the Apoptotic Potential of Palladium Nanoparticles in Human Cervical Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* 17(8).

- Zhao R, Masayasu H & Holmgren A (2002) Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(13):8579.
- Zhu C, Zeng J, Lu P, Liu J, Gu Z & Xia Y (2013) Aqueous-Phase Synthesis of Single-Crystal Pd Seeds 3 nm in Diameter and Their Use for the Growth of Pd Nanocrystals with Different Shapes. *Chemistry – A European Journal* 19(16):5127-5133.
- Zhu J, Yamane H & Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489.
- Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y & Elias JA (1999) Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *The Journal of clinical investigation* 103(6):779-788.

Annexe



Annexe I. Représentation des cadrans servant à déterminer la viabilité cellulaire des AML14.3D10. Les cellules ont été incubées avec le diluant (Ctrl), 1 $\mu\text{g/ml}$ VAA-1 (VAA) ou la concentration de NP de Pd indiquée ou 100 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24h. Les états apoptotiques ou nécrotiques ont été déterminés par cytométrie en flux suivant un marquage avec FITC annexine V/PI. Les cellules ont été considérées comme vivantes lorsque la population se cartographiait dans le cadran Q4, nécrotiques lorsqu'elle se situait dans le cadran Q1, apoptotique précoce lorsqu'elle se trouvait dans le cadran Q3, puis apoptotique avancée dans le cadran Q2.

