



Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro

M. Simon

► To cite this version:

M. Simon. Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro. Biologie cellulaire. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2009. Français. NNT: . tel-00525919

HAL Id: tel-00525919

<https://theses.hal.science/tel-00525919>

Submitted on 13 Oct 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

par **Marina SIMON**

POUR OBTENIR LE TITRE DE

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE
BORDEAUX 1**

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

**Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la
fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro.**

Thèse soutenue le : 7 décembre 2009

Après avis de :

Mr. Bohic Sylvain, Chargé de Recherche, INSERM
Mr. Boczkowski Jorge, Directeur de Recherche, INSERM

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Delville Marie-Hélène, Directeur de Recherche, CNRS
Mme Ohayon-Courtès, Professeur, Université Bordeaux 2

Examineurs

M. Hervé Seznec, Chargé de Recherche, CNRS

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Bernard Haas de m'avoir accueillie au CENBG et Philippe Moretto de m'avoir permis d'intégrer le groupe Interface Physique Biologie pour ces trois années de thèse

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Madame Marie-Hélène Delville pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse et examiné ce travail, Messieurs Jorge Boczkowski et Sylvain Bohic pour avoir accepté d'être les rapporteurs et Madame Céline Ohayon-Courtès d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du groupe IPB avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler au cours de ces trois années.

Plus particulièrement, je souhaite remercier mon directeur de thèse, Hervé Seznec, pour sa patience, son soutien et son encadrement au cours de ce travail. Ce duo détonnant Basco-Breton a bien fonctionné durant ces trois années durant lesquelles tu m'as permis d'évoluer dans le monde de la recherche et d'acquérir rigueur et organisation dans mon travail, ce qui n'était pas gagné d'avance !

Je n'oublie pas bien sûr, Philippe Barberet, mon binôme, pour toute son aide lors des expériences microfaisceau et dans l'analyse des données microfaisceaux. Merci pour ta patience et toutes tes explications !

Je vous remercie tous les 2 pour tous les longs week-ends passés sur la plateforme et les traditionnels jambon-frites à la cafet' ou les pizzas à la Bulle !

Je remercie les autres membres du groupe, Philipe Moretto, Sébastien Incerti et Claire Habchi, les différents stagiaires que j'ai pu encadrer et qui m'ont permis d'avancer plus rapidement dans l'analyse des données François, Pierre-Marie, Charles et Virginie et les futurs membres du groupe IPCV Richard, Asun, Stéphane et Guillaume pour leur aide et leur gentillesse.

Enfin, je tiens à élargir ces remerciements à l'ensemble du personnel du CENBG.

Je tiens également à remercier chaque membre des différents laboratoires avec qui j'ai travaillé durant mon doctorat et qui ont rendu mes années de thèse particulièrement agréables :

Merci à François Ichas de m'avoir accueillie dans son laboratoire et plus particulièrement à Chantal, Anne-Lise et Laurence pour leur aide et tous nos moments de rigolades.

Merci à Marie-Hélène Delville pour m'avoir formé à la fonctionnalisation des nanoparticules, et m'avoir permis de faire avancer grandement mon projet de thèse.

Merci aux personnels des différentes plateformes avec lesquels j'ai passé d'agréables moments : Philippe Alfaut, Stéphanie Sorieul, Laurent Daudin (AIFIRA), Philippe Legros, Cristel Pujol (Microscopie Confocal) et Etienne Gontier (Microscopie Electronique).

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'Institut de Recherche Pierre Fabre pour le soutien financier et plus particulièrement à Hélène Duplan, Daniel Bacqueville et Alain Mavon pour la collaboration que nous avons entretenue pour ce travail.

Finalement, je remercie toute ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et supporté (dans tous les sens du terme) au cours de ces 3 années. Merci à Caro, Manu, Fabien, Stéphane, Soizic, Maxence, Mehdi et Laurent.

Je dis un grand MERCI à mes parents et à ma sœur, Maud, pour leur aide inestimable, leur soutien constant et si réconfortant ainsi qu'à Mathieu, qui m'a permis d'être plus sereine et de mener à bien cette thèse. Merci de votre compréhension et de votre patience.

Je tiens tout particulièrement à vous dédier cette thèse à tous les 4.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	8
I. Interaction Rayonnement - Matière	11
1. Définitions	11
2. Interactions ion-matière et rayonnement matière	12
3. Techniques d'analyses issues des interactions ion - matière.....	13
3.1. La technique d'analyse PIXE (<i>Particle Induced X-ray Emission</i>).....	13
3.2. La technique d'analyse RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry).....	16
3.3. Complémentarité des deux techniques	17
3.4. La technique d'analyse STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) ou microscopie ionique en transmission	18
4. Le Vivant, un matériau particulier	19
5. Les différentes procédures d'analyse	20
II Microfaisceau d'ions	26
1. Les microfaisceaux.....	26
2. La ligne microfaisceau AIFIRA	27
2.1. L'accélérateur SINGLETRON de la plateforme AIFIRA	27
2.2. Dispositif de focalisation.....	28
2.3. La chambre d'analyse sous vide.....	29
2.4. Acquisition des données.....	29
2.4.1. Le système de balayage	29
2.4.2. L'acquisition des données	30
2.5. Traitement des spectres X	31
2.5.1. Identification des « pics ».....	31
2.5.2. Calcul des concentrations dans le cas de cibles minces	31
2.6. Traitement des spectres RBS.....	32
2.7. Construction des cartographies élémentaires	32
2.8. Les spectres locaux.....	34

III. L'apport des microfaisceaux à l'étude de tissus biologiques complexes : L'exemple de la peau	35
1. La Peau- Définition – Présentation générale.....	35
2. La peau – Structurale.....	36
2.1. Hypoderme	37
2.2. Derme	37
2.3. Epiderme	38
2.3.1. La couche basale (stratum basale ou stratum germinativum)	39
2.3.2. La couche épineuse (<i>stratum spinosum</i>)	39
2.3.3. La couche granuleuse (<i>stratum granulosum</i>)	39
2.3.4. La couche cornée (<i>stratum corneum</i>).....	40
3. La peau – Fonctions physiologiques	41
3.1. La peau: un organe sensoriel	41
3.2. La peau : un organe métabolique	42
3.3. La peau : un organe immunologique	43
3.4. La peau, un organe de protection : la fonction barrière.....	43
3.4.1. Rôle des protéines dans la fonction barrière	44
3.4.2. Rôle des lipides dans la fonction barrière	47
3.4.3. Rôle des ions dans la fonction barrière	49
4. De la fonction barrière de la peau au passage transcutané	51
4.1. Définitions.....	51
4.2. Les voies de pénétration.....	52
4.3. Les facteurs influençant la fonction barrière.....	53
5. La peau et ses pathologies	55
5.1. Pathologies et fonction barrière cutanée	55
5.1.1 La dermatite atopique ou eczéma atopique (ATOD)	55
5.1.2. Le psoriasis.....	57
5.2. Rôle de la fonction barrière dans d'autres pathologies ?.....	58
5.2.1. Cancer de la peau, fonction barrière et crèmes solaires	58
5.2.2. Cancers du sein, fonction barrière cutanée, Sels d'Aluminium	63
5.2.3. En conclusion	66
6. La fonction barrière et ses modèles d'études	66
6.1. Les modèles de peau disponibles	66
6.2. Les modèles d'étude disponibles : FB (Modèle diffusion passive)	70
6.3. Les différents protocoles d'altérations physiologiques de la fonction barrière.....	72

OBJECTIFS DE LA THESE	75
FONCTION BARRIERE et PEAU D'OREILLE de PORC	77
MATERIEL ET METHODES	79
1. Réception et préparation des oreilles	80
2. Validation du maintien en survie de la peau d'oreille de porc pendant 24 heures.....	80
3. Réponse de la peau d'oreille de porc face à des stress chimiques	81
4. Réponse de la peau d'oreille de porc maintenue en survie à un stress physique	81
5. Coupes des échantillons	82
6. Coloration histologique	82
7. Immunohistofluorescence	83
8. Analyse des échantillons par microfaisceau d'ions.....	83
RESULTATS	84
1. Analyse par microfaisceau d'ions et traitement de données	85
1.1. Acquisition	85
1.2. Sélection de zones d'analyses	85
1.2.1. Distributions chimiques spécifiques / Sélection de zones.....	85
1.2.2. Obtention du spectre associé	86
1.3. Traitement des spectres RBS (RUMPin) et des spectres X (Gupix) – Extraction des données quantitatives et définition de l'incertitude sur la mesure.	86
2. Peau d'oreille de porc, Peau Humaine et Epiderme reconstruit.....	88
3. Peau d'oreille de Porc et conditions de culture	93
3.1. Morphologie et distributions chimiques élémentaires des explants de peau d'oreille de porc maintenus en survie	93
3.2. Définition de l'impact de la culture des explants de peau de porc sur les compositions chimiques élémentaires	94
3.3. Mise en évidence du gradient de concentration calcique	95
4. Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement au SDS	98
5. Fonction barrière et exposition aux ultraviolets	105
FONCTION BARRIERE et OXYDES d'ALUMINIUM.....	110
MATERIEL ET METHODES	112
1. Préparation des échantillons.....	113
2. Cryo-section et lyophilisation des échantillons.....	113
3. Coloration histologique	113
4. Immunohistofluorescence	114

5. Analyse des échantillons par microfaisceau d'ions.....	114
RESULTATS	115
1. Répartitions de surface de l'aluminium différentes en fonction du produit appliqué....	116
2. Quantification des concentrations d'aluminium dans les explants de peau d'oreille de porc en fonction du produit appliqué	117
Papier 1: The skin barrier function: a micro-PIXE study	119
APPLICATION DE L'ANALYSE PAR MICROFAISCEAU D'IONS A L'ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOPARTICULES DE TiO ₂	126
OBJECTIFS DE L'ETUDE	126
Papier 2: Intracellular Localization and Cytotoxicity of Bared and Fluorescent Dye -Modified Titanium Dioxide Nanoparticles. Evidence of calcium Homeostasis Alteration in Nanotoxicity Mechanisms.....	134
CONCLUSION-DISCUSSION	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	184
Papier 3 : Monte-Carlo Dosimetry for targeted irradiation of individual cells using a microprobe facility.	194

Introduction

Le Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG) est une unité mixte de recherche dépendant de l'Université Bordeaux 1 et de l'IN2P3, institut du CNRS dédié à la physique nucléaire et à la physique des particules. Ses travaux de recherche sont variés et vont de la physique nucléaire proprement dite à des domaines plus appliqués tels que la détection de faibles taux de radioactivité ou encore l'interface entre la physique et la biologie.

Dans le cadre d'un programme de recherches interdisciplinaires basé sur l'utilisation de microfaisceaux d'ions, le CENBG s'est doté d'un nouvel accélérateur électrostatique (3.5 MV HVEE Singletron) délivrant des faisceaux d'ions de faible énergie (quelques MeV). Ce dispositif expérimental de dernière génération présente des caractéristiques qui autorisent la production de faisceaux d'ions focalisés performants et adaptés à des études dans des domaines aussi variés que l'environnement, la santé, le nucléaire, l'archéologie, les matériaux... Cette plateforme a été inaugurée en mars 2006 juste avant mon arrivée au laboratoire. Ainsi, sous la direction du Pr. Ph. Moretto au sein du groupe Interface Physique Biologie – IPB, j'ai pu développer ces activités de recherche grâce aux techniques d'analyses offertes par cette plateforme ainsi qu'aux plateformes de microscopies confocale et électronique de l'université de Bordeaux 2.

Le groupe IPB est un groupe interdisciplinaire composé de physiciens et biologistes dont les activités de recherche reposent sur le développement et la mise en oeuvre de méthodes physiques à partir de micro- et nanofaisceau d'ions (microsonde/nanosonde nucléaires) afin de répondre à des problématiques fondamentales et appliquées dans le domaine des sciences du vivant. Initialement, le groupe IPB a développé un micro-faisceau d'ions dédié à l'analyse sous vide d'échantillons biologiques. Cet outil permet, avec une résolution sous vide de l'ordre du micromètre, de réaliser des cartographies bidimensionnelles de la composition chimique élémentaire et de la densité de l'échantillon analysé. Depuis quelques mois, une nouvelle ligne de faisceau focalisé est en cours de développement. Ce nouveau dispositif permettra d'atteindre sous vide une résolution spatiale sub-micrométrique (<100 nm).

En parallèle, notre groupe a développé un dispositif expérimental qui autorise l'extraction à l'air de ce faisceau d'ions (He^+ , H^+) tout en conservant une résolution spatiale de l'ordre du micromètre afin de réaliser des analyses ou des micro-irradiations d'échantillons biologiques

d'intérêt. Ainsi, un programme de recherche interdisciplinaire basé sur l'utilisation des méthodes de biologie moléculaire et de ces instruments en physique a été initié.

Deux projets de recherche sont développés en parallèle: le projet « CELLIRES » (micro-irradiation cellulaire) et le projet « NANODERM » (microanalyse d'échantillons biologiques).

Le projet « NANODERM » tire partie de l'expérience de notre équipe dans le domaine des applications environnementales des microfaisceaux d'ions. La ligne microfaisceau du CENBG, encore appelée microsonde nucléaire, permet en effet de mettre en œuvre un ensemble de méthodes d'analyses quantitatives et de cartographies chimiques basées sur des interactions de type atomiques et nucléaires entre des protons (H^+ , d'énergie variant de 1 à 3,5 MeV) et la matière (Moretto, 1996). En particulier, la méthode PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*) permet une analyse chimique élémentaire avec une limite de détection de l'ordre de la ppm (*partie par million*), et ce sur la majeure partie du tableau périodique (minéraux, métaux de transition, éléments lourds toxiques) (Moretto and Beck, 2003). La technique de diffusion RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*) permet de déterminer la masse de la matière organique des échantillons étudiés via la composition en carbone, azote et oxygène. En combinant les informations fournies par les deux méthodes, PIXE et RBS, il est possible de mesurer très précisément des concentrations d'éléments traces dans des tissus ou des cellules. Enfin, la méthode STIM (*Scanning Transmission Ion Microscopy*) révèle l'ultra-structure du tissu étudié grâce au contraste en densité naturel de l'échantillon (Moretto, 1996). L'intérêt de ces techniques employées simultanément réside dans leur capacité à travailler à l'échelle du micromètre (et bientôt, à l'échelle de quelques dizaines de nanomètres) sur des coupes ou des cellules individuelles issues de culture qui auront uniquement subi une phase préparatoire de cryofixation-lyophilisation, évitant ainsi tout risque de contamination lié soit à des fixations chimiques, soit à une inclusion dans des résines de synthèse.

Le projet « NANODERM » représente l'intégralité de mon activité de thèse et s'inscrit dans la continuité des activités établies dans l'équipe avant mon arrivée. Notre groupe travaille en effet depuis plusieurs années sur des problématiques liées à la pénétration de la barrière physiologique cutanée dans le cadre d'applications en pharmacologie et en dermo-cosmétique. Cette thématique nous a ainsi amené vers des études fondamentales, d'une part de la fonction barrière cutanée et, d'autre part de l'interaction des nanoparticules avec des cellules épithéliales humaines telles que les kératinocytes.

Le groupe a été impliqué dans un certain nombre de collaborations dans le cadre de consortiums académiques (consortium européen « NANODERM ») et avec l'industrie (Institut de Recherche Pierre Fabre-Toulouse).

Le groupe IPB a participé au développement de nouvelles méthodes et outils d'analyses (analyse par faisceau d'ions à haute résolution, protocoles de préparation d'échantillons biologiques exposés à des nanoparticules). Les études par analyse chimique par microsonde nucléaire ont débuté il y a maintenant plusieurs années sur la peau humaine native issue de biopsies. Elles ont été complétées par l'étude de peau reconstituée *in vitro*. Les applications développées sont : (i) l'étude de la diffusion de substances exogènes (Oxydes de métaux, nanoparticules d'oxydes de titane) à travers la barrière cutanée (applications dermo-cosmétiques) ; (ii) l'aide au développement de modèles biologiques d'intérêt (feuillet de peau reconstituée, peau animale maintenue en survie) par caractérisation comparée à la peau native humaine; (iii) des études plus fondamentales sur des peaux pathologiques ou altérées artificiellement.

Pour ce projet, il m'a été accordé par le comité d'expérience de la plateforme AIFIRA 2 à 3 jours de faisceau par mois en moyenne. De plus, dans le cadre de la collaboration que nous menons avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre (IRPF- H. Duplan), j'ai participé : (i) à la caractérisation des échantillons de peau d'oreille de porc maintenue en survie par analyse par faisceau d'ions ; (ii) à l'étude de la diffusion de substances exogènes (oxydes d'aluminium, nanoparticules d'oxydes de titane) à travers la barrière cutanée et les conséquences potentielles sur l'homéostasie ionique ; (iii) à la mise en place de ces mêmes protocoles d'études afin d'en disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires en combinant les méthodes de biologie moléculaire et cellulaire et les méthodes d'analyses physiques (analyse par faisceau d'ions, microscopie confocale, microscopie électronique,...). Ces travaux ont été menés conjointement sur le site du CENBG et du laboratoire IRPF situé à Vigoulet-Auzil, (Castanet –Tolosan).

I. Interaction Rayonnement - Matière

1. Définitions

La matière se présente communément sous trois états : solide, liquide et gazeux. Elle se définit par son volume, sa masse et sa composition atomique. Un atome est formé de particules élémentaires: le proton (de charge électrique positive), le neutron (de charge électrique nulle), et les électrons (de charge électrique négative et exactement opposée à celle du proton). Les protons et les neutrons forment le noyau de l'atome et les électrons les couches électroniques qui l'entourent. Les électrons sont répartis sur différentes couches K, L, M, N, O, P et Q, de la plus proche du noyau à la plus éloignée (Figure 1).

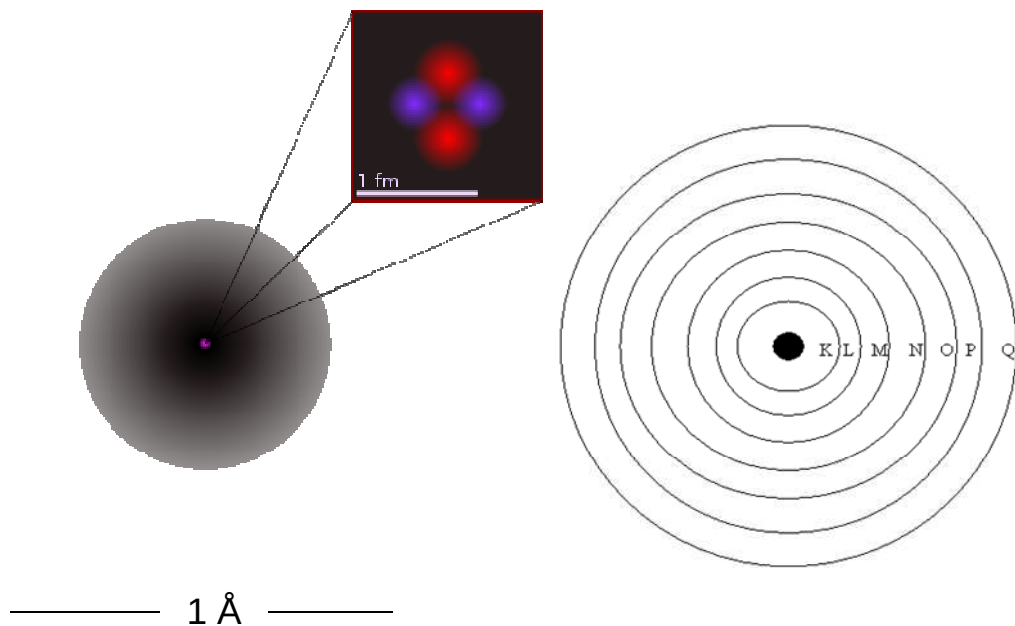


Figure 1 : **Représentation schématique d'un atome.** A gauche, représentation d'un atome d'hélium avec son noyau composé de 2 neutrons (bleu), 2 protons (rouge) et d'un nuage d'électrons. A droite, le noyau en noir et les différentes couches électroniques composant le nuage électronique. 1 Angström = 10^{-10} mètres.

L'atome comprend autant d'électrons négatifs que de protons positifs. Il est électriquement neutre. Les atomes peuvent s'agencer entre eux pour former des structures plus grosses et plus complexes, telles que les molécules.

2. Interactions ion-matière et rayonnement matière

Les interactions rayonnement-matière et ion-matière décrivent respectivement les effets d'un rayonnement électromagnétique (photons dans les domaines visibles, UV, rayon X ou gamma) ou d'un ion (proton, ion hélium ou ion plus lourd) sur un atome ou une molécule. Ces différents types d'interaction peuvent donner accès à des informations précises sur la composition d'un matériau.

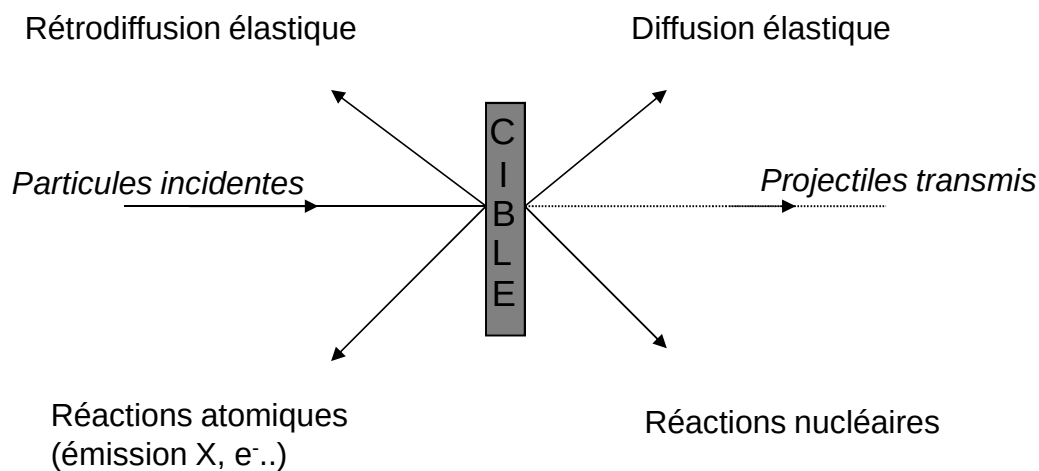


Figure 2 : Exemples d'effets induits par l'interaction de particules chargées avec la matière

Les travaux réalisés durant mon travail de thèse sont basés essentiellement sur les interactions d'ions, et plus particulièrement de protons (H^+), avec la matière vivante. Les protons sont par nature des particules chargées et peuvent interagir avec la matière de différentes manières. Sous l'effet des forces coulombiennes, ils interagissent avec les particules chargées présentes dans le matériau : les noyaux atomiques, et les électrons du cortège électronique.

Les protons peuvent donc ioniser les couches électroniques des atomes qu'ils rencontrent. Un photon X peut alors être émis après réarrangement du cortège électronique.

Lors de l'interaction avec le noyau atomique, les protons peuvent être diffusés élastiquement et lorsque leur énergie est suffisante pour traverser la barrière coulombienne du noyau, des réactions nucléaires peuvent apparaître.

Parmi les nombreuses techniques d'analyse basées sur l'interaction d'ions légers dans le domaine en énergie du MeV, certaines sont particulièrement bien adaptées aux tissus vivants. On peut citer les techniques d'analyses PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*), RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*) et STIM (*Scanning Transmission Ion Microscopy*). Leurs principes et leurs applications sont présentés dans le paragraphe suivant.

3. Techniques d'analyses issues des interactions ion - matière

3.1. La technique d'analyse PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*)

Les rayons X ont été découverts en 1895 par W. Röntgen à Würzburg en Allemagne. Pourtant, il a fallu attendre plus de 80 ans, avec le développement de détecteurs de rayonnement X à semi-conducteurs et la disponibilité de petits accélérateurs pour les employer à des fins d'analyse chimique. En 1970, S. Johansson pose les fondements d'une technique d'analyse qu'il dénomme PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*, littéralement Emission X Induite par des Particules). Il démontre ainsi que l'émission caractéristique du rayonnement X produit lors du bombardement d'un matériau par des protons de quelques MeV, peut être à la base d'une analyse élémentaire quantitative très sensible (Johansson, 1970 ; Johansson, 1988).

La méthode PIXE est basée sur l'ionisation des couches internes (K, L ou M) de l'atome cible par la particule chargée et sur la détection du rayonnement X produit lors du réarrangement électronique. L'électron éjecté laisse une lacune dans les couches électroniques profondes, le cortège électronique étant alors dans un état instable. Un électron d'une couche plus externe vient alors combler la case quantique laissée vacante par l'électron éjecté. Deux phénomènes peuvent se produire : (i) soit l'émission d'un photon, dans le domaine du rayonnement X: on parle alors de fluorescence X ; (ii) soit l'énergie excédentaire est communiquée à un électron périphérique qui est éjecté : on parle alors d'émission Auger.

L'énergie du photon X émis étant caractéristique de l'atome ionisé, il est alors possible d'en déduire l'élément concerné. Selon ce processus, on peut donc facilement remonter à la composition chimique d'un échantillon étudié à partir de l'analyse du spectre d'émission X

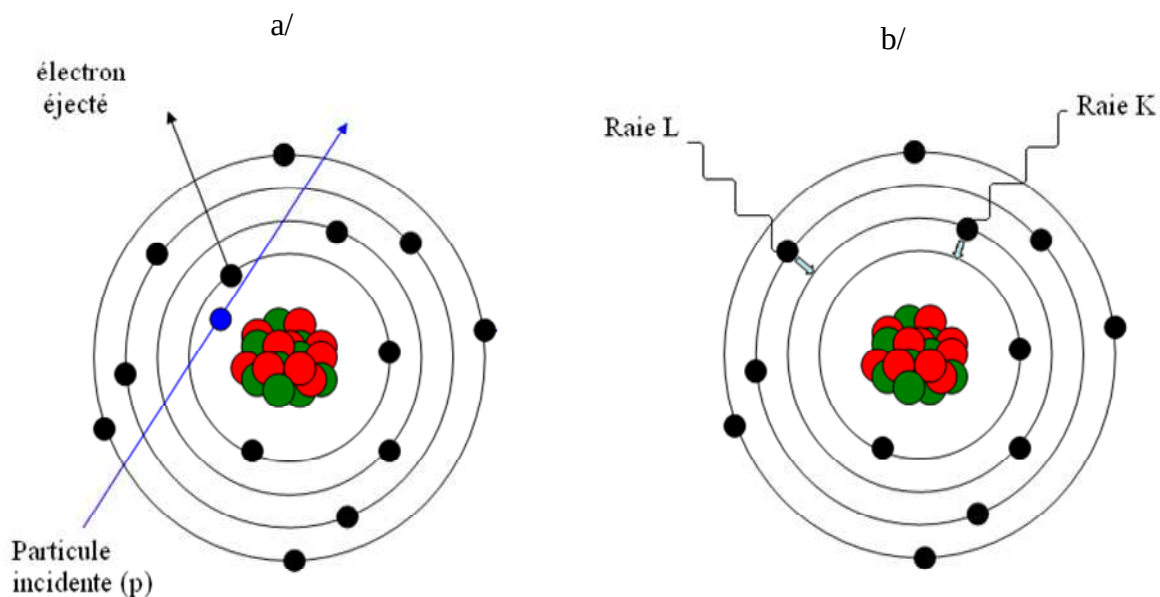


Figure 3 : **Principe de la technique PIXE** : a/ La particule incidente éjecte un électron des couches profondes du nuage électronique, laissant une case quantique vacante. b/ Un électron d'une couche électronique supérieure (K ou L) vient combler la case vacante, ce qui se traduit par l'émission d'un photon X caractéristique de l'élément.

Les analyses réalisées au cours de ce travail de thèse ont été réalisées avec un faisceau incident constitué de protons avec des énergies comprises entre 1 et 2,5 MeV, en fonction des besoins. Les photons X émis ont été mesurés par un détecteur semi-conducteur haute résolution de type Silicium-Lithium (Si-Li). L'énergie minimale des photons pouvant être mesurée par ce type de détecteur est de l'ordre de 1 keV. Par conséquent, la technique donne accès à tous les éléments dont le numéro de masse atomique est supérieur à 11 ($Z \geq 11$, Na), grâce à la détection de la raie K, la plus énergétique.

L'analyse par la méthode PIXE présente les avantages suivants :

C'est une technique qui est par essence non destructive dans la mesure où l'atome émetteur revient dans son état originel après l'émission X. Par ailleurs, le rendement de production de rayonnement X (ou section efficace) est relativement élevé et l'intensité de courant du faisceau nécessaire peut rester faible (de l'ordre de 100 pA), limitant ainsi l'énergie déposée dans l'échantillon. Une statistique suffisante peut alors être obtenue après 1 heure d'analyse pour faire une cartographie chimique sur une zone d'échantillon sélectionnée.

La technique PIXE permet une analyse multi-élémentaire : dans le mode de détection en dispersion d'énergie que nous avons utilisé, une vingtaine d'éléments peuvent être dosés au cours de la même analyse. Par ailleurs et malgré quelques variations de rendement de production X en fonction de l'élément émetteur, la plupart des éléments de la classification périodique sont accessibles.

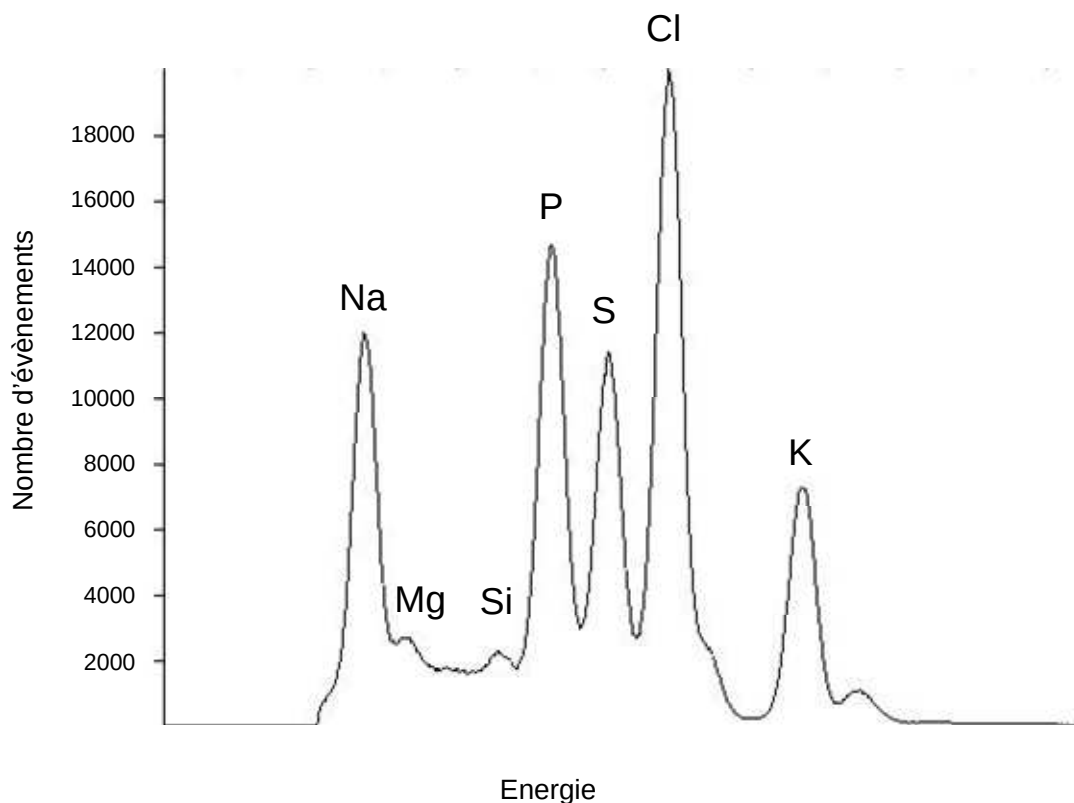


Figure 4 : **Caractère multiélémentaire de la technique PIXE.** Spectre de fluorescence X d'un échantillon de peau avec la détection de tous les éléments constitutifs de l'échantillon de numéro atomique supérieur à 11, soit à partir du Sodium.

Sensibilité de la technique. Comme l'intensité du bruit de fond continu (dûe essentiellement au rayonnement de freinage des électrons secondaires émis au cours de l'analyse) est très réduite, la méthode PIXE est d'une très bonne sensibilité (limite de détection pouvant atteindre la partie par million ou ppm). Elle est par conséquent bien adaptée au dosage des éléments présents à l'état de traces.

Enfin, cette technique peut être mise en œuvre avec un faisceau focalisé présentant une résolution spatiale de l'ordre du micromètre, ce qui permet d'obtenir des cartographies

chimiques en balayant le faisceau de particules chargées sur l'échantillon à la manière d'un microscope électronique.

3.2. La technique d'analyse RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)

La méthode d'analyse par diffusion Rutherford (RBS) est une des méthodes d'analyse par faisceau d'ions les plus utilisées en science des matériaux. Elle est basée sur l'étude de la diffusion élastique (conservation de l'énergie cinétique et de la quantité de mouvement du système projectile-cible) par interaction coulombienne entre le noyau du projectile et celui de l'atome cible. Cette méthode est basée sur la mesure de l'énergie et du nombre d'ions rétro-diffusés après interaction avec les noyaux des atomes de l'échantillon.

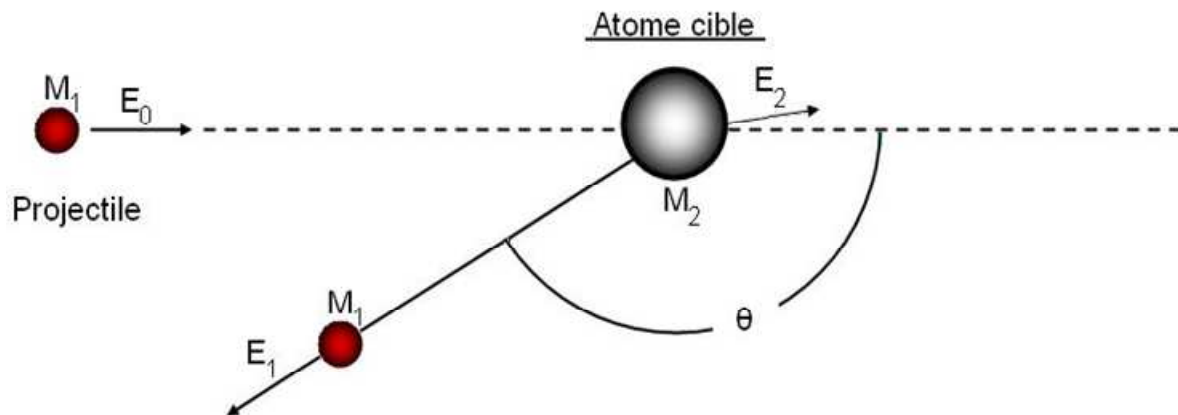


Figure 5 : **Principe de la technique RBS.** Une particule chargée de masse M_1 et d'énergie E_0 ressort d'un échantillon avec une masse M_1 et une énergie E_1 . L'atome cible rencontré est lui dévié avec une énergie E_2 sachant que $E_1 + E_2 = E_0$.

L'énergie des particules qui arrivent sur le détecteur à un angle donné va dépendre principalement de la perte d'énergie des particules selon les deux phénomènes suivants.

(i) Les particules perdent de l'énergie lors de leur passage dans l'échantillon, et ce aussi bien à l'aller avant diffusion qu'au retour lorsqu'elles émergent de ce même échantillon. La quantité d'énergie perdue le long de ce parcours dépend du pouvoir d'arrêt du matériau.

(ii) Au cours de la collision, une partie de l'énergie cinétique du projectile est cédée au noyau cible qui recule au cours du choc. Cette perte d'énergie dépend essentiellement des

masses de l'atome cible et du projectile incident. Le rapport entre l'énergie initiale et finale du projectile est appelé facteur cinématique.

Détermination de la masse de l'échantillon. La mesure de l'énergie de ces particules rétro-diffusées pour un angle de détection donné peut être ainsi directement reliée à la masse du noyau diffuseur. Il est donc possible de déterminer le nombre de masse A des noyaux cibles. En outre, la méthode d'analyse RBS est sensible à la topographie de l'échantillon. En particulier, une étude des constituants en fonction de la profondeur de l'échantillon est possible.

Détermination de l'épaisseur de la cible. Le spectre RBS contient intrinsèquement une information sur la distribution en profondeur des éléments constitutifs de la cible, du fait de la perte d'énergie de l'ion incident lors du trajet aller et de celle de l'ion diffusé lors du trajet retour. Cette perte d'énergie permet de calculer l'épaisseur traversée connaissant le pouvoir d'arrêt de l'ion dans le matériau étudié.

Les pouvoirs d'arrêt des particules légères telles que les protons sont bien connus et sont répertoriés pour chaque élément cible en fonction de l'énergie des projectiles. Ainsi la mesure de la perte d'énergie permet de connaître l'épaisseur de l'échantillon analysé avec une grande précision

3.3. Complémentarité des deux techniques

Les techniques d'analyses PIXE et RBS sont complémentaires car elles permettent d'obtenir des données quantitatives à la fois sur les éléments majoritaires du matériau organique analysé (C, N, O) et sur la composition chimique élémentaire de l'échantillon analysé (PIXE).

Le couplage de ces deux méthodes permet ainsi d'obtenir des données exprimées en termes de concentrations absolues sur l'ensemble des éléments présents dans l'échantillon.

Une troisième méthode vient compléter les techniques d'analyse PIXE et RBS. Il s'agit de la méthode STIM littéralement microscopie ionique en transmission. Elle permet d'obtenir des informations sur la structure de l'échantillon, et s'apparente à la technique de microscopie électronique à transmission.

3.4. La technique d'analyse STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) ou microscopie ionique en transmission

La méthode STIM est basée sur la mesure du ralentissement (ou perte d'énergie) des particules du faisceau. Cette perte d'énergie est directement reliée à la quantité de matière traversée. Ainsi, l'énergie résiduelle des ions transmis est mesurée par un détecteur à particules de type semi-conducteur placé à 0° (c'est-à-dire dans l'axe du faisceau).

Aux énergies utilisées, le ralentissement des ions (ou perte d'énergie) est essentiellement de nature électronique. La composition et la densité de l'échantillon jouent donc un rôle important car elles conditionnent le pouvoir d'arrêt du matériau. L'épaisseur de la cible analysée est limitée par le parcours des protons dans le matériau (une centaine de micromètres dans une coupe de tissu organique lyophilisé pour une énergie de 2 MeV).

La géométrie de détection utilisée nécessite l'utilisation de courants de faibles intensités, en général quelques centaines à un millier d'ions par seconde (courant inférieur au femto-ampère). La détection des particules chargées du faisceau présentant une efficacité de 100%, quelques minutes d'analyse suffisent pour obtenir une statistique suffisante.

La méthode STIM nous permet donc de cartographier avec précision les structures d'un échantillon biologique sans aucune dégradation de l'échantillon.

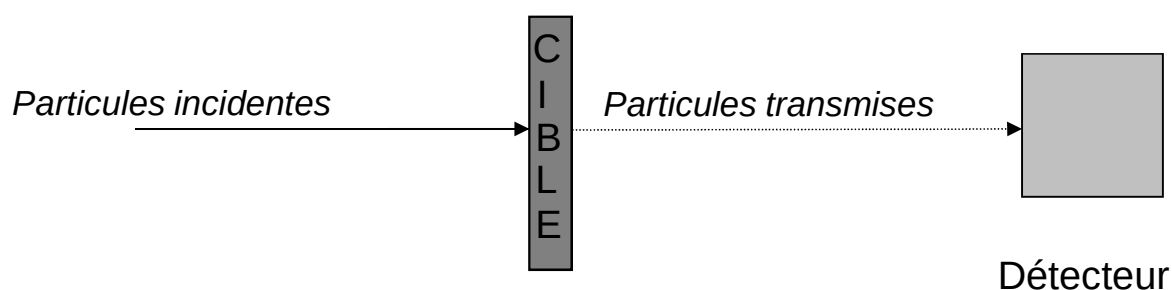


Figure 6 : **Principe de la technique STIM.** Les particules incidentes sont chargées et perdent de l'énergie en fonction de la densité du matériau traversé. Il est ainsi possible d'obtenir une image en densité de l'échantillon analysé.

4. Le Vivant, un matériau particulier

Les êtres vivants sont constitués d'organes eux même constitués de cellules, elles même composées d'organites cellulaires dont la structure et la fonction reposent sur des distributions protéiques, des compositions et des concentrations ioniques définies et contrôlées. Cette organisation biologique est complexe, hautement structurée et finement régulée et se retrouve aux échelles : tissulaire, cellulaire et sub-cellulaire. De plus, chaque tissu est différent et comporte des spécificités propres à ses fonctions, et ce au cours du développement et de la vie de l'organisme biologique.

Les êtres vivants sont constitués de macromolécules dont la localisation et les mouvements sont fonction de leurs interactions avec les biomolécules voisines. Ces interactions résultent avant tout des propriétés très spécifiques des molécules biologiques dont la complexité nous apparaît très grande, pour ne pas dire sans limite, si l'on considère que les protéines qui forment la trame de toutes cellules sont des molécules constituées, à elles seules, de milliers d'atomes.

A. Lavoisier a montré que les plantes et les animaux étaient composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Mais depuis, la liste des éléments constitutifs des êtres vivants s'est considérablement allongée. 11 éléments représentent à eux seuls plus de 99.9% de l'organisme entier : le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore, le chlore, le calcium, le magnésium, le potassium et le sodium. Il est aujourd'hui admis que dans tous les organismes existent de manière absolue et constante 28 corps dits « simples » : 13 métalloïdes et 15 métaux.

O	62.43 %	Cl	0.08 %	Al	0.001 %
C	21.15 %	Na	0.08 %	Si	0.001 %
H	9.86 %	Mg	0.027 %	Cu	0.0002 %
N	3.1 %	I	0.014 %	Mn	0.00005 %
Ca	1.9 %	F	0.009 %	Pb	0.00005 %
P	0.95 %	Fe	0.005 %	Se	0.00002 %
K	0.23 %	Zn	0.002 %	Co	0.000003 %
S	0.16 %	Br	0.002 %	Mo	0.0000005 %

Figure 7. **Composition chimique élémentaire du corps humain** (d'après Hack). La somme de tous les composants atteint 100%.

Les principales applications de la microanalyse nucléaire dans le champ de la biologie cellulaire concernent le métabolisme des éléments traces (Fe, Cu, Zn, Se..), la physiopathologie de l'équilibre minéral intracellulaire (Na, Mg, Cl, K, Ca) et la toxicologie des ions métalliques (Al, Hg, Pb...) (Lindh, 1990 ; Watt, 1993)

Les méthodes d'analyse par microfaisceau d'ions sont parmi les rares techniques qui permettent d'obtenir des données quantitatives sur les compositions élémentaires d'échantillons biologiques, avec une résolution atteignant le micromètre (μm). De plus, elles permettent une conservation de la structure bi-dimensionnelle du tissu analysé ainsi que la répartition des ions au sein de l'échantillon. Les ions ont un rôle majeur dans la physiologie humaine. En effet, et pour exemple, le calcium est considéré comme l'ion majeur dans les voies de transduction au sein des cellules. Le calcium joue notamment un rôle dans la fonction barrière cutanée avec une répartition sous forme de gradient au sein de l'épiderme. Il apparaît donc nécessaire de pouvoir étudier le métabolisme des ions dans des échantillons biologiques afin d'améliorer la compréhension du monde vivant.

L'analyse d'échantillons biologiques par microfaisceau d'ions nécessite une préparation relativement simple et non spécifique. Les échantillons une fois prélevés sont cryofixés puis déshydratés car l'analyse par microfaisceau d'ions se réalise sous vide. Ce protocole de cryofixation/lyophilisation permet de préserver la structure et la composition chimique élémentaire de l'échantillon biologique analysé. L'épaisseur des échantillons ne doit cependant pas dépasser quelques dizaines de microns afin de conserver les aspects quantitatifs de l'analyse (freinage des ions incidents dans le matériau). Des coupes sériées à l'aide d'un cryo-microtome permettent généralement d'obtenir des coupes fines, à très fines, des échantillons (de l'ordre de 10 à 20 μm d'épaisseur). Il est important au cours de cette procédure de ne pas altérer la structure de l'échantillon et d'éviter toute introduction de contaminants sous forme de résidus organiques (résines, Tissue Tek), métalliques (poussières,...).

5. Les différentes procédures d'analyse

D'une manière générale, les échantillons biologiques peuvent être analysés par un ensemble de techniques d'analyse et d'imagerie qui sont présentées, de manière non exhaustive, dans le paragraphe suivant. Les avantages de chaque technique sont présentés et discutés.

La microscopie en contraste de phase. Imaginé en 1930 par le Hollandais F. Zernike, le microscope en contraste de phase permet d'étudier des cellules vivantes, sans devoir leur infliger une coloration, et a valu à son concepteur le prix Nobel 1953. Alors que la microscopie en lumière ordinaire nous montre les différences de teintes de gris (de couleur) entre un objet et son milieu, la microscopie en contraste de phase transforme la différence de phase en intensité de gris permettant ainsi de voir des objets autrement invisibles. Un objet incolore et transparent d'indice de réfraction (n) et d'épaisseur (e) dans un milieu incolore et transparent d'indice de réfraction (n') est à peu près invisible en microscopie en lumière visible, sauf si le bord de l'objet produit une diffraction importante. Dans ces conditions, un rayon lumineux qui traverse l'objet suit un chemin différent de celui qui traverse uniquement le milieu on dit alors que l'objet a une différence de phase. Dans un microscope à contraste de phase, deux dispositifs, appelés anneaux de phase, sont placés l'un dans le condensateur (le système optique qui focalise la lumière sur l'objet) et l'autre dans l'objectif. Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.

La microscopie en épifluorescence et/ou confocale. Les techniques et les outils actuels autorisent aussi bien l'observation d'échantillons biologiques vivants ou fixés. Des mécanismes biologiques peuvent être suivis par l'intermédiaire de molécules fluorescentes spécifiques, soit naturellement (exemple lipofuscine) soit par le biais de fluorophores, ce qui limite en pratique le nombre de phénomènes pouvant être suivis simultanément.

Les méthodes spectroscopiques d'émission moléculaire (fluorescence, polarisation de fluorescence, phosphorescence, chimi- et bioluminescence), qui correspondent aux processus de désactivation des états excités, sont très largement utilisées aujourd'hui pour l'étude de milieux de complexités diverses (systèmes moléculaires organisés, milieux biologiques, polymères, etc.). Parmi les méthodes physiques d'investigation des milieux biologiques, la fluorescence, de par sa grande sensibilité d'analyse et ses résolutions (spectrale, spatiale, temporelle et d'orientation) offre des possibilités très intéressantes en biologie pour l'analyse de cellules ou de tissus. La microscopie de fluorescence présente l'avantage de s'affranchir de nombreuses contraintes liées à la fluorimétrie classique (concentration de la sonde, densité cellulaire faible, étude et visualisation à l'échelle cellulaire). De plus, il s'agit du seul moyen d'investigation actuel ayant une résolution spatiale suffisante pour préciser la distribution de

la sonde fluorescente, puisqu'il recueille les signaux de fluorescence émis au niveau local du lieu d'incorporation des sondes.

Au cours de la dernière décennie, les progrès technologiques ont permis de déplacer l'analyse globale d'un échantillon vers des volumes de plus en plus petits, via les techniques de microscopie (microscopie confocale) et ce jusqu'à atteindre pratiquement l'observation d'une molécule unique (corrélation de fluorescence). La mise en oeuvre récente de nouvelles méthodes en microscopie, reposant sur les propriétés non linéaires de la lumière, en particulier en mode multiphoton ouvre de nouvelles perspectives pour l'imagerie de la cellule vivante dans des conditions d'observation plus proches de la réalité physiologique.

Le principe du microscope à fluorescence est d'illuminer l'échantillon fluorescent à une longueur d'onde absorbée par le fluorochrome et de ne recueillir que la lumière correspondant à la fluorescence réémise, grâce à l'utilisation de filtres et de miroirs spécifiques. L'illumination de l'objet fluorescent dans son entier provient généralement d'une lampe à vapeur de mercure produisant la plupart des longueurs d'onde visibles. Cependant, les molécules de fluorochrome présentes en dehors du plan de mise au point sont également excitées et émettent de la lumière qui vient troubler l'image, diminuant ainsi le contraste et la résolution spatiale. Pour s'affranchir des problèmes d'interférences liés à cette lumière parasite associée au phénomène de diffraction, deux approches technologiques ont été développées sur la base (i) d'une configuration optique confocale particulière avant l'étape d'acquisition des images 2D de fluorescence (microscopie confocale à balayage laser en particulier) (ii) de la microscopie conventionnelle suivie d'une étape de traitement d'images par déconvolution (microscopie à sectionnement optique / déconvolution).

Parmi les méthodes de microscopie à sectionnement optique qui permettent l'observation d'une cellule entière par coupes optiques successives horizontales selon l'axe optique vertical, la Microscopie Confocale à Balayage Laser reste la technique de référence pour visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions fournissant des images de haute résolution, en éliminant la lumière parasite. L'illumination du spécimen par la lumière laser, ainsi que la détection du signal sont réduites à un point, grâce à l'utilisation de deux diaphragmes (champ et détecteur) de faible diamètre. Ces deux diaphragmes sont situés dans les plans confocaux c'est-à-dire qu'ils sont tous deux conjugués au plan de mise au point dans l'objet. Ainsi, la lumière émise hors du plan de mise au point n'atteint pas le détecteur et seuls les objets situés dans le plan de mise au point contribuent à la constitution de l'image. La géométrie de l'optique confocale trouve son avantage indéniable sur la microscopie de fluorescence conventionnelle en discriminant les plans en dehors du plan focal. Le diamètre de la zone

illuminée étant très petit ($0.3\ \mu\text{m}$), la constitution de l'image totale de l'objet nécessite de balayer le faisceau laser point par point sur l'objet. Le déplacement selon l'axe axial (z) est réalisé grâce à une platine motorisée (moteur pas à pas), faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées séries Z).

Un empilement par projection de sections optiques conduit à une image reconstruite en 3D, dont la résolution spatiale est limitée par la résolution (résolution maximale théorique $d = 0.61\ \lambda/\text{NA}$ avec NA l'ouverture numérique de la lentille de l'objectif et λ la longueur d'onde utilisée).

La microscopie électronique. Le premier prototype de microscope électronique a été construit en 1931 par les ingénieurs allemands E. Ruska et M. Knoll. Un microscope électronique utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon biologique et en créer une image avec des résolutions spatiales de l'ordre de 2 à 5 nm, sur des coupes d'échantillons ne dépassant pas 500 nm d'épaisseur. Cette méthode permet l'étude de la morphologie, de la structure et/ou de la composition d'organelles intracellulaires. Cependant les méthodes de préparation classiquement utilisées nécessitent une préparation spécifique des échantillons avec une phase de cryofixation, une phase de substitution et de solidification par des résines organiques. L'utilisation de résine a le grand désavantage d'apporter de la matière organique exogène à l'échantillon et peut également avoir un impact sur l'intégrité d'éléments sub-cellulaires ou sur la distribution de constituants élémentaires, tels que les ions.

L'analyse SIMS ou spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry). L'imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires est basée sur l'émission de particules secondaires, à partir des quelques premières couches d'atomes (1-2 nm) de la surface d'un échantillon solide, sous l'effet du bombardement par un faisceau d'ions primaires très énergétiques. Sous l'impact, les liaisons chimiques sont rompues et les atomes ou des combinaisons d'atomes sont libérés, soit sous forme neutre, soit sous forme chargée (ions). Ces ions peuvent être collectés et focalisés sous forme d'un faisceau secondaire jusqu'à l'entrée d'un spectromètre de masse où les ions vont alors être triés en fonction de leur rapport masse/charge. L'ensemble du système est maintenu sous ultra-vide (10^{-8} à 10^{-10} Torr). Le principal domaine d'applications de cette technique réside jusqu'à présent dans la microanalyse d'échantillons minéraux (géologie, métallurgie, science des semi-conducteurs,...).

Le Nanosims 50, qui constitue la dernière génération de microsonde ionique (Slodzian, 1992 ; Hillion, 1993), possède des atouts qui permettent d'envisager des applications biologiques jusque-là inaccessibles. Ce microscope est constitué d'une source d'ions primaires, d'un spectromètre de masse et d'un système de détection mais il présente les caractéristiques nécessaires à l'examen d'échantillons biologiques, à savoir : (i) une haute résolution latérale ($\leq 50\text{nm}$ en césium et $\leq 150\text{ nm}$ en oxygène), (ii) une détection parallèle de cinq images ioniques distinctes provenant d'un même micro-volume d'analyse et permettant une superposition parfaite des images et une mesure précise des rapports isotopiques, (iii) une excellente transmission des ions secondaires même à haut pouvoir séparateur en masse (60% à $M/\Delta M = 5000$), (iv) une possibilité d'observation optique de l'échantillon dans la chambre d'ionisation pour localiser les zones d'intérêt, (v) une compensation des charges pour les échantillons isolants (en mode "ions secondaires négatifs").

Cependant cette méthode relativement récente et originale reste peu utilisée en routine. Elle permet le dosage du contenu isotopique et élémentaire des échantillons étudiés par ablation progressive de la surface analysée, mais s'avère totalement destructive et nécessite de plus l'utilisation d'échantillons standards pour la normalisation des résultats.

L'analyse par rayonnement synchrotron. Elle donne des informations sur la composition interne de l'échantillon via l'analyse du spectre de fluorescence X, et permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de la centaine de nanomètres. Une microsonde par rayonnement synchrotron X est schématiquement constituée d'un faisceau incident de rayonnement X produit par une source de lumière synchrotron, et d'un système optique de focalisation des rayons X. Quatre types d'éléments optiques peuvent être employés pour la focalisation de rayons X durs (6-30 keV) : des lentilles diffractives (dites lentilles de Fresnel), des lentilles réfractives composées (Compound Refractive Lenses), des miroirs de focalisation en configuration type Kirkpatrick-Baez (KB) et des tubes capillaires en verre. La résolution spatiale varie entre 100 nm et quelques micromètres en fonction de l'énergie du rayonnement incident et des caractéristiques des optiques de focalisation.

La fluorescence X induite par rayonnement synchrotron (SXRF, Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence) est une méthode d'analyse non destructive parfaitement adaptée à la caractérisation qualitative et quantitative d'éléments chimiques en faible teneur (sensibilité 10^{-17} g). Le haut flux et la faible divergence du rayonnement synchrotron peuvent être exploités en réduisant la taille du faisceau à des dimensions (sub)micrométriques pour l'imagerie à haute résolution spatiale. En outre, l'absorption des photons X par un élément

chimique donne lieu aux techniques spectroscopiques EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) et XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*). La spectroscopie XANES permet la caractérisation des états d'oxydation des éléments. De plus, le rayonnement synchrotron peut être utilisé directement sur des cellules hydratées mais cryofixées.

Cependant la complexité et les difficultés d'accès à ce type d'expériences limitent ses applications à des études en routine et sur le long terme. Seules des études très pointues et très spécifiques peuvent être réalisées sur ce type de dispositif. (Ortega, 2005)

La microanalyse nucléaire (ou analyse par faisceau d'ions) présente de fortes analogies avec les techniques par rayonnement synchrotron. L'étude de la perte en énergie des ions transmis (STIM : *Scanning Transmission Ion Microscopy*) donne accès d'une façon directe à une image en densité de l'échantillon. La technique RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*) donne accès quant à elle à la masse organique de l'échantillon analysé. Associée à une technique d'émission de rayonnement X (PIXE : *Particle Induced X-ray Emission*) les intensités de fluorescence peuvent être ainsi normalisées afin d'obtenir des concentrations en $\mu\text{g/g}$, et ce d'une façon directe, sans l'intermédiaire d'étalons. L'aspect multi-élémentaire et la sensibilité (de l'ordre du $\mu\text{g/g}$) de la technique PIXE se présentent comme des avantages certains. Du point de vue de la préparation des échantillons, bien que l'analyse sous vide interdise l'utilisation d'échantillons biologiques hydratés, ceux-ci peuvent être traités par cryofixation puis lyophilisation, ce qui permet de préserver l'intégralité de leur structure à l'échelle microscopique. L'épaisseur des échantillons est notamment limitée par le parcours des protons dans la matière, soit quelques centaines de micromètres d'épaisseur pour des amas cellulaires déshydratés.

II Microfaisceau d'ions

Afin d'étudier des matériaux biologiques, il s'avère nécessaire d'obtenir des résolutions submicroniques. C'est pourquoi l'utilisation du microfaisceau s'avère d'un intérêt particulier.

1. Les microfaisceaux

Comme son nom l'indique, un microfaisceau d'ions est un faisceau de particules chargées focalisé pouvant atteindre une taille de l'ordre du micromètre.

Les ions sont générés par une source puis accélérés grâce à un accélérateur de particules. Par la suite, l'application de systèmes de collimation, focalisation, sélection d'énergie permettra d'obtenir un faisceau d'une taille de 1 μm qui sera balayé sur l'échantillon à analyser.

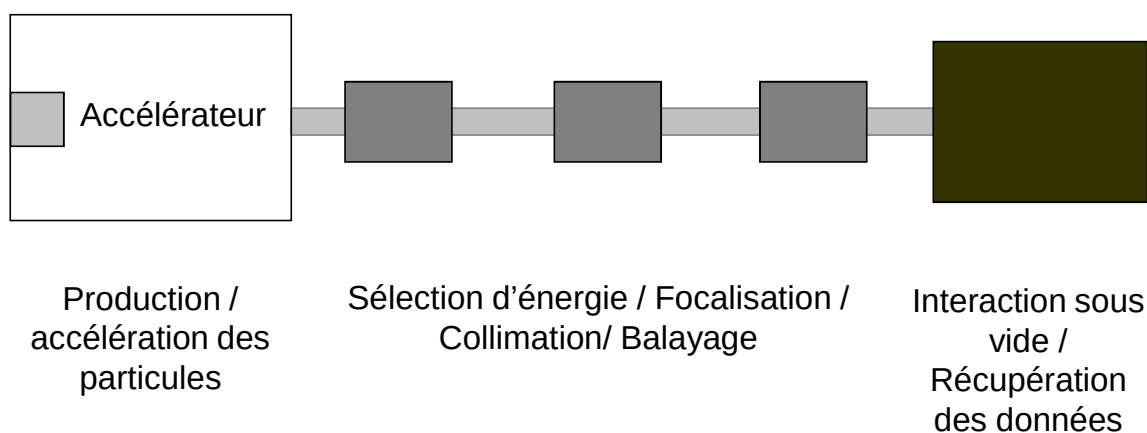


Figure 8 : *Principe de fonctionnement d'un microfaisceau d'ions.*

La première ligne microfaisceau focalisée a été développée à Harwell, Royaume-Uni, en 1972 (Cooxson, 1972). Le faisceau de proton était alors focalisé à une échelle de 4 μm à l'aide de lentilles quadrupolaires magnétiques.

Depuis, un grand nombre de laboratoires se sont équipés de microfaisceaux d'ions et il en existe aujourd'hui plus d'une soixantaine dans le monde. Dans la majorité des cas, les faisceaux incidents de particules chargées, généralement des protons de 1 à 3,5 MeV, sont produits par de petits accélérateurs (accélérateurs électrostatiques). Parmi ces installations, seules quelques unes sont utilisées pour la recherche biomédicale comme c'est le cas au CENBG auprès de la plateforme AIFIRA.

2. La ligne microfaisceau AIFIRA

Le dispositif du CENBG présente un faisceau de particules focalisé qui permet de réaliser des analyses par faisceau d'ion et de l'imagerie d'élément chimique à l'échelle micrométrique

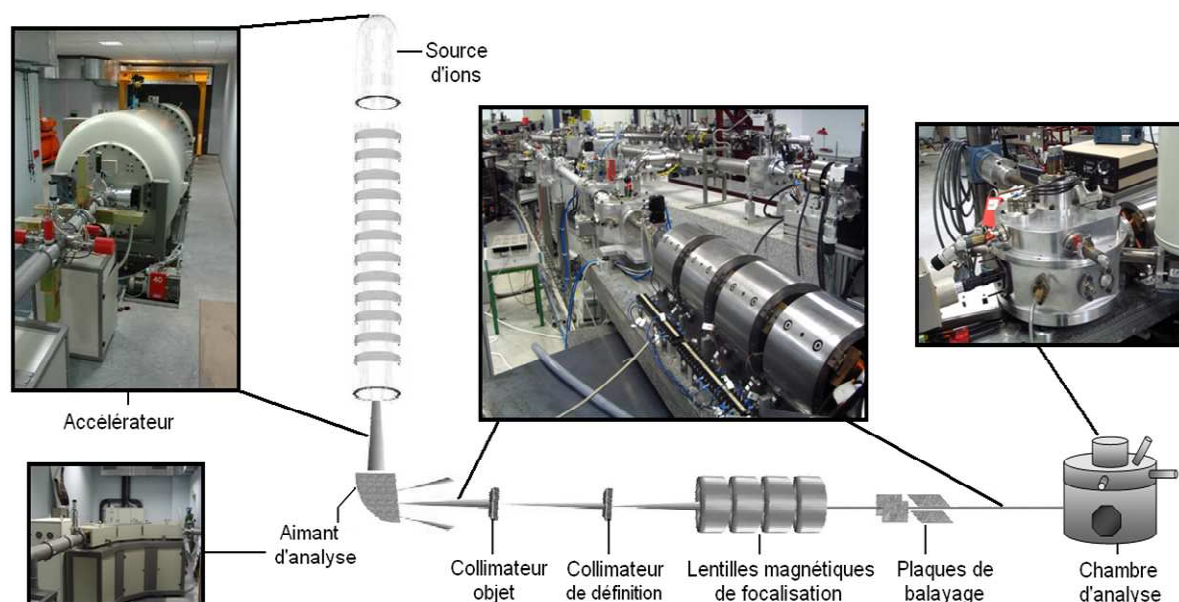


Figure 9 : *L'accélérateur de la plateforme AIFIRA.*

2.1. L'accélérateur SINGLETRON de la plateforme AIFIRA

L'accélérateur disponible sur la plateforme AIFIRA est de type *Singletron*TM 3.5 MV, une machine électrostatique simple étage fournie par le constructeur HVEE (*The Netherlands*). Cet accélérateur développé pour des applications nécessitant une très grande stabilité en énergie associée à des brillances de faisceau élevées est particulièrement adapté à l'obtention de micro- ou nano- faisceau. La brillance permet en effet de collimater fortement ces faisceaux tout en gardant des flux de particules importants. La stabilité en énergie quant à elle permet de limiter les aberrations dans les optiques de focalisations.

L'accélérateur installé est équipé d'un générateur de tension purement électronique (de type Cockroft-Walton) qui permet d'atteindre une résolution $\Delta E/E$ de l'ordre de 2.10^{-5} , ce qui se fait, actuellement, de mieux dans le domaine. Une source d'ions de type RF optimisée en termes de « faisceaologie » produit les ions H^+ (protons), D^+ (deutons) et He^+ (hélium). Après accélération, la gamme en énergie accessible s'étend de 0,3 à 3,5 MeV. La machine est

horizontale et la ligne primaire, constituée d'un aimant d'analyse ainsi que d'un aimant de commutation, permet d'injecter le faisceau de particules dans la ligne de faisceau d'intérêt.

2.2. Dispositif de focalisation

A la sortie de l'aimant d'analyse, le microfaisceau d'ions est réduit à une taille micrométrique grâce à la combinaison de dispositifs de collimation et de focalisation.

Le système de focalisation présente des caractéristiques similaires à celles d'un système optique centré. Quatre lentilles quadrupôlaires magnétiques couplées deux à deux en un quadruplet de type Dymnikov (Dymnikov, 1965) donnent l'image d'un collimateur objet situé 5.4 m en amont sur la ligne. L'intérêt majeur de ce type de configuration pour les lentilles focalisantes (appelé système orthomorphique) est de présenter une symétrie cylindrique avec des facteurs de grandissement égaux dans les plans horizontal et vertical. L'utilisation de collimateurs objets circulaires permet donc d'obtenir une forme de faisceau circulaire sur cible. La divergence angulaire du faisceau est limitée à l'entrée des lentilles focalisantes par un diaphragme d'ouverture. Différentes ouvertures sont accessibles permettant de limiter les aberrations optiques dues aux particules pénétrant dans les lentilles magnétiques loin de l'axe. L'ensemble du dispositif de focalisation (lentilles + diaphragme) est supporté par un banc optique en granit massif afin de limiter les vibrations mécaniques parasites pouvant affecter la résolution spatiale du faisceau.

Le facteur de grandissement de la microsonde du CENBG est de 1 :10. Les collimateurs objets couramment utilisés ont un diamètre variant de 5 à 50 μm ce qui permet d'obtenir (en se limitant au premier ordre d'aberrations) des tailles de faisceaux comprises entre 0.5 et 5 μm dans le plan focal.

Depuis le transfert de l'activité sur la plateforme AIFIRA, les performances du dispositif ont été améliorées en termes de résolution spatiale, d'intensité de faisceau, de stabilité dans le temps et de fiabilité. Cela est non seulement dû à l'accélérateur lui-même, mais également à la structure du bâtiment spécialement étudiée pour éviter toute perturbation extérieure en termes de vibrations mécaniques ou de contrainte thermique. Les lignes de faisceau focalisées (la microsonde ainsi que la future nanosonde) sont en effet placées sur une dalle très rigide et massive de 200 tonnes montée sur des pieux ancrés à 18 mètres de profondeur sur le substratum : elles sont ainsi mécaniquement isolées du reste du bâtiment.

2.3. La chambre d'analyse sous vide

En configuration analyse et cartographie chimique, les échantillons à analyser sont placés dans une chambre d'analyse sous vide. Cette enceinte se situe dans la partie terminale de la ligne microfaisceau et est équipée de différents détecteurs (particules, photons X).

Deux microscopes optiques permettent de visualiser l'échantillon : l'un, en transmission, présente un fort grandissement ($\times 100$) et est couplé à une caméra haute sensibilité ; l'autre en visualisant l'échantillon par l'avant, permet d'effectuer un positionnement précis. La position et la forme du faisceau peuvent être visualisées en temps réel en positionnant un scintillateur mince (CaF₂) dans le plan de focalisation des lentilles magnétiques.

Selon la technique utilisée pour l'analyse, différentes configurations des détecteurs sont possibles. Ainsi, pour les analyses couplées PIXE / RBS, deux détecteurs sont utilisés : une jonction Si(Li) pour détecter les photons X et un détecteur en Silicium implanté pour la détection des particules rétrodiffusées. Il est également possible d'effectuer des images en densité de l'échantillon par microscopie ionique en transmission (STIM) grâce à un détecteur en Silicium implanté, placé dans l'axe du faisceau, derrière l'échantillon (Moretto, 1996).

2.4. Acquisition des données

L'acquisition est une procédure qui gère quatre tâches différentes : le contrôle du balayage, la collecte des données, leur mise en forme en ligne et enfin leur mémorisation.

Les données stockées en fin d'acquisition sont (i) les énergies de diffusion des particules et l'énergie des photons X détectés, (ii) pour chaque évènement détecté (particule ou photon X) la position du faisceau lors de l'impact sur la cible (ou échantillon analysé)

2.4.1. Le système de balayage

Le balayage de la cible (échantillon) se fait point par point en suivant une succession de lignes horizontales. En partant d'un point d'origine (x_0, y_0), le faisceau va parcourir la cible de ligne en ligne avec un balayage en « zig-zag ». La distance séparant 2 points d'une même ligne ou d'une même colonne est appelée pas. Le nombre et la valeur des pas sont fixés lorsque

l'expérimentateur détermine les dimensions de la zone à analyser (de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ à $2 \times 2 \text{ mm}^2$). Le nombre maximal de pas est fixé arbitrairement à 128.

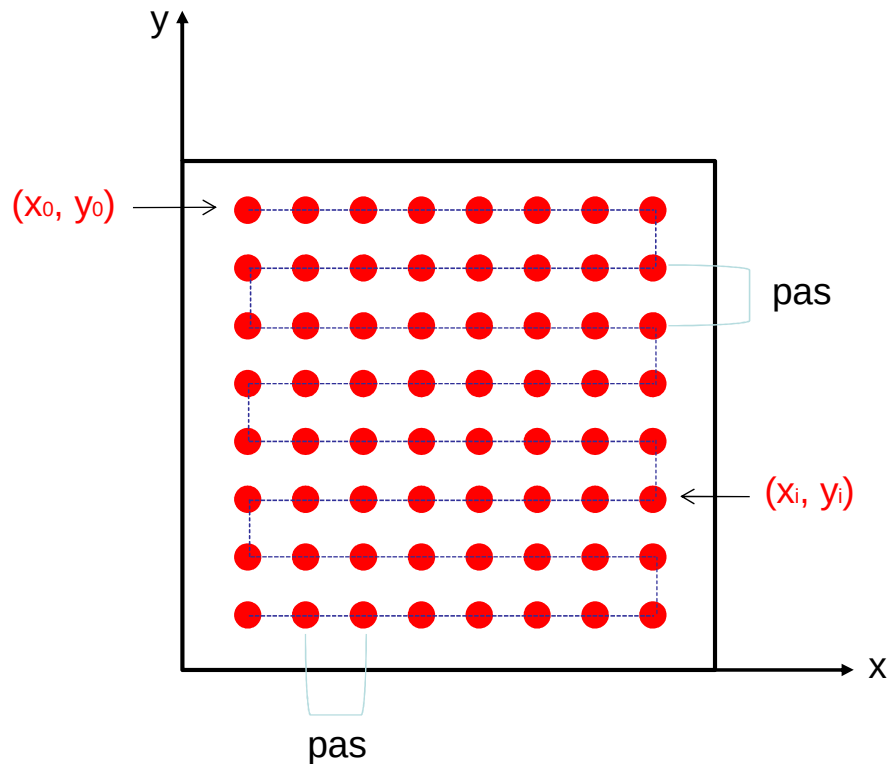


Figure 10 : **Principe de balayage du microfaisceau sur l'échantillon.**

Pendant le balayage du faisceau et pour chaque point d'impact de ce faisceau, les énergies de diffusion et des photons X ainsi que la position du faisceau, caractérisée par un couple (x, y) , sont mémorisées événement par événement sous forme d'un fichier « liste » (E_e, x, y) . Ces données peuvent être traitées de deux façons différentes : soit en fonction des énergies ce qui permet d'obtenir les spectres en énergie PIXE et RBS, soit en fonction du couple (x, y) ce qui permet alors de construire les cartographies élémentaires (matrices bidimensionnelles) où le nombre d'événements point par point est représenté par une échelle de couleur.

Une vitesse de balayage rapide permet d'éviter aux cibles biologiques de subir des dommages sous l'impact du faisceau d'ions dus à une augmentation de la température de la zone irradiée. (Llabador, 1990)

2.4.2. L'acquisition des données

L'ensemble des événements détectés $(E_{\text{diffusion}}, E_x, x, y)$ au cours de l'analyse est stocké sur la mémoire de masse du système sous forme de fichiers. Après l'acquisition, ces fichiers

peuvent être retraités afin d'obtenir des résultats quantitatifs. Au cours de chaque analyse, il est possible de suivre l'évolution des spectres PIXE et RBS ainsi que la construction de quatre cartographies élémentaires. Pour cela, à la fin de chaque balayage, tous les événements qui se sont produits sont triés en énergie ou en position de façon à incrémenter les spectres et les cartographies. Ainsi, le rafraîchissement des spectres et des cartographies se fait après chaque balayage.

2.5. Traitement des spectres X

Le programme Gupix a été mis au point à l'université de Guelph au Canada (Campbell, 2000). Les spectres de fluorescence X sont traités selon trois étapes successives qui permettent: (i) l'identification des raies X caractéristiques sur le spectre ; (ii) la simulation du spectre expérimental ; (iii) la détermination de la concentration (en masse surfacique) des différents éléments constitutifs de l'échantillon.

2.5.1. Identification des « pics »

Après l'acquisition des données expérimentales, les spectres de raies X dont nous disposons sont exprimés en nombre d'évènements (nombre de photons X détectés) par canal. Les spectres sont codés sur 1024 canaux, chaque canal correspondant à un intervalle d'énergie donné. Un simple étalonnage permet d'exprimer les spectres en fonction de l'énergie des photons X.

2.5.2. Calcul des concentrations dans le cas de cibles minces

Dans le cas d'une cible mince, il est possible de calculer la surface A_n d'un pic sur le spectre, correspondant à une raie particulière d'un élément n donné. Pour un nombre de particules incidentes défini par Q/e et une masse surfacique Ma (en g/cm^2) de l'élément recherché dans la cible :

$$A_n = \varepsilon_z \frac{Q}{E} \frac{\Omega}{4\pi} \sigma_z \frac{A_0}{A_z}$$

Où

ε_z est l'efficacité de détection pour le rayonnement détecté

Q est la charge mesurée en Coulomb

E la charge de l'électron en Coulomb

Ω l'angle solide de détection en stéradians

σ_z la section efficace de production de la raie X considérée (en cm^2)

A_0 le nombre d'Avogadro

A_z le nombre de masse de l'élément n

En pratique, la surface de la raie X considérée est mesurée, ce qui permet de déduire de la relation ci-dessus la masse surfacique de l'élément recherché.

2.6. Traitement des spectres RBS

Le programme RUMPIN fonctionne de manière itérative. Il permet d'ajuster au spectre expérimental la simulation du spectre en énergie des particules diffusées dans un échantillon d'épaisseur hétérogène (Moretto, 1995). L'ajustement spectre simulé/spectre expérimental n'est pas totalement automatique comme pour le programme GUPIX. En effet, l'expérimentateur peut ré-ajuster les deux spectres en faisant varier des paramètres tels que l'épaisseur de l'échantillon, la stœchiométrie des constituants élémentaires,.... L'épaisseur de la cible ainsi que la stœchiométrie des principaux constituants (essentiellement C, H, N, O pour une cible biologique) permettent de déterminer la masse moyenne de la matrice organique. Cette masse est exprimée en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Les facteurs de correction permettant de tenir compte de l'auto-atténuation du rayonnement X dans la cible elle-même ainsi que des sections efficaces d'ionisation en fonction du ralentissement des particules incidentes sont calculés.

2.7. Construction des cartographies élémentaires

La construction des cartographies élémentaires est essentielle dans ce type d'analyse. Elle nous permet par exemple de distinguer différentes couches de l'épiderme (comme les couches cornées ou couches vivantes)

Ces constructions commencent par le choix de l'élément dont nous désirons connaître la répartition. Pour les éléments du sodium au calcium, les cartographies sont réalisées à partir des spectres PIXE. Pour le carbone, l'azote ou l'oxygène, les cartographies seront réalisées à

partir des spectres RBS. Comme précisé précédemment, nous disposons en fin d'acquisition des fichiers « listes » dans lesquels sont mémorisés événement par événement l'énergie de diffusion, l'énergie des photons X et la position du faisceau à chaque point d'impact. Un programme de traitement permet de trier ces données de la façon suivante. L'expérimentateur choisit une gamme d'énergie (ou plus simplement un pic sur l'un des spectres). Dans cet intervalle d'énergie, le nombre d'événements détectés (par exemple le nombre de photons X) pour chaque point d'impact du faisceau est répertorié. La représentation de ce nombre d'événements détectés point par point permet d'obtenir les cartographies élémentaires. Une échelle de couleur accompagne chacune de ces matrices. Elle traduit le nombre d'événements détectés, nombre augmentant du blanc vers le jaune.

1. Choix de la raie caractéristique du phosphore

2. Tri des photons X détectés dans cette gamme d'énergie en fonction des paramètres (x, y) coordonnées du point d'impact du faisceau)

3. Construction de la matrice correspondante

4. Cartographie du phosphore mettant en évidence la couche vivante de l'épiderme.

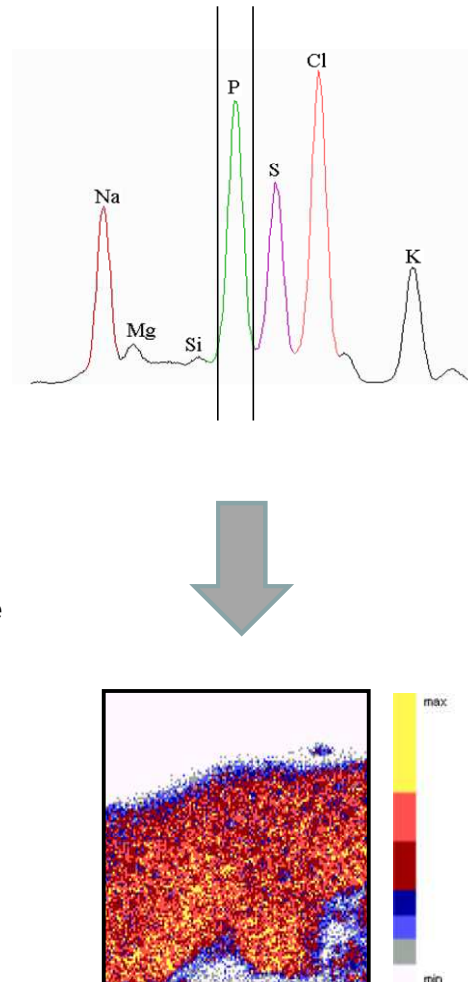


Figure 11 : *Obtention d'une cartographie élémentaire à partir d'un spectre X.*

2.8. Les spectres locaux

Afin de déterminer la concentration en minéraux dans des zones d'intérêt des échantillons analysés il est nécessaire de construire des spectres locaux ou « spectres par zones ». Il est nécessaire de (i) repérer la région présentant un intérêt particulier : les cartographies élémentaires permettent de visualiser la structure de la cible et donc de délimiter une zone spécifique, (ii) construire les spectres PIXE et RBS de la région choisie. Un programme de traitement permet d'effectuer un tri en énergie : connaissant les coordonnées de la région d'intérêt, il suffit alors d'exclure tout événement extérieur à cette zone pour construire les spectres PIXE et RBS locaux, (iii) calculer la concentration moyenne en minéraux dans les différentes zones sélectionnées.

Ces techniques seront bientôt transposables sur une ligne nano-faisceau en phase de test au CENBG. Grâce à cette nanosonde nucléaire, nous pourrions descendre à des résolutions pouvant atteindre 200 nm en PIXE et 100 nm en STIM et donc avoir des informations plus précises sur le comportement des ions dans des échantillons biologiques d'intérêt.

III. L'apport des microfaisceaux à l'étude de tissus biologiques complexes : L'exemple de la peau

1. La Peau- Définition – Présentation générale

La peau est un tissu extrêmement vascularisé et possède également en grand nombre des glandes sudoripares (production de sueur), des glandes sébacées (sécrétion du sébum) et de nombreux récepteurs nerveux participant aux sensations tactiles et à la détection de la pression. Cette « couverture » est à la fois souple et résistante et permet de protéger l'organisme contre les agressions extérieures (infections, écarts de température, etc...), rayonnements (UV, ionisants), agents chimiques,...

La peau est le plus visible des systèmes de l'organisme, celui qui détermine l'image du soi. Par son poids et sa surface, elle est également le plus lourd et le plus étendu des organes du corps humain. Chez l'adulte, sa surface représente environ 2 m² et son poids, 4,5 à 5 kg soit 16 % du poids corporel.

De fait, la peau a depuis toujours été l'objet de nombreuses mises en scènes rituelles chargées de la protéger, de la soigner, de la distinguer. Parée, réparée, déformée, parfumée, caressée, tatouée, percée, scarifiée, malade...la peau s'exprime, reflète nos humeurs et s'érige donc en un messenger social d'importance. Elle peut jouer dans ce cas un rôle de distinction sociale avec les tatouages mais peut également engendrer des comportements sociaux positifs (liens sociaux, reconnaissance tribales) et à l'inverse néfastes comme la genèse du racisme. Au cours de l'histoire, il apparaîtra également que les distinctions sociales basées sur l'apparence vont évoluer avec notamment l'association des peaux bronzées à la pauvreté au Moyen-Age (opposition des peaux blanches des nobles de sang royal aux peaux burinées des serfs et des vilains). Au XXI^{ème} siècle, l'apparence « bronzée » illustre généralement les réussites sociales, professionnelles, personnelles,...

« Il faut savoir que sur la face des hommes il se produit parfois chez les riches et chez les nobles citoyens lassifs des laideurs guérissables lucratives, dont les cultivateurs ou paysans ne s'inquiètent guère » Citation de Henri de Mondeville (médecin français, chirurgien des rois de France Philippe le Bel et de Louis le Hutin), tirée de son traité de chirurgie consacré à l'anatomie et aux traitements connus de son temps (XIV^{ème} siècle.)

La peau proprement dite est composée de différents compartiments qui s'unissent pour assurer des fonctions précises. Elle peut être associée à des composants annexes pour former ce que l'on appelle le système tégumentaire (*tegumentum* = couverture). Ces composants annexes sont les poils, les ongles, différentes glandes, des muscles et des nerfs. Bien qu'elle soit présente sur l'ensemble du corps humain, sa répartition n'est pas tout à fait homogène. En effet, son épaisseur varie en fonction de la localisation; ainsi, les zones sujettes à frottements constants tels que les paumes des mains et les talons seront plus épaisses pour protéger l'organisme. Ainsi, cette fine enveloppe a une épaisseur qui va varier de 1,5 à 4 mm chez l'homme.

2. La peau – Structurale

La peau se définit comme l'ensemble des cellules regroupées sous forme d'un tissu résistant et souple, constitué de plusieurs couches et recouvrant l'ensemble du corps. La peau est constituée de trois compartiments distincts d'origine embryologique différente : l'épiderme (d'origine ectodermique), le derme et l'hypoderme (d'origine mésodermique) (Kanitakis, 1995). De manière succincte, le rôle principal de l'épiderme (*epi* = dessus) peut se résumer à un rôle de protection du corps. Le derme quant à lui a un rôle « nourricier » au travers de nombreux vaisseaux sanguins qui le constituent et qui permettent la diffusion des nutriments vers l'épiderme.

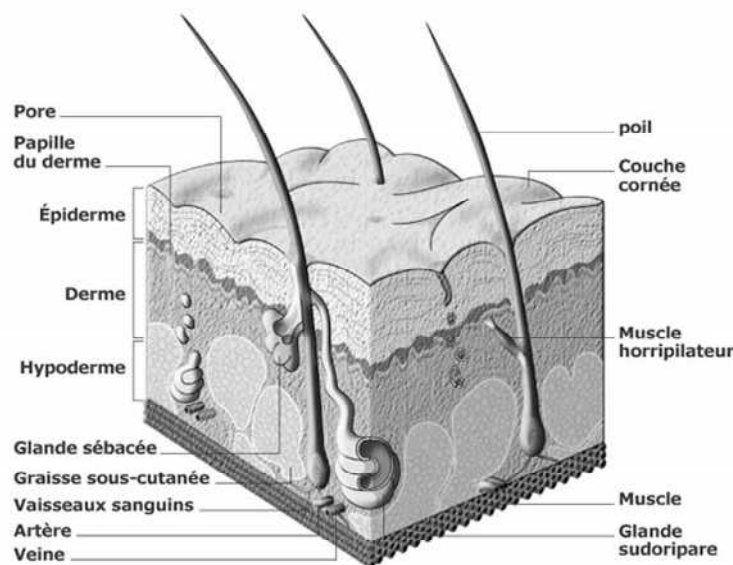


Figure 12 : *Schéma représentatif de la structure de la peau.*

2.1. Hypoderme

L'hypoderme est un tissu sous-cutané conjonctif lâche, richement vascularisé et innervé. Il est constitué de lobules adipeux séparés par des travées conjonctives. Les lobules contiennent des adipocytes, riches en triglycérides et en acides gras. On retrouve aussi dans l'hypoderme des fibroblastes, des dendrocytes, et des mastocytes ainsi que la partie profonde des annexes dermo-épidermiques (glandes sudoripares et follicules pileux). Ce tissu joue un rôle de réserve énergétique, de protection mécanique et thermique (Kanitakis, 1995). Il a été récemment décrit aussi comme développant des mécanismes immunologiques capables de réguler ses propres fonctions lorsqu'elles sont altérées (Caspar-Bauguil, 2005) et comme étant un potentiel réservoir de cellules souches (McIntosh, 2006).

2.2. Derme

Le derme, d'épaisseur très variable selon les régions du corps, est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique. Il est composé de cellules, essentiellement des fibroblastes, et d'une matrice extracellulaire constituée de molécules fibreuses (collagène et élastine) baignant dans une substance amorphe nommée substance fondamentale (glycoprotéines de structure, protéoglycanes et glycosaminoglycanes). Le derme joue un rôle fondamental dans le développement et la croissance de l'épiderme (Coulomb, 1989) ainsi que dans sa différenciation (Le Panse, 1996). Les fibroblastes sont des cellules fusiformes et mobiles grâce à leur cytosquelette développé, contenant des filaments intermédiaires de vimentine. Ce sont des cellules fondamentales du derme qui assurent sa synthèse en sécrétant les macromolécules citées ci-dessus, mais aussi des enzymes telles que les collagénases et les gélatinases (« *matrix metalloproteinases* » MMPs) ainsi que les inhibiteurs de ces enzymes, les « *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases* » (TIMPs). Ils assurent alors l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire.

Le derme s'organise en deux couches : (i) le derme papillaire ou superficiel est un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les crêtes de l'épiderme, formant ainsi les papilles dermiques. Il est composé de collagène de type III et VII et de fines fibres élastiques. Cette matrice est relativement riche en cellules (fibroblastes, mastocytes et dendrocytes) et sert de support aux fibres nerveuses ainsi qu'aux capillaires sanguins et lymphatiques qui constituent un véritable tissu nourricier pour l'épiderme ; (ii) le derme réticulaire ou profond se

différencie le derme papillaire par un tissu conjonctif dense, principalement constitué de collagène de type I et de fibres d'élastine. Cette partie du derme contient peu de substance fondamentale et de cellules conjonctives. Le derme héberge aussi les annexes dermo-épidermiques (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares) ainsi que les cellules endothéliales qui participent à la formation des vaisseaux. Le derme contient un important réseau vasculaire assurant la nutrition de l'épiderme et des nerfs permettant les perceptions cutanées.

2.3. Epiderme

L'épiderme, comme les divers épithéliums qui tapissent les voies digestives, est un tissu particulièrement exposé aux atteintes physiques, chimiques ou microbiennes du monde extérieur. Il assure à l'organisme une barrière protectrice grâce à l'élimination progressive de ses parties les plus superficielles, perte compensée par un renouvellement cellulaire continu à partir de cellules souches et évitent la déshydratation de l'organisme.

L'épiderme, épithélium pluristratifié, kératinisé et avascularisé est un système dynamique et organisé, en renouvellement constant. Les principales cellules qui le composent sont les kératinocytes (mot issu de kera signifiant corne). Cette dénomination englobe les différents stades de différenciation cellulaire qui composent l'épiderme. Les kératinocytes fabriquent la kératine. Toutes les cellules de l'épiderme sont reliées entre elles par des structures : les desmosomes. Au fur et à mesure que des kératinocytes progressent vers la surface de la peau (poussés par des cellules plus jeunes situées en dessous), ils fabriquent de la kératine molle qui est leur constituant essentiel. Arrivés en surface, et parfois même avant, les kératinocytes meurent en desquamant. De cette façon, l'épiderme est constamment renouvelé tous les 25 à 40 jours.

Les mélanocytes, présents dans l'épiderme, fabriquent un pigment, la mélanine (melas = noir). Cette variété de cellules se situe plus profondément dans l'épiderme, mais reste néanmoins en contact avec les kératinocytes qui intègrent progressivement la mélanine fabriquée par les mélanocytes. Les pigments de mélanine ainsi absorbés protègent notamment l'ADN des cellules épithéliales contre les effets délétères des rayonnements solaires (ultraviolets A, B et C). D'autres variétés de cellules présentes dans l'épiderme servent essentiellement à la défense de l'organisme (cellules circulantes du système immunitaire).

Enfin, une dernière variété de cellules, les épithélioïdocytes, semble jouer un rôle dans le toucher. Elles sont situées à la jonction entre l'épiderme et le derme.

L'épiderme est lui-même constitué de plusieurs couches, de la profondeur à la superficie:

2.3.1. La couche basale (*stratum basale* ou *stratum germinativum*)

Composée d'une seule assise cellulaire, c'est la couche la plus profonde de l'épiderme, également appelée couche germinative. Elle pourvoit, comme son nom l'indique, au renouvellement cellulaire des couches superficielles. Les cellules basales situées dans la partie la plus profonde de l'épiderme sont séparées du tissu conjonctif du derme sous jacent par une lame basale qu'elles produisent et qui ancre l'épiderme au derme. Ces cellules basales, par leurs mitoses asymétriques, assurent à la fois leur renouvellement et la formation d'autres cellules basales, les cellules à amplification transitoire. Ces cellules à amplification transitoire restent dans la couche basale où elles subissent un nombre limité de divisions, puis s'orientent vers la surface de l'épiderme : sous l'influence de différents stimuli et de facteurs de croissance, elles se différencient en kératinocytes représentés tout d'abord par les cellules épineuses.

2.3.2. La couche épineuse (*stratum spinosum*)

Située au dessus de la couche basale, la strate épineuse comprend un nombre de couches variable selon le type de peau et les régions du corps. Les kératinocytes de l'épineuse renferment déjà des faisceaux de filaments de kératines insérés sur des desmosomes, qui, formant des petites épines à la surface des cellules, contribuent à lier les cellules entre elles.

La couche épineuse, composée de cellules contient de la mélanine dispersée dans les kératinocytes : cet étage de l'épiderme constitue un début de résistance aux mouvements de la peau.

2.3.3. La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

Les cellules épineuses acquièrent, dans la couche tissulaire sus-jacente, des granules de kératohyaline, substance qui renforce les liaisons entre les filaments de kératine. Les cellules épineuses deviennent alors des cellules granuleuses, qui, de plus, vont doter leur surface d'une

protéine de protection particulièrement dure, l'involucrine. La couche cellulaire granuleuse représente la dernière couche de cellules métaboliquement actives.

De deux à quatre couches cellulaires d'épaisseur, le stratum granulosum comprend des kératinocytes en forme de losange, orientés parallèle à la surface. Leur cytoplasme renferme de nombreux granules basophiles, les granules de kératohyalines, produits de synthèse accumulés, et colorés à l'hématoxyline.

La couche granuleuse évite essentiellement à l'organisme de se déshydrater (perte d'eau), mais participe également à la formation des futures cellules de la couche cornée située au-dessus.

La couche stratum lucidum, couche morte homogène qui ne s'observe que dans la peau très épaisse, correspond à une zone de transition entre le stratum granulosum et le stratum corneum

2.3.4. La couche cornée (*stratum corneum*)

La couche cornée se compose d'environ une vingtaine de couches de cellules mortes. Couche de kératine véritable, composée de cornéocytes, et résistante aux changements chimiques, le stratum corneum est responsable de plusieurs des fonctions de la peau. Cette couche de l'épiderme protège la peau contre les agressions extérieures (chaleur, froid, sécheresse, déshydratation : perte d'eau). Elle agit également comme une barrière en empêchant la pénétration dans l'organisme d'éléments extérieurs (agents microbiens, poussières, etc...). Cette couche de cellules kératinisées desquame progressivement au fur et à mesure que ses cellules se détachent de l'épithélium plus profond (pellicules).

La partie superficielle du stratum corneum se desquame. Le dernier stade de cette différenciation qui dure en tout quelques semaines, se caractérise par des processus d'apoptose qui entraînent la perte des noyaux et des organites cytoplasmiques ou plutôt un phénomène de cornification. Un changement de l'expression des gènes de kératine et de la structure de ces protéines a été démontré au cours de cette différenciation. Au niveau cellulaire la cornification se traduit par la synthèse d'un type d'enveloppe immature au dessous de la membrane plasmique (Candi, 2005).

3. La peau – Fonctions physiologiques

La description anatomique de la peau amène très naturellement à l'une de ses fonctions essentielles qu'est la protection de l'organisme. La peau constitue une frontière mécanique, physique, chimique et immunologique. Elle joue le rôle de barrière de protection contre les agressions externes multiples (rayonnements, micro-organismes...) et évite la déshydratation de l'organisme. Elle est également le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions sensorielles, immunitaires et thermorégulatrices (Bachelez, 2005).

L'étude, même sommaire, de la peau normale permet de mieux comprendre d'une part comment fonctionne cette peau et comment elle risque de réagir aux substances exogènes, mais également aux variations des conditions environnementales selon que la peau est dans son état normal ou altérée par des phénomènes biologiques naturels ou pathologiques.

3.1. La peau: un organe sensoriel

La peau est innervée et vascularisée, et possède des glandes sécrétoires. L'innervation de la peau en fait un organe tactile ressentant le chaud, le froid, la douleur, l'inconfort ou les sensations tactiles agréables. La peau peut donc enregistrer de nombreux événements pour en informer le cerveau et conduire l'individu à des réactions adaptées soit par l'intermédiaire (i) du cortex de la motricité volontaire, (ii) des zones sous-corticales des mouvements involontaires, (iii) des corrections neurovégétatives.

Le rôle sensoriel de la peau est triple et s'exprime au travers de la sensibilité tactile, de la sensibilité aux phénomènes physico-chimiques (froid, chaud), de la sensibilité nociceptive.

Ces sensations déterminent donc un rôle de relation avec l'environnement par la perception au niveau du tissu cutané du toucher agréable, des traumatismes (coups, pressions, brûlures, acides, irritation par les rayons, etc.)... Ces sensations conduisent à un rôle de relation par contacts physiques avec autrui. Si elle est altérée, par certaines dermatoses ou certains traitements locaux, alors ces échanges sont perturbés, par exemple entre une mère et son enfant porteur d'un eczéma étendu.

Dans cette fonction de relation la mécanoeception, la nociception mais également la thermoception jouent un rôle important. Le terme mécanoeception désigne les systèmes mécanoréceptifs qui ont la capacité de percevoir le toucher (tact). Le tact est le sens du

toucher, celui des cinq sens correspondant à la perception des stimuli mécaniques. Il s'agit par exemple de la déformation de la peau par la pression qu'exerce un objet.

Plusieurs sous-systèmes peuvent être distingués ayant chacun une spécificité propre, associée à un aspect particulier du toucher en fonction des propriétés mécaniques de leurs récepteurs respectifs : les disques de Merkel, les corpuscules de Meissner, les terminaisons de Ruffini et les corpuscules de Pacini.

La nociception comprend deux systèmes périphériques pour ressentir la douleur. Le premier type de récepteurs est un nocicepteur mécano-thermique qui répond à des stimulations d'intensité importante et qui transmet rapidement, vers le système nerveux central, les sensations douloureuses particulièrement localisées. Les deuxièmes types de récepteurs nociceptifs sont les nocicepteurs polymodaux qui répondent à des stimulations mécaniques dont l'intensité est élevée et à des stimulations chimiques (application d'un produit corrosif sur la peau ou ingestion de médicaments) ainsi qu'aux stimulations thermiques. Il s'agit de récepteurs qui transmettent les sensations de la douleur localisée.

La régulation thermique ou thermoception. La thermoception dépend de systèmes qui sont sensibles à des différences de températures. Ces thermorécepteurs s'adaptent en cas de stimulations persistantes, c'est la raison pour laquelle ils ont des capacités très importantes pour déterminer des températures relatives et pour les changements de température.

Le maintien d'une température centrale stable doit être ajusté aux variations de température du milieu extérieur et du milieu intérieur. L'organe de mesure et de commande est le thalamus. La peau participe à la régulation thermique par sa circulation sanguine : vasodilatation qui permet l'évacuation d'un excès de chaleur, la vasoconstriction limite les pertes thermiques. Les glandes sudorales interviennent par le dégagement et la réabsorption de vapeur d'eau ou dans des conditions d'hyperthermie importante : par une sudation intense, avec ruissellement de la sueur ; l'évaporation de cette sueur permet le refroidissement de la surface de la peau.

3.2. La peau : un organe métabolique

Le rôle métabolique de la peau recouvre des fonctions primordiales : (i) l'exsudation : avec drainage d'eau mais aussi de NaCl et d'autres minéraux (de 2 à 3,5 g/L de sueur). Celle-ci est

sous le contrôle de l'hypophyse et des glandes surrénales ; (ii) la respiration percutanée : l'évaporation est importante, à raison de 270 g/m². L'hydratation de la peau et la respiration percutanée sont augmentées chez l'enfant et réduites chez le vieillard ; (iii) le rôle de réserve : cette réserve a surtout lieu dans le tissu adipeux (de 10 à 15 kg chez l'adulte), ce sont des réserves liquidiennes et électrolytiques. Cette fonction de réserve dépend des matières à stocker, mais aussi d'une bonne structure conjonctivale et d'une bonne circulation artérioveineuse qui apportent et retiennent les différents éléments.

3.3. La peau : un organe immunologique

La peau est pourvue de nombreuses cellules qui interviennent dans les phénomènes immunologiques : les lymphocytes T et leurs sous-populations, les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène parmi lesquelles les cellules de Langerhans, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les kératinocytes. Les cellules de Langerhans par exemple doivent être présentes afin qu'une dermatite de contact puisse avoir lieu. En son absence, l'anticorps induit une tolérance par activation des lymphocytes T suppresseurs. Les différentes cellules à fonction immunologique cutanée coopèrent entre elles par des facteurs solubles appelés cytokines. Parmi celles-ci l'« *epidermal cell derivated thymocyte activating factor* » (ETAF), produit par les cellules de Langerhans et les kératocytes, intervient sur la sécrétion d'interleukine 2 par les lymphocytes et induit les récepteurs membranaires à cette interleukine 2 (Luger, 1981). L'ETAF a aussi un rôle chimiotactique sur les polynucléaires, les cellules mononucléaires et les lymphocytes T. La notion d'immunologie cutanée *in situ* permet de comprendre certaines pathologies, mais aussi permet aussi de comprendre comment agissent certains principes actifs au travers de la stimulation, de l'inhibition et de la modulation d'agents immunologiques, et donc d'exercer ainsi un effet thérapeutique (ou au contraire pathogène).

3.4. La peau, un organe de protection : la fonction barrière.

La notion de «barrière cutanée» se réfère à la fonction de la couche extérieure de l'épiderme, la couche cornée. Longtemps négligée en raison de son invisibilité sur les préparations histologiques, cette couche de cellules non viables constitue cependant aujourd'hui une des frontières de la recherche en physiologie cutanée.

La peau exerce donc la fonction de barrière entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. La fonction barrière empêche la pénétration dans la peau d'un certain nombre de substances, et aussi la sortie des liquides constitutifs du corps. La protection vis à vis des agents extérieurs s'exerce contre la pénétration d'agents infectieux (bactéries, champignons, virus), de substances chimiques et d'allergènes. Cette barrière est incomplète, elle laisse passer certains médicaments (caféine), certains toxiques (alcool, acide salicylique, iode), elle peut être amoindrie par des effractions cutanées, des maladies cutanées (psoriasis), un effet occlusif (sous un pansement ou un change fessier, par exemple). C'est souvent l'altération de cette fonction barrière qui nous rappelle le rôle essentiel et protecteur de notre peau au quotidien : désinfection alcoolique, jus de citron ou autres irritants provoquent alors des picotements et brûlures, tandis que la peau saine tolère ces substances sans problème. Une barrière cutanée altérée facilite également le contact d'allergènes avec le système immunitaire de l'épiderme, augmentant ainsi le risque d'une sensibilisation allergique.

La peau empêche également les sorties de liquides, s'oppose à la perte d'eau, d'électrolytes, de protéines. La fonction barrière dépend de la couche cornée, de son état d'hydratation et également de la couche protectrice de sébum produit par les glandes sébacées sous l'action de sécrétions d'hormones mâles.

D'un point de vue physiologique et fonctionnel, la fonction barrière résulte d'une organisation tissulaire et biochimique bien spécifique et particulière au niveau protéique, lipidique et enfin au niveau de la composition et de la distribution ionique.

3.4.1. Rôle des protéines dans la fonction barrière

L'épiderme est un tissu qui se renouvelle constamment et où le nombre de cellules perdues à la surface est contrebalancé par le nombre de cellules produites au niveau de la couche basale, unique couche composée de kératinocytes mitotiquement actifs (Holbrook, 1993). Sous l'effet de signaux définis, les kératinocytes basaux entrent dans un processus de différenciation, commencent leur migration vers la surface et acquièrent progressivement les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cornéocytes (Houben, 2007). Dans l'épiderme, les processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire apparaissent séquentiellement et chacun de ces processus est caractérisé par l'expression de protéines spécifiques qui contribuent à la fonction barrière de la peau.

La fonction barrière de l'épiderme est assurée à la surface par une structure produite par les cornéocytes et appelée enveloppe cellulaire. Située contre la membrane plasmique, l'enveloppe cellulaire est composée de nombreuses protéines réticulées par des transglutaminases formant un complexe protéique macromoléculaire particulièrement stable et insoluble (Steinert, 2000). La protection de l'organisme est aussi assurée par la cohésion cellulaire de l'épiderme qui lui permet de résister aux continuelles frictions mécaniques que subit la peau. Cette cohésion est due à la présence d'un très grand nombre de jonctions cellulaires de type jonctions adhérentes, desmosomes (interactions cellules/cellules) et hémidesmosomes (interactions cellules/matrice extracellulaire). La force de cohésion de ces jonctions est renforcée par un réseau filamenteux supracellulaire composé de kératines (Fuchs, 1995).

Les kératines sont des protéines du cytosquelette appartenant à la famille des protéines de filaments intermédiaires (IFP). Selon les critères utilisés (structure des gènes, homologie de séquences ou propriétés d'assemblage), les nombreux gènes (plus de 50) codant pour ces protéines peuvent être classés en 5 ou 6 types (Fuchs, 1994a, Herrmann, 2000).

Les IFP ont toutes la même organisation structurale. Elles possèdent un domaine central en hélice α d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal non hélicoïdaux de taille extrêmement variable. La plupart de ces protéines sont spécifiques d'un type ou d'un état de différenciation cellulaire et forment des réseaux composés de filaments de 10 nm de diamètre, reliant la membrane nucléaire à la membrane cytoplasmique (Coulombe, 2000). Les kératines, regroupant à elles seules plus de 35 protéines différentes, sont exprimées dans les épithéliums.

Les kératines acides (K1 à K8 et Ha1 à Ha7) représentent les IFP de type I et les kératines basiques (K9 à K20 et Hb1 à Hb6) les IFP de type II. Les gènes k1-k20 sont exprimés dans les épithéliums " mous " représentés par des tissus glandulaires (pancréas, glandes salivaires...) et par les épithéliums simples (foie, intestin...) ou stratifiés (épiderme, cornée, langue...) (Moll, 1982). Les épithéliums " durs " (cheveux, ongles) expriment les gènes ha1-ha7 et hb1-hb6 (Powell, 1997).

La polymérisation des filaments de kératines débute obligatoirement par la formation d'un hétérodimère comprenant une protéine de type I et une protéine de type II (Coulombe, 1993). Une cellule épithéliale doit donc coordonner l'expression d'au moins deux gènes pour produire un réseau de kératines dans son cytoplasme. Le contrôle de l'expression de la plupart de ces gènes concerne donc des paires de gènes et est spécifique d'un état de différenciation

cellulaire. Ce phénomène est bien illustré par les épithéliums stratifiés. Dans ces épithéliums, les cellules basales, mitotiquement actives, expriment principalement K5 et K14, tandis que les kératinocytes différenciés des couches supérieures expriment d'autres paires de kératines selon le programme de différenciation qui est exécuté. Par exemple, la paire de K1-K10 est caractéristique de l'épiderme et représente à peu près les premières protéines à être exprimées pendant la cornification. Elles vont remplacer les réseaux précédent constitués des kératines K5 et K14. A un stade plus avancé, les cellules acquièrent des granules de kératohyalines qui contiennent de la profilaggrine un précurseur de la protéine interfilamenteuse, la filaggrine. La filaggrine agrège les filaments de kératine en faisceaux rigides. Cette organisation filamenteuse entraîne une modification de la morphologie cellulaire vers une forme plus aplatie, caractéristique des cornéocytes de la couche cornée. A elles seules, les IFPs et la filaggrine constituent 80 à 90% de la masse protéique de l'épiderme des mammifères et de plus elles forment une couche uniforme. Cette couche protéique solidifie le tissu et permet ainsi la poursuite des étapes de maturation et donc le renforcement de l'assemblage de la couche cornée. En parallèle, une série d'autres protéines de structure comme l'involucrine, la loricrine, la trichohyaline et la classe des petites protéines riches en proline sont synthétisées puis crosslinkées par quelques transglutaminases afin de renforcer l'enveloppe cornée juste sous la membrane plasmique. Les protéines de l'enveloppe cornée constituent environ 7 à 10% de la masse de l'épiderme.

Une des caractéristiques des filaments de kératines est leur capacité à élaborer des réseaux constitués de câbles ou tonofilaments correspondant à la juxtaposition de plusieurs filaments de 10 nm de diamètre. Ces câbles relient la région périnucléaire à la membrane cytoplasmique, où ils sont ancrés au niveau des desmosomes et des hémidesmosomes. Dans l'épiderme, un tissu particulièrement riche en desmosomes, l'organisation des réseaux de kératines transcende les limites de la cellule pour former un réseau supracellulaire (Fuchs, 1994b). C'est dans ce contexte que la fonction des kératines prend véritablement tout son sens. En effet, ces protéines ont une telle importance dans la cohésion et l'élasticité de l'épiderme qu'une perte, même partielle, de leur fonction entraîne une fragilisation de ce tissu. De ce fait, de nombreuses maladies sont dues à des mutations localisées dans les gènes codant pour ces protéines (Fuchs, 1998 ; Irvine, 1999). En général, le moindre frottement au niveau de la peau provoque, chez ces malades, une lyse des kératinocytes et leur dissociation du tissu épidermique. L'identité du gène muté et le caractère de la mutation déterminent le tableau clinique de la maladie (Fuchs, 1994b). Par exemple, des mutations dans les gènes k5 ou k14

provoquent des épidermolyses bulleuses simples (EBS), maladies caractérisées par un défaut de cohésion dermo-épidermique provoquant la formation de cloques à la suite de traumatismes mécaniques minimes. Des mutations dans les gènes k1 ou k10 provoquent, quant à elles, des hyperkératoses épidermiques caractérisées par la dissociation des couches suprabasales de l'épiderme.

Il a été montré que certaines mutations impliquées dans ces maladies modifient les propriétés mécaniques des filaments de kératines (Ma, 2001). Parmi les différentes kératines exprimées dans l'épiderme, trois sont particulièrement intéressantes. Il s'agit de K6, K16 et K17. Dans des conditions normales, elles présentent la particularité d'avoir une expression faible et restreinte à des structures bien précises. En revanche, leur expression est très fortement augmentée et plus étendue à la suite d'une lésion de la peau ou dans les épithéliums stratifiés subissant une différenciation anormale ou une hyperprolifération.

3.4.2. Rôle des lipides dans la fonction barrière

Depuis l'introduction du modèle « brique et mortier » de la couche cornée par Elias *et al.* (Elias, 1983), les lipides sont considérés comme un élément primordial de cohésion entre les cornéocytes. À partir de la couche basale, les kératinocytes produisent des quantités croissantes de lipides, parmi lesquels prédominent progressivement (et au détriment des phospholipides) les acides gras libres, le cholestérol-3-sulfate, le cholestérol, les esters de stérol et les sphingolipides (les céramides). Dans le *stratum corneum*, ces différentes familles de molécules vont s'auto-organiser en bicouches formant le film lipidique entre les cornéocytes.

La fonction de barrière et la relative imperméabilité à l'eau de cette couche épidermique dépendent largement de la composition du ciment lipidique et de ses propriétés structurales uniques (Garson, 1991 ; Potts, 1991). L'équilibre entre les composantes lipidiques de l'épiderme est perturbé dans certaines maladies comme la carence en acides gras essentiels, les troubles héréditaires du métabolisme de lipides (maladie de Refsum, syndrome de Sjörger-Larsson, maladie de stockage des lipides neutres) ou les syndromes pharmaco-induits (par exemple au cours des traitements hypocholestérolémiques) qui se manifestent, entre autres, par une desquamation pathologique.

Ces différentes observations laissent à penser que les lipides peuvent jouer un rôle important dans la cohésion et la desquamation de la couche cornée. Cependant, des expériences menées sur la peau de porc, dont la biologie est très proche de celle chez l'homme, indiquent que

l'extraction totale des lipides du *stratum corneum* non seulement ne compromet pas la cohésion entre les cornéocytes mais, au contraire, l'augmente (Chapman, 1991). En effet, les forces de liaison entre les enveloppes lipidiques (Swartzendruber, 1987) des cornéocytes mis à nu semblent être supérieures à celles des multicouches intercellulaires constituées d'intercalations des phases hydrophiles et hydrophobes (Madison, 1987 ; Swartzendruber, 1989). Ainsi, les lipides intercellulaires n'auraient pas de fonction majeure dans le processus de cohésion et leur rôle principal serait celui d'un régulateur des flux hydriques et de constitution d'une barrière occlusive.

En revanche, les lipides semblent tout d'abord jouer un rôle dans l'étanchéité relative à l'eau de par leurs qualités hydrophobes. Ils semblent également jouer le rôle de « rivets moléculaires », en réalisant des ancrages entre les couches lipidiques voisines au travers notamment de lipides à chaînes particulièrement longues (comme les O-acylcéramides) (Bouwstra, 1998). Les lipides contribuent donc à la cohésion des couches, entre elles et aux membranes lipidiques des cornéocytes, l'intégrité des structures cellulaires étant un pré-requis indispensable pour que la couche cornée puisse exercer son rôle de barrière, vis à vis de l'eau en particulier. En 2001, un modèle moléculaire expliquant les variations de comportement des lipides extracellulaires a été proposé par Norlen *et al.* (Norlén, 2001)

La composition du « ciment » lipidique varie au sein de la couche cornée en fonction de la profondeur, ce qui va de pair avec les changements de l'ultrastructure des espaces extracellulaires et avec des modifications microscopiques (Menon, 1997). Des enzymes cataboliques procèdent au remodelage des membranes et des multicouches intercellulaires : les hydrolases provoquent la dégradation des phospholipides en acides gras libres, les sulfatases convertissent le sulfate de cholestérol en cholestérol libre, les glycosidases et céramidases participent d'abord à la maturation et puis à la dissociation des céramides (Elias, 1988, Elias ; 1991 ; Fluhr, 2001). À la surface, certains lipides sécrétés par les glandes sébacées sont aussi intégrés dans les espaces intercornéocytaires et le contact avec l'air ambiant induit l'oxydation d'une partie des molécules. Toutes ces modifications entraînent la diminution de la quantité des O-acyl-céramides (type 1) vers la surface. Les rivets moléculaires raréfiés, la cohésion des strates lipidiques diminue, facilitant le flux hydrique et la circulation des enzymes intercellulaires.

3.4.3. Rôle des ions dans la fonction barrière

La relation entre la fonction barrière et l'homéostasie ionique cutanée reste un domaine d'étude encore peu développé de part notamment la difficulté inhérente à ce type d'analyses.

En effet, à ce jour peu de techniques d'analyse permettent de conserver une structure 2D de l'échantillon biologique d'intérêt et d'obtenir des informations quantitatives sur la composition chimique élémentaire d'un tissu.

Cependant, des études suggèrent que des signaux ioniques supportés par des flux et des gradients de concentration jouent un rôle important dans le mécanisme d'homéostasie de la fonction barrière de l'épiderme. Parmi les éléments importants sont cités le calcium et le potassium. En effet, des études montrent que chez des souris « hairless » dont la fonction barrière est altérée par de l'acétone, le recouvrement de cette fonction barrière est modifié après exposition à des solutions de calcium et de potassium (Lee, 1992 ; Menon, 1992 ; Denda, 1999).

Les kératinocytes humains normaux ont la capacité de proliférer et de se différencier *in vitro* pour former des feuillets qui possèdent une organisation basique similaire à celle de la peau humaine intacte. Des concentrations en calcium extracellulaire supérieures à 0,1 mM initient une cascade d'évènements durant lesquels les kératinocytes évoluent pour donner, à partir de petites cellules prolifératives en monocouches, des feuillets stratifiés avec une enveloppe cornée (Hennings, 1980 ; Hennings, 1983 ; Eckert, 1981). Un élément clé de cette réponse à l'augmentation de calcium extracellulaire est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Hennings, 1989, Sharpe, 1989). Les kératinocytes présentent une grande capacité à détecter et à répondre à de faibles variations de la concentration en calcium extracellulaire contrairement aux fibroblastes par exemple. En effet, dans des kératinocytes murins, suite à une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire de 0.1 à 0.12 mM, la concentration intracellulaire de calcium augmente, alors que les fibroblastes ne détectent pas ce changement de concentration (Kruszewski, 1991).

De plus, au sein de l'épiderme des mammifères, un gradient calcique est observé, avec les concentrations les plus faibles retrouvées dans les couches basales et les plus élevées dans la couche granuleuse. La plupart des études qui mettent en évidence ce gradient ont été réalisées par la technique de capture des ions par cytochimie et permettent d'obtenir des données semi quantitatives sur les distributions calciques au sein de la peau (Menon, 1992). D'autres techniques comme l'analyse par microfaisceau d'ions permettent de mettre en évidence ce gradient et d'obtenir des données quantitatives (Pallon, 1992).

Ce gradient semble jouer un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cutanée. Il interviendrait notamment dans les processus de différenciation kératinocytaire et donc dans la formation de la couche cornée. Il a été montré qu'un gradient calcique induit la différenciation terminale des kératinocytes (Watt, 1989), la formation de l'enveloppe cornée qui est importante à la base de la barrière (Nemes, 1999) et aussi la synthèse de lipides dans l'épiderme (Watanabe, 1998).

Le calcium se trouve en effet être un second messenger d'importance au niveau cellulaire intervenant dans la régulation de nombreux processus physiologiques majeurs : prolifération, différenciation, apoptose (Clapham, 2000).

L'ion calcium est toxique pour la plupart des cellules. Il est donc probable que les premières protéines capables de le chélater aient servi à l'empêcher de sévir. Au cours de l'évolution, certaines de ces protéines- tampons sont devenues des effecteurs, faisant de cet ion non plus un intrus toxique mais un second messenger universel pouvant coder des informations cellulaires très raffinées. Ainsi, les flux calciques sont à l'origine de multiples réponses cellulaires tant rapides que pouvant se maintenir sur de longues périodes, et cela dans la grande majorité des cellules, excitables ou non.

Dans l'épiderme de mammifères, la majorité des protéines nécessaires à la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme comme l'involucrine, la loricrine, la filaggrine et les kératines sont régulées *in vitro* par des changements en calcium à un niveau transcriptionnel voire à un niveau post-transcriptionnel mais plus rarement (pro-filaggrine à filaggrine, activation des transglutaminases) (Hitomi, 2005).

Certaines études ont montré que le profil ionique du calcium est altéré dans différentes maladies de la peau (Forslind, 1999). Une distribution anormale de l'ion calcium a été observée dans des épidermes de peaux psoriasiques et de dermatites atopiques, maladies qui montrent une fonction barrière anormale (Pallon, 1996).

Une régulation altérée du métabolisme du calcium ainsi qu'une perte d'eau transépidermique élevée a été observée chez des personnes atteintes de la maladie de Darier et encore chez celles atteintes de la maladie de Hailey-Hailey qui sont toutes les deux caractérisées par une perte d'adhésion entre les cellules épidermiques suprabasales. Le gène impliqué dans la maladie de Darier (ATP2A2) code pour une ATPase du transport calcique du réticulum endoplasmique alors que le gène impliqué dans la maladie de Hailey-Hailey code pour une voie de sécrétion pour une ATPase du transport du calcium et du manganèse de l'appareil de Golgi (SPCA1) (Hu, 2000 ; Behne, 2003).

Le calcium joue donc un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de la fonction barrière cutanée mais peu de données sont accessibles. L'analyse par faisceau d'ions peut permettre de compléter les données sur la distribution des ions au sein de tissu sains ou pathologiques.

4. De la fonction barrière de la peau au passage transcutané

L'épiderme humain est particulièrement bien adapté pour jouer sa fonction essentielle de "barrière" : il limite l'entrée des agents extérieurs et participe à l'homéostasie générale de l'organisme en régulant la perte en eau transépidermique. En raison de l'importance de sa surface, la peau constitue quantitativement l'organe le plus important en relation avec le milieu extérieur. Cette "barrière protectrice" toutefois n'est pas absolue, elle est perméable à pratiquement toutes les substances, seul le degré de perméabilité varie. Il est lié principalement à l'état physiologique de la peau, aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée et à la nature de "l'environnement" (excipient, véhicule, air ambiant...) par lequel ces substances sont amenées au contact de la peau.

La diffusion d'un agent exogène au travers de la peau va dépendre de plusieurs paramètres qui sont présentés dans ce paragraphe.

4.1. Définitions

L'absorption percutanée correspond au transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. Elle peut être définie comme la somme de deux phénomènes : une pénétration des molécules au sein de la peau entière, suivie d'une résorption par la circulation sanguine ou lymphatique depuis le derme papillaire puis le derme profond. L'étape de pénétration, en terme physique, est une diffusion passive à travers chaque structure du tégument : couche cornée, épiderme de Malpighi, derme et annexes cutanées. Elle est sous la dépendance préalable d'un partage, se produisant à l'interface environnement/couche cornée, sans lequel aucun échange n'est possible. Une fois absorbée, la substance est distribuée dans l'organisme puis, après avoir été ou non métabolisée, elle est éliminée. Les étapes succédant à l'absorption percutanée sont similaires à celles qui sont rencontrées pour toute autre voie de contamination.

La notion de barrière est aujourd'hui souvent résumée à une simple et même unité fonctionnelle, anatomique et physico-chimique : le *stratum corneum*. Cependant, il apparaît que la fonction barrière de la peau ne peut se résumer à la simple définition de ce même *stratum corneum*. En effet, l'ensemble des protéines, lipides et autres gradients ioniques semblent interagir étroitement dans la régulation du passage transépidermique, or, l'ensemble de ces composés est produit de manière dynamique par l'ensemble des structures épidermiques. Toutes les couches de l'épiderme, hormis celles qui sont directement en contact avec la zone germinative et les ultimes couches disjointes, ont une efficacité égale dans ce rôle de barrière.

Au sein de l'épiderme, la couche cornée est reconnue comme la barrière à la diffusion, *in vitro* elle présente une résistance à l'absorption pratiquement identique à celle de la peau entière. L'élimination totale du *stratum corneum* par délamination avec un ruban adhésif (stripping) conduit à l'obtention d'une perte insensible en eau équivalente à celle intervenant à la surface de l'eau libre, et à l'augmentation de la pénétration des agents chimiques. La résistance de l'épiderme vivant à la diffusion est très faible comparativement à celle de la couche cornée mais il est cependant montré que, lorsque celle-ci est éliminée par stripping, l'épiderme de composition chimique hydrophile peut jouer un rôle de barrière notamment vis à vis de molécules très hydrophobes. Les structures dermiques, pour une peau non lésée, ne participent que très modestement à la fonction globale de "barrière", la vascularisation de la papille dermique favorise la résorption des molécules en provenance de l'épiderme.

4.2. Les voies de pénétration

Anatomiquement, deux voies distinctes s'offrent pour la pénétration : l'une, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée et à travers les cellules cornées elles-mêmes (*voie transépidermique*), l'autre empruntant les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés et/ou glandes sudoripares) (*voie transannexielle*). La pénétration ne s'effectue pas uniquement par l'une des voies, les deux participent au phénomène et la pénétration globale est la résultante d'un passage transépidermique et d'un passage par les annexes.

Les voies transépidermiques. L'un des moyens du transport est la diffusion passive qui a lieu pour des principes actifs (ou molécules diverses) libérés du complexe chimique de l'extrait de

plante et de l'excipient. Elle dépend du gradient de concentration des molécules existantes dans le véhicule et à la surface épidermique.

Loi de la diffusion passive : elle est définissable par la loi de Fick :

$$\frac{dQ}{dt} = Kp * \Delta Cx$$

Où dQ/dt est la vitesse d'absorption,

Kp constante de perméabilité,

ΔCx la différence de concentration des deux côtés du SC.

Cette équation signifie que si l'on prend le *stratum corneum* pour une membrane idéale, le transport des substances dépend de la concentration des deux côtés de la membrane, de son épaisseur et de sa qualité. Le *stratum corneum* n'est pas une membrane idéale de par sa complexité et son polymorphisme. De ce fait, la loi de Fick n'intéresse ici que la qualité de membrane du *stratum corneum*.

Les voies transannexielles. La surface épidermique n'est pas uniforme, puisqu'elle donne passage aux conduits excréteurs des glandes sudoripares, au système pileux accompagné de la voie d'excrétion des glandes sébacées. Ces voies transannexielles sont des voies de passages directes vers le derme où logent ces organes. La glande sudoripare a un conduit étroit qui ne permet guère un passage, par ailleurs repoussé par le flux de sueur.

Au niveau du follicule pileux et de la glande sébacée, le tissu épidermique s'amincit, et par ailleurs le *stratum corneum* fait place à des cellules vivantes. Si la forme médicamenteuse administrée peut s'émulsionner avec le sébum, les principes actifs passeront rapidement de la surface cutanée aux zones de résorption plus importante.

4.3. Les facteurs influençant la fonction barrière

Différents paramètres peuvent influencer, moduler l'efficacité de la fonction barrière de la peau. Parmi ces facteurs, nous citerons : **(i) l'équilibre physico-chimique du *stratum corneum* (hydrophobicité, lipophilie,...).** Pour exemple, le sébum est une sécrétion lipidique des glandes sébacées, qui renferme des cires et des triglycérides. Il est facilement éliminé par les

savons et solvants organiques. Sa fonction barrière n'est pas importante mais peut intervenir en modifiant légèrement la composition ou la concentration des applications cutanées dermo-cosmétiques ou médicamenteuses. **(ii) le pH cutané.** Le pH de la peau est important puisqu'il conditionne l'ionisation et la capacité d'absorption des principes actifs. Ce pH est variable sur les divers endroits du corps, mais aussi en fonction de la sueur, de sécrétions séborrhéiques, ou d'états pathologiques de la peau. Voisin d'un pH 5, il peut être facilement être influencé par le pH du véhicule ; **(iii) l'intégrité biologique de la peau.** L'état de la peau avec son intégrité est un facteur essentiel. Une peau dont la fonction barrière est lésée (brûlures, cicatrices, eczéma...) favorisera la pénétration d'agents pharmacologiques ou exogènes ; **(iv) l'âge du sujet.** Des différences de perméabilité sont observées entre l'enfant (13 %) et le sujet âgé (7 %), notamment en raison de différence d'hydratation, d'absence de glandes sébacées et d'une kératinisation moindre chez l'enfant. De plus, les personnes âgées souffrent d'un amincissement de l'épiderme ; **(v) l'épaisseur de la peau.** L'épaisseur de l'épiderme et surtout de la couche cornée ainsi que sa composition en substance kératinisée, en substance fondamentale, a une certaine importance pour l'efficacité de la fonction barrière. Ainsi, les zones palmoplantaires sont relativement peu perméables compte tenu de l'épaisseur du stratum corneum et l'absorption percutanée est plus importante au niveau de l'avant-bras qu'au niveau de l'abdomen (Maibach, 1971). L'avant-bras est par contre moins perméable, que le front et la joue, très vascularisés (Craig, 1977 ; Auclair, 1991) ; **(vi) l'espèce considérée.** Par rapport aux autres espèces, la peau humaine est généralement la peau la moins perméable aux substances chimiques. La perméabilité cutanée est ainsi décroissante du lapin, au rat, au cobaye, au porc, puis à l'homme (Bartek, 1972 ; Bronaugh, 1982).

La connaissance des modalités de diffusion et d'absorption des substances exogènes (biologiques, chimiques, physiques) à travers la peau et des particularités dynamiques, cinétiques et quantitatives de cette diffusion percutanée devrait permettre de comprendre les mécanismes intrinsèques liés à une contamination par contact avec la peau mais également de mettre en place des systèmes de protection spécifiques pour diminuer l'impact d'un contact ou d'une exposition répétée ou prolongée entre un agent toxique et la peau. Ces études devraient également permettre de définir précisément les mécanismes essentiels impliqués dans la fonction barrière. Il est de ce fait, fondamental de considérer la fonction barrière cutanée comme un ensemble résultant d'interactions anatomiques, morphologiques et physico-chimiques.

5. La peau et ses pathologies

5.1. Pathologies et fonction barrière cutanée

Des déséquilibres homéostatiques de la peau peuvent être générés soit par des accidents (lésions, coupures, brûlures,...), soit par des pathologies d'ordre infectieux (les plus fréquentes) ou induites par des facteurs de prédispositions génétiques, immunitaires ou bien des facteurs alimentaires et environnementaux (cancers, psoriasis, dermatite atopique). Ces différents déséquilibres mettent en jeu des dysfonctionnements plus ou moins accentués des mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires impliqués dans la fonction barrière cutanée. Sans présenter un état des lieux exhaustif sur le sujet, nous présenterons des exemples de ces altérations de la fonction barrière et les conséquences physiopathologiques induites.

5.1.1 La dermatite atopique ou eczéma atopique (ATOD)

La dermatite atopique (ATOD) ou eczéma atopique, touche près de 20% des enfants de moins de 11 ans, et apparaît le plus souvent entre 2 et 6 mois (Leung, 2003). L'ATOD a également été décrite à l'âge adulte (5%). L'ATOD est une pathologie chronique, d'évolution longue avec des disparitions et des réapparitions possibles des symptômes, sans gravité et non contagieuse et qui, en général disparaît avec l'âge. (Kay, 1994 ; Taylor, 1984). Cependant, elle est souvent ressentie comme une expérience douloureuse et pénible (démangeaisons, peau sèche, insomnie...).

L'ATOD peut se définir comme une affection inflammatoire de la peau avec une hyperréactivité cutanée due à des facteurs déclencheurs environnementaux sans souci de contamination pour les sujets non atopiques. Les contributeurs majeurs à cette hyperréactivité sont les nombreux changements dans les réponses cutanées et immunitaires chez les individus AD. L'ATOD se caractérise par de la xérose, du prurit et des lésions érythémales avec une augmentation de la perte d'eau transépidermique (TEWL). L'ATOD se limite essentiellement à la peau du visage et aux zones de flexions comme les coudes ou les aisselles qui sont connues pour être des zones où l'épiderme est le plus fin.

Des études de pénétrations transcutanées confirment cette observation et montrent que les zones les plus touchées sont également les plus « perméables ». Il semble donc qu'une fine barrière épidermique suggère une fonction barrière amoindrie et donc une plus grande

sensibilité à l'ATOD. Le mauvais fonctionnement de la barrière épidermique semble donc être un des aspects centraux de la physiopathologie de l'ATOD.

Il existe une prédisposition génétique à l'ATOD. En effet, elle survient sur un terrain familial allergique appelé ATOPIE (un enfant sur deux dont les 2 parents sont allergiques développe une ATOD). D'un point de vue génétique de multiples allèles à des loci différents ont été associés et semblent contribuer à la pathogenèse de l'ATOD. Parmi ces loci, nous pouvons citer : ATOD1 sur le chromosome 3q21, ATOD2 sur le chromosome 1q21, ATOD3 sur le chromosome 20p ATOD5 sur le chromosome 13q12-q14 et ATOD6 sur le chromosome 5q31-q33

Deux causes majeures ont été identifiées dans la survenue de l'ATOD: **(i)** une défaillance de la fonction barrière de la peau : schématiquement, la peau se présente comme un mur, les briques étant les cellules collées les unes aux autres grâce à un ciment, le ciment intercellulaire. Dans le cas de l'ATOD, le ciment intercellulaire est lésé et donc n'assure plus ou mal la cohésion entre les cellules de la peau. Ainsi la peau est plus perméable, la perte en eau est augmentée (sécheresse de la peau) et les agresseurs (allergènes) pénètrent plus facilement ; **(ii)** des troubles du système immunitaire : en présence d'une substance étrangère ou d'un allergène, les défenses naturelles de la peau sont exagérées. La peau réagit, c'est la poussée d'eczéma qui se manifeste par des démangeaisons, rougeurs et suintements. Dans 80% des cas de l'ATOD une augmentation de la concentration en IgE dans le sérum a été observée. (Bieber, 2008)

Les poussées sont favorisées par de multiples facteurs : **(i)** des facteurs saisonniers ou climatiques (hiver, froid) ; **(ii)** des allergènes aériens (pollens), de contact (nickel...), alimentaires ; **(iii)** une infection ORL et/ou des maladies éruptives, telles que les otites, rhumes, poussées dentaires... ; **(iv)** des irritations cutanées (eau calcaire, savons...) ; **(v)** des facteurs psychologiques, tels que le stress, les émotions...

Le traitement préventif consiste à restaurer la fonction barrière de la peau (crèmes, huiles de bain...) et à limiter voire éviter le contact avec les allergènes. Pendant la crise, le traitement repose sur la prescription de dermo-corticoïdes et/ou immunosuppresseurs locaux (sur la base d'un diagnostic médical).

Le traitement basé sur les dermo-corticoïdes est d'une grande efficacité lors des poussées d'ATOD. Même si ce type de traitement occasionne une certaine méfiance de la part des

parents, ils sont parfaitement tolérés à condition de respecter la prescription. Les traitements immunosuppresseurs sont prescrits uniquement en cas de réponse inadéquate ou d'intolérance aux traitements habituels.

5.1.2. Le psoriasis

Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique, dont l'évolution est le plus souvent ponctuée de poussées et de rémissions. Elle est caractérisée par des lésions arrondies ou ovalaires, érythémateuses (rougeâtres) et surmontées de squames sèches et nacrées, appelées «plaques psoriasiques», siégeant principalement au coude, au genou ou au cuir chevelu. La plupart des cas sont bénins. Cependant, le psoriasis peut également être étendu et très disgracieux. En Europe, la prévalence du psoriasis en plaques est de l'ordre de 0,8%, ce qui signifie que la maladie touche approximativement 3,7 millions d'Européens, avec environ 2,4 millions de cas jugés modérés à sévères. Le psoriasis survient généralement chez l'adulte jeune (entre 15 et 40 ans, âge moyen à l'apparition: 33 ans), hommes et femmes étant égaux devant cette maladie. Le psoriasis n'est pas contagieux. La cause exacte de la maladie demeure indéterminée. En effet, jusque dans les années 80, il a été avancé que ces lésions étaient la résultante d'une hyper-prolifération cellulaire (des kératinocytes, en particulier) au sein de la plaque psoriasique. Cette hyper-prolifération kératinocytaire ne permet pas la mise en place de la structure tissulaire nécessaire à la fonction barrière (Nestlé, 2009).

Des arguments ont été cependant avancés et suggèrent une implication du système immunitaire dans le développement du psoriasis. Ainsi, la recherche s'est concentrée sur le rôle joué par des messagers de l'inflammation, les cytokines pro-inflammatoires dans la progression de la maladie, mais également sur le rôle des lymphocytes T (Büchau, 2007).

Des études génétiques mettent également en avant un terrain de prédisposition. Ainsi, l'implication de trois gènes situés sur le chromosome humain 17 et du gène régulateur RUNX 1, entre autres, seraient impliqués dans la prédisposition au psoriasis (Helms, 2003). Bien que la maladie soit à ce jour incurable, des traitements médicamenteux permettent d'octroyer des périodes de rémission et améliorer à la fois l'aspect physique, mental et émotionnel des patients.

Les plaques psoriasiques bénignes et modérées sont traditionnellement traitées avec des formules pour applications locales (topiques) à base de dithranol ou de goudron de houille et de soufre colloïdal. Des pommades contenant des analogues de la vitamine D ou un dérivé de la vitamine A (rétinoïde) sont également appliquées pour traiter les plaques chroniques. Les

corticoïdes en application locale sur la peau (dermocorticoïdes) sont également très fréquemment utilisés en première intention, mais l'inflammation peut réapparaître à l'arrêt du traitement.

5.2. Rôle de la fonction barrière dans d'autres pathologies ?

Depuis quelques années, plusieurs controverses sont nées et reposent sur les inquiétudes du public face à l'impact des expositions environnementales sur la santé humaine. Dans un contexte global de prise de conscience de la relation qui peut exister entre l'environnement, l'alimentation, l'agriculture et la santé, de nombreuses interrogations ont été soulevées en regard de certains composés et de leur impact sur la santé humaine.

Ainsi, dans ce contexte polémique, des exemples très médiatiques peuvent être cités car ils visent directement les produits dermo-cosmétiques et plus particulièrement la fonction de barrière de la peau face à certains composés cosmétiques. Parmi les produits cosmétiques incriminés ces dernières années, nous pouvons citer les crèmes solaires dont il a été suggéré que certains composés chimiques et filtres physiques anti-UV seraient potentiellement toxiques et donc responsables de l'apparition de cancer de la peau. Nous pouvons également citer les produits anti-transpirants, qui suite à certaines études suggèrent une relation entre leur utilisation et le développement de cancer du sein.

5.2.1. Cancer de la peau, fonction barrière et crèmes solaires

Le cancer de la peau ou cancer cutané est une tumeur maligne développée aux dépens des cellules de la peau. Les cancers de la peau existent sous trois formes : les carcinomes basocellulaires, les carcinomes de cellules squameuses et les mélanomes. Certaines lésions sont précancéreuses ou sont des cancers superficiels comme la maladie de Paget, ou la maladie de Bowen.

Les **cancers de la peau** sont les cancers les plus fréquents, mais aussi les plus guérissables s'ils sont détectés et traités assez tôt. En France, environ 60.000 nouveaux cas de carcinomes et 7.401 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année. Leur progression est en Europe de 5 à 7 % par an. Cette progression est principalement la conséquence d'une surexposition aux rayons ultraviolets naturels (soleil) et artificiels (lampes).

Les cancers de la peau – Description et causes

Deux types de tumeurs cutanées sont essentiellement distingués, bien que d'autres types de cancers, plus rares, puissent se développer dans la peau (les carcinomes et les mélanomes).

Les carcinomes se développent à partir de cellules de l'épiderme, soit de la couche basale (carcinome basocellulaire), soit des couches supérieures (carcinome spinocellulaire). Ce sont les plus fréquents, puisqu'ils représentent 90 % des cancers de la peau, dont 75 % pour les basocellulaires et 20 % pour les spinocellulaires. Les carcinomes surviennent la plupart du temps après 50 ans et se guérissent aisément. Les carcinomes basocellulaires ne développent jamais de métastases; les spinocellulaires assez rarement, principalement dans les ganglions lymphatiques proches de la tumeur. Le développement des cancers suit généralement plusieurs étapes. Pour les carcinomes spinocellulaires, la tumeur débute souvent sous la forme d'une lésion localisée dans l'épiderme. En surface se forme une croûte (kératose actinique) ou une sorte d'eczéma (maladie de Bowen). C'est l'invasion du derme, plus profond, qui caractérise le stade de carcinome invasif.

Les carcinomes apparaissent le plus souvent sur les zones exposées, c'est-à-dire sur le visage, les épaules, les avant-bras et les mains. Le carcinome basocellulaire peut avoir l'aspect d'un petit nodule dur et arrondi (la classique «perle») qui se développe lentement et progressivement ou d'une petite zone blanchâtre, cicatricielle qui s'agrandit petit à petit ou encore d'une ulcération, qui ne cicatrise pas. Le carcinome spinocellulaire apparaît sous forme d'une croûte qui bourgeonne et peut ensuite saigner.

Chez des sujets prédisposés, plusieurs facteurs environnementaux (expositions solaires aiguës intermittentes et répétées surtout, mais aussi à des rayonnements ionisants, des expositions à l'arsenic, aux goudrons de houilles,...) sont impliqués dans la formation des carcinomes basocellulaires et des carcinomes épidermoïdes. Ces différentes expositions soulignent le rôle (direct ou indirect) de la fonction barrière dans le développement de ces pathologies.

Cependant parmi les facteurs de risque essentiels ne doivent pas être exclus les prédispositions familiales (génétiques), l'exposition à certains virus (virus du papillome humain). Les cicatrices de brûlures ou des plaies persistantes représentent aussi un facteur de risque pour le développement de ces cancers. Certains médicaments immunodépresseurs peuvent également favoriser la survenue de carcinomes épidermoïdes.

Les mélanomes se développent à partir des mélanocytes, lieu de synthèse de la mélanine. Cette mélanine est responsable de la pigmentation brune ou rouge de la peau. En effet, il existe deux types principaux de pigments : les bruns, qui confèrent le bronzage et une certaine protection contre les ultraviolets (UV), et les rouges (peau rousse) qui ne protègent pas. Les sujets qui fabriquent essentiellement des pigments rouges ne bronzent pas et sont, de ce fait, plus à risque de développer des cancers cutanés. Les mélanocytes sont normalement présents dans l'épiderme, associés aux cellules épidermiques à la partie profonde de l'épiderme.

Les « grains de beauté », ou naevus, correspondent à une accumulation de mélanocytes dans le derme, ce qui explique leur couleur brune ou rouge. Ces cancers sont beaucoup plus rares, mais peuvent se développer chez des sujets jeunes. Il faut les détecter et les traiter rapidement, car ils peuvent diffuser dans tout le corps et donner des métastases très difficiles à traiter.

Le plus souvent, les mélanomes sont des tumeurs pigmentées, plus ou moins brunes, car elles contiennent la mélanine.

Les mélanomes peuvent se développer sur n'importe quelle partie du corps, mais apparaissent assez fréquemment sur le tronc chez l'homme et sur les jambes chez la femme. Le plus souvent, les mélanomes se présentent sous la forme d'une lésion pigmentée, qui s'étend en superficie d'abord, en épaisseur ensuite, change de forme et de couleur.

L'exposition solaire excessive est le facteur essentiel responsable du développement des cancers cutanés, et plus particulièrement des mélanomes. Les patients à peau blanche d'origine européenne sont les principales victimes des carcinomes cutanés, qui sont plus rares chez les patients à peau pigmentée.

Pour les carcinomes spinocellulaires, les risques augmentent avec le nombre d'heures d'exposition. A ce titre, les sujets travaillant en permanence à l'extérieur (marins, cultivateurs, etc.) constituent une population dite à risque. Pour les carcinomes basocellulaires et les mélanomes, il apparaît aujourd'hui que des coups de soleil reçus pendant l'enfance (avant 10 ans) représentent un facteur de risque majeur. D'où l'importance de protéger tout particulièrement les enfants des rayons du soleil, notamment aux époques et aux heures où ils sont les plus intenses.

Les UV (ultraviolets) pénètrent dans la peau et entraînent les réactions chimiques conduisant à la production des mélanines, de la vitamine D, mais aussi à de nombreux effets néfastes à hautes doses. Les effets néfastes à long terme sont principalement l'accélération du vieillissement cutané (héliodermie) et la survenue de cancers cutanés.

Les cancers de la peau - Prédisposition génétique

Plusieurs équipes de recherche ont identifié des variations génétiques (localisées sur les chromosomes 9, 11 et 16) associées au risque de développer un mélanome. Les deux premières régions génétiques sont situées sur les chromosomes 11 et 16 : elles sont associées au mélanome et contiennent des gènes impliqués dans le processus de pigmentation. La troisième région est localisée sur le chromosome 9 (9p21) : elle inclut des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et est associée non seulement au mélanome mais également au nombre de grains de beauté. Ces recherches montrent que, outre une exposition excessive aux rayons du soleil, certaines caractéristiques génétiques s'accompagnent d'une prédisposition au mélanome (Falchi, 2009).

Les chercheurs ont également montré que des variations génétiques situées sur le chromosome 9 sont aussi associées à une augmentation du risque de carcinome basocellulaire, la forme de cancer cutanée la plus fréquente. Chez certains professionnels (jardiniers, agriculteurs, marins, pêcheurs, etc.), l'exposition chronique au soleil combinée à une certaine prédisposition génétique pourrait expliquer le développement de ces cancers.

Cancers de la peau et Produits dermo-cosmétiques – La controverse

Le cancer de la peau ne peut être directement lié à une dysfonction de la barrière cutanée. Cependant, de nombreuses substances exogènes composant les produits cosmétiques appliqués de manière répétitive sur la peau sont suspectées de favoriser l'apparition de ces cancers.

En effet, la polémique dure depuis plusieurs années déjà et ce pour les raisons suivantes : **(i)** Il est estimé que le nombre de cancers de la peau progresse régulièrement avec deux fois plus de cancers tous les dix ans. Ces estimations sont en contradiction avec l'augmentation de la consommation de produits solaires, qui a été multipliée par deux en dix ans (d'après la Fédération des industries de la parfumerie), **(ii)** de nombreuses substances physiques ou chimiques de synthèse entrent dans la composition de nombreux produits domestiques, et plus particulièrement, de produits cosmétiques (dont l'application sur la peau peut être quotidienne), ces derniers ont été proposés comme candidats potentiels favorisant le développement de cancers. En effet, depuis plusieurs années maintenant, une polémique se développe, notamment par le relais des médias et concerne la présence et la toxicité potentielle de certaines molécules dans des produits cosmétiques à usage courant. Parmi les composés incriminés nous pouvons citer : les éthers de glycol (dont le conservateur phénoxyéthanol), les parabènes, une famille de conservateurs très efficaces, ou certains filtres

solaires chimiques - tout particulièrement le 4-méthyl-benzylidène camphor (4-MBC) - censés posséder des effets perturbateurs endocriniens (Schlumpf, 2001). Enfin, nous pouvons également citer les nanoparticules de dioxyde de titane présentes dans de nombreux produits cosmétiques (crèmes solaires, dentifrice...). Des études montrent qu'à de fortes doses d'exposition, ces composés contenus dans les crèmes solaires exercent des effets indésirables sur la santé, cependant les effets de ces composés à des doses plus faibles, notamment au travers d'une exposition via des cosmétiques n'est toujours pas prouvée.

Depuis plusieurs années, la communauté scientifique reste également divisée sur le sujet car plusieurs hypothèses sont avancées. Des résultats d'études épidémiologiques montrent que l'utilisation de produits solaires pourrait représenter un risque plutôt qu'un facteur de protection contre le mélanome. Cependant, ces observations pourraient être uniquement la résultante d'un changement de comportement : les individus s'enduraient d'une mince pellicule de crème solaire et, se croyant protégés, s'exposeraient plus longtemps au soleil et ne respecteraient pas les consignes d'utilisation de ces produits (temps d'exposition, mode et fréquence d'application).

Il se peut également que l'augmentation observée actuelle des cancers de la peau puisse s'expliquer par un « effet retard ». En effet, entre le moment où un individu initie son cancer de la peau et le moment où il se déclare, il peut se passer 20 à 30 ans. Il se pourrait donc que des mélanomes qui apparaissent dans les années 1990 se soient créés en 1970, et probablement avant. Les patients d'aujourd'hui seraient donc les enfants des années 1960, époque où le bronzage était roi et les produits solaires beaucoup moins efficaces qu'aujourd'hui. Et comme les individus (en France, notamment) n'ont réellement commencé à utiliser les crèmes solaires qu'à partir des années 1990, le nombre des cancers de la peau devrait continuer de croître. Alors que 6 000 à 7 000 nouveaux mélanomes par an sont déclarés en France, en Australie, une diminution du nombre de cancers seraient observées seulement depuis 4 ans, alors que leur campagne de prévention a été engagée il y a plus de 25 ans. Enfin, il a été également proposé qu'une exposition solaire intermittente serait beaucoup plus risquée qu'une exposition régulière. Ainsi, des doses intermittentes de soleil reçues par un employé de bureau en vacances seraient beaucoup plus risquées en termes de développement de mélanome que les doses régulières reçues par un travailleur de plein air.

Reste qu'aucune étude scientifique ne peut prouver ces différentes hypothèses. Car les mécanismes de déclenchement des cancers de la peau, et notamment des mélanomes, sont

encore mal connus, de même que le mode d'action des UV. Enfin, ces études sont d'autant plus difficiles à réaliser qu'il n'existe aucun modèle animal ou modèle biologique d'étude approprié.

5.2.2. Cancers du sein, fonction barrière cutanée, Sels d'Aluminium

Le sein a deux fonctions importantes : il joue d'une part un grand rôle dans l'image que la femme a de son corps et de sa féminité. C'est d'autre part l'organe de la lactation, c'est-à-dire qu'il produit du lait pour nourrir le nouveau-né. Le sein est une glande (glande mammaire), composée de compartiments. Chacun de ces compartiments comprend des lobules et des canaux. Les lobules fabriquent du lait en période d'allaitement et les canaux le transportent vers le mamelon où il est tété par le bébé. Le sein est sous l'influence d'hormones sexuelles, fabriquées par les ovaires, de la puberté à la ménopause: **(i)** les œstrogènes favorisent le développement des seins au moment de la puberté. Ces hormones sont fabriquées au cours de la première partie du cycle menstruel ; **(ii)** la progestérone est principalement présente lors de la seconde partie du cycle menstruel. Elle complète l'action des œstrogènes. Par ailleurs, la sécrétion de lait (lactation) est sous l'influence de la prolactine, hormone fabriquée au niveau de l'hypophyse.

Les cancers du sein – Description et causes

Deux types de cancers du sein peuvent être distingués : (i) les **cancers dits "infiltrants"** lorsque les cellules cancéreuses franchissent la paroi des canaux ou des lobules ; le cancer canalaire infiltrant est la forme la plus fréquente, le cancer lobulaire infiltrant étant beaucoup plus rare. Ce type de cancers peuvent se disséminer vers les ganglions (les plus souvent touchés sont les ganglions axillaires situés au niveau des aisselles) ou d'autres parties du corps, à l'origine de tumeurs secondaires ou métastases. Les organes les plus susceptibles d'être le siège de métastases d'un cancer du sein sont les os, les poumons, le foie et le cerveau. (ii) les **cancers dits "intracanaux"** ou encore "*in situ*" si les cellules cancéreuses demeurent à l'intérieur des canaux ; ils sont le plus souvent découverts lors d'un examen de dépistage systématique par mammographie. Dans certains cas, ce cancer *in situ* peut être révélé par un écoulement de sang du mamelon ou un eczéma à ce niveau.

Ces deux types de cancers se traitent généralement de façon différente. Les cancers « infiltrants » peuvent associer des traitements locaux (chirurgie, radiothérapie) et des traitements plus généraux (chimiothérapie, hormonothérapie), alors que pour les cancers "in

situ", le traitement local peut suffire.

Les causes du cancer du sein ne sont pas connues et sont susceptible d'impliquer une combinaison de prédispositions génétiques, par exemple mutations des gènes de prédisposition BRCA1, BRCA2 et d'expositions à de multiples facteurs environnementaux. Ces derniers n'ont pas été identifiés malgré qu'un nombre important de candidats aient été désignés (Veronesi, 2005). La grande majorité des cancers du sein sont des "adénocarcinomes", c'est-à-dire qu'ils se développent dans la glande mammaire, à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) ou des lobules (cancer lobulaire).

Cancers du sein et anti-transpirants – La controverse

Depuis plusieurs années les médias font état d'un lien entre l'utilisation d'anti-transpirants ou de déodorants et le risque de développer un cancer du sein. Allégation réfutée aussi bien par les industriels que par les scientifiques car aucune étude n'a, à ce jour, permis de mettre à jour une association directe entre l'usage d'anti-transpirants et le risque de développer un cancer du sein. Cependant la controverse existe et les études restent contradictoires.

Les anti-transpirants ont pour rôle de réduire la transpiration. Les principes actifs les plus souvent utilisés pour contrôler la transpiration sont les sels d'aluminium, qui peuvent représenter jusqu'à 25% de la composition d'un anti-transpirant. La crainte et les inquiétudes soulevées viennent du fait que ces sels d'aluminium pourraient interférer avec les récepteurs aux œstrogènes et favoriser ainsi le développement de cancer du sein. Les estrogènes étant connus pour être impliqués dans le développement et la progression du cancer du sein, tout composant de l'environnement ayant une activité oestrogénique et pouvant s'infiltrer dans le sein pourrait donc, théoriquement, augmenter le risque de cancer du sein chez la femme.

Dans ce sens, différentes études ont été menées afin de mettre en évidence la pénétration cutanée potentielle des sels d'aluminium. En 1995, les travaux du professeur E. Creppy, du laboratoire de toxicologie et d'hygiène appliquée de la faculté de pharmacie de Bordeaux montraient, que chez la souris, ce métal est absorbé par la peau (Anane, 1995). Cependant, la souris est un modèle d'étude imparfait pour réaliser des études de biodisponibilité et les données ne sont donc pas transposables à l'homme (Vigilances Bulletin n°5, 2001).

En 2004, une étude a été réalisée sur une population de 437 femmes ayant développé un cancer du sein afin de définir leurs habitudes cosmétiques. Cette étude a permis de montrer une relation entre la fréquence d'application de l'anti-transpirant (deux fois par semaine), la pratique du rasage sur la zone d'applications (trois fois par semaine) et l'âge d'apparition plus

précoce d'un cancer du sein (quinze ans plus tôt). Les auteurs de cette étude suggèrent que le rasage faciliterait probablement l'absorption de l'aluminium car cette pratique fragiliserait la barrière cutanée (McGrath., 2004).

Cependant, une étude comparant les habitudes d'hygiène de deux groupes de 800 femmes, les premières atteintes d'un cancer du sein, les secondes en bonne santé n'a pas permis de montrer que l'utilisation d'un anti-transpirant à base de sels d'aluminium augmente le risque de développer un cancer du sein. (Mirick, 2002). Enfin, une revue systématique des études parues sur le sujet en 2005 dans le *Journal of Applied Toxicology*, a cependant relancé le sujet. Selon Darbre *et al.*, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'impact potentiel d'une exposition cutanée à l'aluminium sur le risque de développer un cancer du sein (Darbre, 2005).

La question est donc de définir si l'aluminium peut pénétrer la barrière cutanée, sous quelles conditions, et à quelle dose ?

A ce jour, peu d'études ont été réalisées et aucune n'a permis de donner une réponse définitive à cette question. Une étude portant sur l'absorption de chlorhydrate d'aluminium sur de la peau humaine et réalisée sur deux volontaires a permis de montrer que seulement 0,012 % de l'aluminium serait absorbé au niveau de la peau (Flarend, 2001). La peau jouerait donc efficacement son rôle de barrière face aux sels d'aluminium (Exley, 2004).

Cependant, un cas d'étude isolé montre que la situation n'est pas si simple. En effet, il a été décrit le cas d'une femme de 43 ans se plaignant d'une immense fatigue et dont la cause était une hyperaluminémie. De manière surprenante, rien dans son environnement personnel et professionnel ne l'exposait à l'aluminium. Toute source de contamination éliminée, le seul suspect proposé était le déodorant anti-transpirant de la patiente. Pendant 4 ans, cette femme a utilisé tous les jours un déodorant anti-transpirant contenant du chlorhydrate d'aluminium. Pour vérifier leur hypothèse, les chercheurs ont demandé à la jeune femme de cesser d'utiliser son déodorant. Dans les trois mois qui suivirent, la fatigue s'est atténuée, puis a disparu. Parallèlement, son taux plasmatique d'aluminium a considérablement chuté. Le déodorant anti-transpirant était donc responsable de l'hyperaluminémie. (Guillard, 2004). Ce cas ne peut refléter qu'un cas d'hypersensibilité individuelle cependant il montre la possibilité qu'a l'aluminium contenu dans des anti-transpirants de franchir la barrière cutanée et générer des troubles pathologiques significatifs.

Il est donc indispensable de définir des protocoles d'études et des méthodes d'analyses qui permettent de répondre sans ambiguïtés à ces interrogations.

5.2.3. En conclusion

Bien que ces deux types de cancer ne soient pas directement liés à l'altération de la fonction barrière, le fait que des expositions environnementales à des agents chimiques potentiellement entrés en contact avec la peau a soulevé et soulève encore de nombreuses interrogations.

La controverse est donc bien présente dans les esprits et souligne **l'important besoin (des consommateurs, des industriels, des autorités compétentes) d'apporter des réponses concrètes et donc de comprendre et d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de la fonction barrière cutanée, mais souligne également le besoin de protocoles et de méthodes d'investigations pour répondre aux problématiques d'expositions sur des spécimens biologiques.**

6. La fonction barrière et ses modèles d'études

6.1. Les modèles de peau disponibles

Les sources possibles de peaux humaines sont les biopsies, les prélèvements cadavériques ou encore les prélèvements chirurgicaux (chirurgie esthétique). Cependant, il existe un nombre important de réglementations légales et éthiques concernant l'utilisation des tissus humains. De plus, les besoins en peau humaine ne cessent d'augmenter mais leur disponibilité reste limitée par le nombre de prélèvements mais également par l'altération potentielle de la peau lors de la conservation. Ces contraintes limitent leur emploi pour des essais à une grande échelle. De ce fait, les épidermes reconstruits ont été présentés comme une alternative potentielle.

Dans l'optique de définir un modèle tissulaire d'intérêt, deux critères majeurs doivent être pris en considération : **(i)** le modèle animal devra être phylo-génétiquement aussi proche que possible de l'homme et **(ii)** reproduire le plus fidèlement possible les processus physiologiques/ biochimiques d'intérêts et conserver une structure morphologique/anatomique similaire.

De plus, le choix de l'approche expérimentale et du modèle cutané pour l'étude de l'absorption de molécules chimiques est une étape clé qui peut être envisagée de façon différente selon les objectifs de l'étude et des possibilités techniques. Plusieurs approches expérimentales sont possibles : (i) **l'approche *in vivo*** qu'elle soit menée chez l'animal ou

l'homme et (ii) **l'approche ex vivo**, au moyen d'explants cutanés d'origine animale ou humaine. Le choix du modèle et de l'approche expérimentale se basera sur différents critères : **(i)** les critères scientifiques avec la pertinence physiologique du modèle choisi (l'espèce, la structure de la peau), sa prédictibilité (son extrapolation à l'homme) et la fréquence de son utilisation dans les études déjà publiées ; **(ii)** les critères éthiques et réglementaires (notamment pour les approches *in vivo* sur l'animal et l'homme) ; **(iii)** les critères économiques, techniques (facilité de mise en œuvre) et statistiques (reproductibilité du modèle).

L'approche in vitro dite « organotypique »

Bien que la peau soit un organe accessible, étendu, visible, permettant une étude relativement facile *in vivo*, il est très difficile d'appliquer l'ensemble des protocoles de recherche nécessaire à l'étude d'un tissu complexe. De plus, pour des raisons éthiques, les investigations *in vivo* chez l'homme sont limitées. Et les modèles animaux ne peuvent apporter que des réponses partielles du fait de différences significatives entre peaux animales et peaux humaines (histologie, pilosité,...).

Pour palier à ces inconvénients, les études *in vitro*, c'est-à-dire utilisant des cellules humaines isolées et mises en culture, sont de plus en plus nombreuses. Ces études sont très intéressantes en ce qu'elles permettent d'étudier et d'élucider un certain nombre de mécanismes. Mais elles présentent le problème inverse des études réalisées sur le vivant: les modèles sont trop simples et ne reflètent pas, ou pas assez, les phénomènes observés *in vivo*. De plus, ces cellules sont très souvent cultivées en monocouche, ce qui ne reproduit pas l'environnement habituel des cellules dans l'organisme humain où elles se déploient généralement dans une structure tridimensionnelle.

Ainsi, après avoir longtemps utilisé des cultures en monocouche de lignées cellulaires pour les tests d'efficacité et de toxicité, la recherche a aujourd'hui intégré les nombreux progrès réalisés en ingénierie tissulaire qui ont permis le développement de nombreux modèles tridimensionnels tels que les modèles de dermes et d'épidermes reconstruits mais également les modèles de peaux reconstruites, la plupart de ces modèles étant aujourd'hui réalisés à partir de cellules humaines non issues de lignées et non transformées. En effet, outre les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules de Langerhans qui assurent respectivement les fonctions de pigmentation et d'immunité ont été intégrées dans des modèles plus perfectionnés.

En 1975, J.-G. Rheinwald et H. Green, sont parvenus à cultiver en série des kératinocytes sur une trame de fibroblastes nourriciers. Une fois ensemencés, les kératinocytes établissent des colonies pour finalement former un lambeau. Ce premier substitut d'épiderme, ainsi généré, est constitué de plusieurs couches de kératinocytes humains mais ne possède pas encore de couche cornée fonctionnelle (Rheinwald, 1975).

Les champs d'application de ces modèles sont nombreux et les modèles reconstruits *in vitro* permettent, par la recherche fondamentale, une meilleure compréhension des interactions des différents constituants cellulaires et moléculaires au sein de la peau normale. Ces modèles permettent également d'envisager des tests alternatifs aux modèles animaux qui tendent à être supprimés en cosmétique. Ces systèmes sont aujourd'hui de plus en plus utilisés notamment lors des phases de développements de principes actifs cosmétiques afin d'identifier de nouvelles molécules actives.

L'approche *in vitro* dite « organotypique » consiste donc à reconstruire de la peau à partir de cellules humaines en culture et d'éléments matriciels. Tous les modèles développés possèdent en commun un support de culture pour les kératinocytes et l'exposition de la culture à l'air. Ainsi, le modèle de peau reconstruite peut comporter un épiderme différencié, mais aussi un derme équivalent vivant contenant des fibroblastes. Dans ces modèles, le derme reconstruit est généralement une matrice poreuse à base de collagène dont la structure tridimensionnelle permet l'adhésion, la prolifération et la migration de fibroblastes qui sont ensemencés à leur surface. À l'intérieur de ce derme reconstruit, les fibroblastes peuvent proliférer et synthétiser toutes les molécules présentes dans la matrice extracellulaire (collagènes de type I et III, fibronectine, laminines, glycosaminoglycanes, etc.) afin de créer un tissu pouvant progressivement libérer par exemple des facteurs de croissance et servir ensuite de base pour l'élaboration d'une peau reconstruite. Afin d'obtenir une peau reconstruite, des kératinocytes humains sont ensemencés. Ces kératinocytes se différencient rapidement en un épiderme pluristratifié. Cet épiderme est caractérisé par une couche de cellules basales organisées et adhérentes, et par des couches suprabasales dans lesquelles sont identifiés les principaux marqueurs de la différenciation (filaggrine, transglutaminase et involucrine) ainsi que les kératines 10 et 14.

L'approche ex vivo

Les études d'absorption percutanée sont menées sur des modèles animaux et sur l'homme (Griesemer, 1958 ; Kondritzer 1959 ; Fredriksson, 1960 ; Craig, 1977 ; Maxwell, 1987 ; Knezevic, 1993 ; Huong, 2009). L'utilisation de modèle biologique de type « explant cutané *ex vivo* » permet de se rapprocher des conditions *in vivo* et d'étudier la réponse de la peau dans son ensemble à différents agents de stress ou traitements pharmacologiques. **Un modèle *ex vivo*** est relativement facile d'utilisation.

La culture d'explant de peau humaine maintenu en survie a commencé à être développée il y a une vingtaine d'années. Des études morphologiques et biochimiques montraient déjà une capacité de différenciation épidermique de l'explant identique à celle de la peau (Holbrook, 1983).

Les différences de perméabilité des peaux animales par rapport à la peau humaine, rendent difficile l'extrapolation des résultats à l'homme. Depuis ces 20 dernières années, les modèles animaux les plus utilisés dans le cadre de l'absorption percutanée demeurent le porc, le cochon d'Inde, la souris et le rat (Van Genderen, 1985 ; Knezevic, 1993 ; Chilcott, 2003 ; Hamilton, 2004 ; Chilcott, 2005). La peau des rongeurs, deux à trois fois plus fine que la peau humaine, n'apparaît pas être le modèle expérimental le plus adapté en vue d'une extrapolation à l'homme. Des modifications génétiques de ces animaux peuvent cependant permettre d'intensifier ou d'atténuer une caractéristique physiopathologique de l'espèce (cochon d'Inde sans poils ou hairless).

La peau de porc et plus récemment la peau d'oreille de porc, de structure proche de celle de la peau humaine (épaisseur, composition lipidique du *stratum corneum*, densité pileuse. . .) sont aujourd'hui les modèles de référence pour étudier l'absorption percutanée et pour tester l'efficacité de la protection de la peau vis-à-vis de certaines substances chimiques (Barbero, 2009 ; Chilcott, 2005 ; Dick, 1992).

Certains auteurs ont également utilisé des modèles de souris chimères (souris athymiques hairless greffées avec de la peau humaine (Reifenrath, 1984 ; Van Genderen, 1985). Cependant, ce modèle nécessite une technicité particulière et des délais importants puisque six à huit semaines sont nécessaires à la prise du greffon.

6.2. Les modèles d'étude disponible : FB (Modèle diffusion passive)

L'absorption percutanée proprement dite correspond au transfert d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. Elle peut être définie comme la somme de trois événements successifs : un contact au niveau de la couche cornée, une pénétration au travers de chaque structure du tégument (couche cornée, épiderme vivant, derme et annexes pilosébacées) et une phase de résorption dans la microcirculation dermique papillaire et lymphatique.

Anatomiquement, deux voies distinctes s'offrent pour la pénétration des substances : **la voie transannexielle** (via les follicules pilosébacés et/ou les glandes sudoripares) et **la voie transépidermique** (au travers de la couche cornée). La diffusion à travers la couche cornée peut s'effectuer par passage transcellulaire direct et par passage intercellulaire dans les espaces tortueux laissés libres entre les cornéocytes. La pénétration percutanée d'une substance est influencée par plusieurs facteurs déjà décrits page 53.

Les études sur la pénétration transcutanée sont souvent réalisées à l'aide de systèmes statiques comme la cellule de Franz où un bout de peau excisée agit comme une sorte de membrane entre la substance appliquée sur la couche cornée et un liquide situé de l'autre côté (côté derme), qui est alors récupéré et analysé. Ce type d'expérience est standardisé et fréquemment utilisé pour étudier la perméabilité de la peau à différentes espèces moléculaires.

Cette approche développée, notamment par Franz et Bronaugh (Franz, 1975 ; Bronaugh, 1982), est maintenant largement utilisée pour quantifier l'absorption percutanée (Franz, 2009 ; Fini, 2008 ; Blank, 1957). Un échantillon de peau isolée « explant cutané » est placé dans une cellule de diffusion en verre ou en Téflon. La peau délimite ainsi deux compartiments : un compartiment donneur (ou épidermique) et un compartiment receveur (ou dermique). La face dermique de la peau est en contact avec un liquide thermostaté qui hydrate et maintient l'intégrité physiologique de l'explant cutané. La substance à étudier, pure, dissoute ou dispersée dans un solvant ou un excipient, est déposée sur la face supérieure épidermique de la membrane. La substance qui diffuse à travers la peau pendant la durée de l'expérimentation est dosée périodiquement dans le compartiment receveur. Il existe deux types de cellules de diffusion : les cellules statiques où le compartiment récepteur présente un volume de liquide fixe et les cellules dynamiques (ou à flux continu) dans lesquelles le liquide receveur est constamment renouvelé (Boudry, 2008). Les prélèvements continus de fractions du liquide receveur maintiennent un gradient de concentration limitant ainsi l'accumulation de la substance qui a

diffusé dans le compartiment receveur. Les cellules statiques, de mise en œuvre simple, sont préférées pour les études de mise au point. Les cellules dynamiques sont privilégiées pour les études sur le métabolisme cutané (Bronaugh, 1982). Différents systèmes, décrits dans la littérature, ont été développés.

L'avantage de la cellule de Franz est qu'elle permet une analyse quantitative de la fonction barrière physique du tissu. Cependant, aucune information n'est disponible sur les voies de pénétrations. Notamment, des processus de diffusion via un follicule pileux peuvent survenir. Le follicule pileux peut être tronqué du côté dermique et jouer alors un rôle de « tunnel » de transport des différentes espèces moléculaires testées. Dans ce cas, la mesure apparente de la pénétration dans cette expérience *in vitro* ne permet pas de conclure vis-à-vis d'une pénétration *in vivo*.

La surface de la peau peut être couverte (conditions occlusives), semi-couverte (conditions semi-occlusives) ou exposée à l'air ambiant (conditions non-occlusives). L'intérêt principal de l'occlusion est de limiter l'évaporation de certains composés volatils. Elle entraîne cependant une hydratation du *stratum corneum* avec une réduction de sa densité (fluidification des ciments intercellulaires), une augmentation de la température et du pH cutanés (Reifenrath, 1991 ; Bronaugh, 1982). L'exposition sous occlusion augmente d'un facteur deux à dix l'absorption percutanée des pesticides chez l'homme.

Les explants cutanés peuvent être d'origine humaine ou animale. Les explants de peau humaine sont issus de plasties chirurgicales (déchets opératoires d'abdomino-plasties ou mammoplasties) ou de prélèvements post-mortem 24 heures au maximum après le décès (Guidance document for the conduct of skin absorption studies. 2004). Les explants cutanés sont utilisés frais ou congelés, la perméabilité de la peau n'étant pas altérée par la congélation (à -20°C pendant 12 mois) (Harrison, 1984). L'approche *ex vivo* est menée sur des explants entiers (épaisseur totale de la peau), sur des explants dont l'épaisseur est réduite (peaux dermatomées), sur des épidermes isolés ou sur des peaux perfusées. L'utilisation de la peau entière se justifie quand la peau est très fine (inférieure à 1 mm), comme pour la souris ou le lapin et/ou est difficile à dermatomer (Guidance document for the conduct of skin absorption studies. 2004). La présence du derme profond et l'absence de circulation sanguine peuvent cependant ajouter une barrière supplémentaire aux molécules lipophiles qui s'y accumulent. Une alternative consiste alors à utiliser de la peau dermatomée où l'épaisseur de la peau est réduite à l'épiderme et à une partie du derme papillaire superficiel. L'utilisation d'un dermatome

représente la méthode la plus répandue et la plus reproductible pour la préparation de ces échantillons cutanés. L'épaisseur ainsi normalisée de ces membranes (de 200 à 500 μm) permet de réduire les variations inter-échantillons et d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Les membranes épidermiques représentent une alternative valable pour s'affranchir totalement du derme. La préparation de ces épidermes isolés est cependant délicate et peut altérer l'intégrité physiologique du prélèvement. Ainsi, la séparation thermique de l'épiderme par chauffage de la peau inactive certaines enzymes cutanées et modifie l'absorption percutanée de certains composés (Loden, 1985). D'autres techniques de séparation de l'épiderme et du derme sont néanmoins disponibles : une séparation enzymatique dans des bains de protéases (trypsine/collagénase), chimique par immersion dans des solutions de sels de bromide, de thiocyanate (Bronaugh, 1982) et mécanique par étirements ou par aspirations de la peau (Rosett, 1967 ; Kiistala, 1968).

6.3. Les différents protocoles d'altérations physiologiques de la fonction barrière

Il est admis que la perméabilité de l'épiderme provient des composants extracellulaires enrichis en lipides de la couche cornée. Ces lamelles lipidiques intercellulaires pourraient en effet médier la perte d'eau transcutanée et jouer un rôle vital dans la fonction barrière. Le tape stripping, l'exposition à des solvants (acétone) ou à des détergents sont connus pour perturber cette barrière perméable et entraîner des réponses homéostatiques dans les couches sous jacentes de l'épiderme qui entraîne alors un recouvrement de la barrière.

Délamination par arrachages du stratum corneum par des adhésifs (Tape Stripping). Après sa description par Pinkus (Pinkus, 1951), la méthode de tape stripping est devenue une méthode standard dans la recherche en dermatologie (Surber, 1999). Le *Tape stripping* altère la fonction barrière de façon mécanique. Le *stratum corneum* est arraché par plusieurs passages d'adhésif. Cette méthode peut être utilisée afin d'obtenir une peau plus sensible, plus fine avant l'application d'irritants (Nangia, 1998) ou d'allergènes (Kondo, 1998). Similairement, le tape stripping est utilisé afin d'induire une altération définie de la barrière hydrique afin d'évaluer l'effet subséquent à une application de produits dans la restauration de la barrière (Fluhr, 1999). Elle peut aussi être utilisée afin d'étudier la qualité de la couche cornée (Ghadially, 1995). En dermato-pharmacologie, la fonction barrière de la couche cornée (Van Der Valk, 1991),

la bio-disponibilité et la bio-équivalence de médicaments à application topique (Hoystynek, 2001) peuvent aussi être évalués grâce à cette méthode.

Bien qu'une attention considérable a été portée à tenter de comprendre les mécanismes de l'irritation cutanée, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui suivent un contact avec un irritant sont toujours peu connus.

Le Sodium Dodécyl Sulfate est un surfactant largement utilisé dans le but d'altérer la fonction barrière de la peau et d'étudier les mécanismes induits ou la pénétration d'agents exogènes sur des peaux altérées. Les lipides dans la couche cornée constituent la première barrière perméable de la peau. Cette barrière de lipides existe dans l'espace intercellulaire sous forme de bicouches lamellaires très organisées (Madison, 1987 ; Swartzendruber, 1989). Il était donc raisonnable de penser que les solutions surfactantes appliquées sur la peau pourraient émulsifier et altérer la barrière lipidique de la couche cornée et ainsi augmenter la perméabilité cutanée. En effet, des études ont montré que l'exposition de la peau à un surfactant altère l'organisation structurale des lipides qui composent la couche cornée. Il induit aussi expérimentalement une dermatite de contact chez l'animal et chez l'homme (Tupker, 1997) et entraîne une augmentation de la perméabilité de la couche cornée à l'eau et à d'autres composés.

L'acétone. Les propriétés de perméabilité de la barrière de la peau sont médiées par une série de multicouches lipidiques, enrichies en céramides, cholestérol et acides gras libres cloisonnés dans les interstices de la couche cornée. (Elias, 1983). L'acétone est un solvant organique qui altère la fonction barrière en extrayant les lipides de la couche cornée (*peeling chimique*). Ceci entraîne une réduction significative des bicouches lamellaires et une dilatation lacunaire au sein des domaines intercellulaires. L'acétone a été utilisée à des fins différentes. Par exemple des souris hairless exposées à de l'acétone ont été utilisées afin d'étudier la régulation de la synthèse de lipide épidermique participant à l'homéostasie cutanée (Feingold, 1991). Ce même modèle a permis de mettre en évidence qu'une altération de la barrière avec de l'acétone entraîne une augmentation de la TEWL ainsi qu'une absorption accrue de composés exogènes (hydrochloride de lidocaine) (Tsai, 1996).

De nombreuses études ont mis en évidence que des anomalies lipidiques dans la couche cornée sont, au moins en partie, sinon entièrement responsables de la pathogenèse de l'altération de la fonction barrière comme ce qui apparaît dans le psoriasis, les ichtyses, la

dermatite atopique, les irradiations ultra violettes pour les nouveaux nés prématurés (Elias, 1984 ; Ghadially, 1992). Les caractéristiques de perméabilité de la peau altérée par l'acétone à différents composés pourraient avoir des implications pour la perméabilité de médicaments dans le cas de nombreuses formes de désordres de la peau.

Exposition aux rayonnements ultraviolets. L'exposition de la peau aux rayonnements ultraviolets induit de nombreuses réponses dans ce tissu telles que des érythèmes, de l'hyperprolifération, la desquamation (Kondo, 1993 ; Farr, 1985 ; Nordlund, 1981) et aussi une intégrité de perméabilité de la barrière épidermique compromise qui est dose dépendante (Haratake, 1997). Des études ont montré que les irradiations UV de peaux de mammifères altèrent la perméabilité de la fonction barrière de la peau, accompagnée par une augmentation de la perte d'eau transépidermique et des altérations du profil lipidique de la couche cornée (Meguro, 1999 ; Takagi, 2004). Les mécanismes moléculaires et cellulaires au travers desquels les rayonnements UVA, et UVB en particulier, sur la distribution du calcium dans l'épiderme ne sont toujours pas élucidés à ce jour. Des études réalisées sur des souris Hairless montrent qu'une altération de la distribution du calcium (présence d'agrégats calciques dans les espaces intercellulaires du *stratum corneum*) se produit en réponse à une irradiation UVB et se maintient plusieurs jours après exposition (Jiang, 2007). Il est, cependant, aujourd'hui difficile de définir si les modifications de concentrations calciques doivent être attribuées à une conséquence des désordres associées à l'altération des profils lipidiques et aux différents mouvements d'eau ou bien si elles définissent une réponse moléculaire précise initiée par les conséquences directes des UV (dommages ADN,...). Des études sont encore nécessaires afin de définir précisément les mécanismes moléculaires et cellulaires associés.

OBJECTIFS DE LA THESE

Bien que le rôle protecteur de la peau vis à vis du monde extérieur soit bien établi, les mécanismes intrinsèques de cette fonction barrière restent encore mal définis dans leur totalité. Cette fonction barrière peut être altérée dans le cas de pathologies ou soumise à des expositions répétées à différents stress dont les conséquences physiopathologiques restent à démontrer. Il apparaît donc nécessaire **de développer et valider des modèles de peau qui permettront d'étudier cette fonction barrière** dans des conditions dites « basales », afin d'établir les mécanismes de régulation (protéiques, ioniques, lipidiques) impliqués et leur modulation vis-à-vis d'agents exogènes ou de conditions dites de « stress ». De plus, il est important de mettre en place des **outils d'analyses qui autorisent l'étude du tissu dans son intégralité, le suivi de molécules d'intérêts au sein de ces mêmes tissus afin d'obtenir des données qualitatives et quantitatives sur les aspects structuraux et fonctionnels du tissu considéré.**

Au laboratoire, nous disposons d'un outil d'analyse, **la microsonde nucléaire, qui combine ces différents aspects, à savoir (i) cartographier un tissu biologique d'intérêt (ii) suivre des agents chimiques ou physiques exogènes, (iii) obtenir des données quantitatives sur la composition chimique élémentaire, tout en maintenant sa structure 2D.**

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai mis en œuvre des protocoles de préparation d'échantillons spécifiques combinant des techniques de culture cellulaire, de dermo-cosmétique, de biologie cellulaire, de physique et de chimie.

1. En collaboration avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre, j'ai étudié deux aspects : **(i) l'homéostasie ionique dans des conditions définies (temps, milieu de culture), (ii) puis à partir de ces conditions expérimentales, des méthodes d'altération de la fonction barrière ont été appliquées afin de définir précisément l'impact de ces différents stress sur l'homéostasie ionique de l'épiderme.** Ainsi, j'ai pu précisément définir par comparaison l'effet d'une exposition au Sodium Dodécyl Sulfate et aux ultraviolets sur la distribution ionique de peau d'oreille de porc maintenue en survie.

Ces trois années d'études m'ont permis de préciser et de souligner l'intérêt de ce modèle pour l'étude de la fonction barrière cutanée mais aussi pour de futures applications en recherche dermo-cosmétique. Mes travaux m'ont également permis de préciser le mode de pénétration transcutanée du SDS en fonction de la topologie tissulaire. Cette pénétration transcutanée de SDS s'accompagne de modifications précises et spécifiques de l'homéostasie ionique

(distribution, quantification). Cette étude permet également de souligner une voie préférentielle de pénétration transcutanée (follicule pileux).

2. En parallèle, nos techniques d'analyses ont été appliquées à **l'étude de la pénétration transcutanée de composés dermo-cosmétiques, tel que les oxydes d'aluminium**. Cette étude réalisée à partir d'expérience de diffusion passive appliquée à des peaux d'oreille de porc a été menée en collaboration avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre. Ainsi, différentes formulations cosmétiques contenant des oxydes d'aluminium ont été appliquées et testées. Mes résultats ont permis notamment de définir quantitativement la répartition et la distribution des différentes formulations d'oxydes d'aluminium sur et dans les peaux. Notre analyse par microfaisceau d'ions n'a pas révélé de présence d'aluminium dans les différentes couches de peaux de porc exposées.

3. Enfin, dans la continuité des études réalisées afin de déterminer **le rôle de la fonction barrière de la peau en réponse à des agents exogènes de type particulaire ou nanoparticulaire**, je me suis attachée à développer et à valider une approche expérimentale afin de réaliser la détection et le suivi de nanoparticules à l'échelle cellulaire et tissulaire. Ces études ont pour but de définir notamment la toxicité de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2). Ces nanoparticules, utilisées comme filtre physique anti-UV dans les crèmes solaires, sont en effet des candidats potentiels au franchissement de la barrière cutanée et suspectés de jouer un rôle délétère dans la genèse et le développement de pathologies cutanées graves comme le cancer.

Ainsi, afin de définir la **nanotoxicité *in vitro* des nanoparticules de TiO_2** , j'ai mis en œuvre une **méthodologie expérimentale combinant différentes techniques d'imagerie en association avec des techniques de fonctionnalisation chimique des nanoparticules** et appliquée à l'étude de cultures cellulaires de kératinocytes primaires humains. L'internalisation des nanoparticules de TiO_2 par les kératinocytes entraîne une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire associée à une diminution de la prolifération cellulaire (en absence de mort cellulaire). L'internalisation des nanoparticules de TiO_2 induit également une différenciation précoce des kératinocytes. L'état de fonctionnalisation des nanoparticules définit également le niveau de toxicité.

L'ensemble de ces résultats est donc présenté dans la suite de ce manuscrit.

FONCTION BARRIERE et PEAU D'OREILLE de PORC

**Application des techniques d'analyse par faisceau d'ions à la caractérisation d'un
modèle de peau de porc maintenu en survie**

Cette partie résume l'ensemble des données expérimentales obtenues par microfaisceau d'ions lors l'étude de l'homéostasie ionique d'un modèle de peau de porc maintenue en survie.

Au cours de cette étude, je distingue trois phases préparatoires. Une première phase concerne la réception et la préparation des échantillons afin de les maintenir en culture. Cette phase a été réalisée à l'Institut de recherche Pierre Fabre (3 campagnes). J'ai toutefois participé à ces protocoles de conditionnement des échantillons. Cette étape concerne également une phase de contrôle de la qualité et de l'intégrité des échantillons (tests biochimiques, notamment) qui a été établie et réalisée par D. Bacqueville. Une seconde phase concerne les protocoles d'expositions aux différents stress. Ces différentes procédures expérimentales ont été définies initialement par A. Mavon et D. Bacqueville (Institut de recherche Pierre Fabre).

Enfin, une phase de préparation des échantillons plus spécifiques à l'analyse par microfaisceau d'ions a été définie au CENBG et réalisée par mes soins.

FONCTION BARRIERE et PEAU D'OREILLE de PORC

MATERIEL ET METHODES

1. Réception et préparation des oreilles

Les oreilles de porc fraîchement découpées sont reçues directement de l'abattoir de Montauban. Afin de maintenir l'intégrité de la barrière de la peau, les oreilles sont prélevées directement après le sacrifice de l'animal avant que la carcasse ne soit exposée aux procédures de nettoyage à haute température. Les études sont réalisées sur des cochons domestiques femelles de 6 mois (Pietrain breed) sacrifiés le jour des expériences.

Dès réception, les oreilles sont triées, lavées à l'eau froide à l'aide d'une solution antiseptique (Cytéal®) puis disséquées au scalpel afin d'en sélectionner la zone centrale. Les explants sont alors dermatomés à 500 µm d'épaisseur à l'aide d'un dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) puis des biopsies de 12 mm sont réalisées. Les zones de prélèvements sont choisies exemptes d'égratignures, de rougeurs ou autres lésions qui pourraient affecter la réponse du tissu aux différents stress imposés. Avant leur mise en culture, les explants sont rincés 1 heure dans du milieu de culture à 37°C sous agitation, dans un incubateur, en atmosphère humide en eau 5% CO₂ (v/v). Le milieu de culture utilisé est du Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) complété avec 1 mM de pyruvate, 8 mM glutamine, 100 U pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 µg de gentamycine, 2.5 µg/ml de fongizone et finalement, un cocktail d'acides aminés essentiels et non essentiels. Les explants de peau sont alors ensemencés coté derme vers le bas dans des inserts Transwell polycarbonate (12 mm de diamètre, pores de 12 µm de diamètre, Corning Life Sciences) dans des plaques 12 puits sur 1 ml de milieu de culture. Ce système de culture d'organe *ex vivo* maintient les explants à l'interface air-liquide. Le derme et l'épiderme sont nourris par diffusion des nutriments au travers de l'insert. Le milieu de culture est changé 2 heures après ensemencement et les peaux sont cultivées au maximum 24 heures pour chaque expérience.

Les peaux sont ensuite soumises à différents stress nécessitant des traitements différents.

2. Validation du maintien en survie de la peau d'oreille de porc pendant 24 heures

-Congélation à réception (**T0**) : Les explants sont congelés rapidement dans de l'isopentane refroidi à -90°C ou -150°C par de l'azote liquide puis conservés à -80°C ou dans de l'azote liquide. Ces échantillons serviront de contrôles puisqu'ils n'auront subi aucune exposition ni mise en culture.

-Congélation après 24 heures en culture (**T24**) : 24 heures après la mise en culture, les explants sont congelés rapidement dans de l'isopentane refroidi à -90°C ou -150°C par de l'azote liquide puis conservés à -80°C ou dans de l'azote liquide. Ces échantillons maintenus 24 heures en culture seront comparés au T0 afin de vérifier que le maintien en survie du tissu n'altère pas les compositions et les distributions ioniques.

3. Réponse de la peau d'oreille de porc face à des stress chimiques

-SDS (sodium dodécyl sulfate) **2% (v/v) (SDS)** : Les explants sont alors mis en culture à l'interface air/liquide (air / DMEM complet). 2 heures après, 20 µL de SDS 2% (v/v) (BioRad) sont déposés sur chaque explant à traiter. La dilution du SDS a été réalisée dans une solution d'eau distillée. Le milieu DMEM est changé à ce moment. 24 heures plus tard, les explants sont congelés rapidement dans de l'isopentane refroidi à -90°C ou -150°C par de l'azote liquide puis conservés à -80°C ou dans de l'azote liquide.

Ces échantillons seront comparés aux échantillons maintenus 24 heures en culture afin de mettre en évidence si les expositions à ces différents détergents induisent une réponse du tissu maintenu en survie, au niveau morphologique ou ionique.

4. Réponse de la peau d'oreille de porc maintenue en survie à un stress physique

-UV 5 DEM (**UV**): (DEM:dose érythémale minimale). Les explants sont alors mis en culture à l'interface air/liquide (air/DMEM complet). 2 heures après, les explants sont irradiés à 5 DEM (SunTest Atlas VIGOULET, Lampe xénon, énergie 450 W/m²). Avant exposition, 500 µL de DMEM complet sont rajoutés dans les puits de culture pour compenser l'évaporation à l'intérieur du Sun TEST. Le milieu est remplacé par du milieu frais après traitement pour tous les explants. Après 24 heures de culture, les explants sont congelés rapidement dans de l'isopentane refroidi à -90°C ou -150°C par de l'azote liquide puis conservés à -80°C ou dans de l'azote liquide.

-Contrôles UV internes (**No UV**) : Les explants sont alors mis en culture à l'interface air/liquide (air / DMEM complet). 2 heures après, les explants sont placés dans le SunTest

(SunTest Atlas VIGOULET, Lampe xénon, énergie 450 W/m²) mais recouverts par du plastique opaque. Avant irradiation, 500 µL de DMEM complet sont rajoutés dans les puits de culture pour compenser l'évaporation à l'intérieur du SunTEST. Le milieu est remplacé par du milieu frais après traitement pour tous les explants. Après 24 heures de culture, les explants sont congelés rapidement dans de l'isopentane refroidi à -150°C par de l'azote liquide puis conservés dans de l'azote liquide.

5. Coupes des échantillons

Les échantillons sont montés à l'aide de Tissue Tek sur le support de coupe puis des coupes de tissus de 16 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryo-microtome (CM-3500, Leica) équipé d'un couteau en inox refroidi à -25°C.

Les coupes sont alors soit montées sur lames Superfrost (REF) puis séchées une nuit à température ambiante avant d'être conservées à -80°C, soit placées dans une enceinte refroidie à -30°C pour compète lyophilisation. Les coupes lyophilisées peuvent alors être conservées à température ambiante et placées sur des supports dédiés à l'analyse par microfaisceau.

6. Coloration histologique

Une coloration de routine à l'hématoxyline-éosine permet de visualiser de façon satisfaisante les composants cellulaires des tissus cutanés. Il nous est alors possible, par simples observations microscopiques, de déceler les éventuels changements morphologiques induits par les différentes conditions expérimentales.

Les coupes cryofixées et conservées à -80°C sont ramenées à température ambiante. 10 minutes dans un bain d'hématoxyline permettent sa fixation sur les noyaux cellulaires et donc leur coloration en une teinte violette. Cette étape est suivie d'un bain d'alcool chlorhydrique fumant puis d'une immersion dans une solution d'éosine à 2% (v/v) pendant 2 minutes. Cette étape permet la coloration des cytoplasmes cellulaires en une teinte rose à rouge. La déshydratation du tissu par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70°, 95°, 100°) est suivie par une fixation avec du toluène. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelles à l'aide de milieu de montage EUKITT.

7. Immunohistofluorescence

Les coupes sont déposées sur lames superfrost, séchées sur la nuit à température ambiante, puis conservées à -80°C. Afin de réaliser l'immunohistofluorescence, les coupes sont ramenées à température ambiante, puis fixées dans un bain d'acétone, 20 minutes à -20°C. Les coupes sont alors séchées à température ambiante pendant 15 minutes puis lavées 2 fois dans un bain de TBS 1X. Ceci est suivi d'une étape de perméabilisation/saturation dans un tampon TBS1X/sérum de veau fœtal/ Triton X-100, 30 minutes à température ambiante. Les coupes sont mises en présence de l'anticorps primaire d'intérêt sur la nuit à 4°C.

2 rinçages dans un bain de TBS1X avant la mise en présence de l'anticorps secondaire.

8. Analyse des échantillons par microfaisceau d'ions

L'analyse des coupes est réalisée à l'aide de la microsonde nucléaire du CENBG sur la plateforme AIFIRA. La répartition des différents éléments est analysée sous vide par un faisceau de protons d'une énergie de 1,5 MeV. Les méthodes d'analyse PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*), RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*) et STIM (*Scanning Transmission Ion Microscopy*) sont utilisées simultanément afin de déterminer la composition élémentaire (P, S, Cl, Al...), la masse organique sèche et la structure des tissus analysés. Les détecteurs sont de type Si(Li) 80 mm² de surface active pour la détection des photons X et de type Si intrinsèque (PIPS – Canberra) pour les particules diffusées et transmises.

FONCTION BARRIERE et PEAU D'OREILLE de PORC

RESULTATS

1. Analyse par microfaisceau d'ions et traitement de données

1.1. Acquisition

L'acquisition des données est une procédure qui gère quatre tâches différentes : **(i)** le contrôle du balayage du faisceau sur l'échantillon, **(ii)** la collecte des données sur deux voies d'acquisition (PIXE, RBS), **(iii)** leur mise en forme en ligne sous forme de spectres et de cartographies, **(iv)** et enfin leur mémorisation.

Les données stockées en fin d'acquisition sont : **(i)** les énergies de diffusion des particules et l'énergie des photons détectés, **(ii)**, la position du faisceau lors de l'impact sur la cible pour chaque événement détecté (particule ou photon X).

L'ensemble des événements détectés au cours de l'analyse est stocké dans la mémoire du système sous forme de fichier **.dat**. Après l'acquisition, ces fichiers peuvent être exploités afin d'obtenir les résultats quantitatifs sur la composition chimique élémentaire de l'échantillon analysé. Au cours de chaque analyse, il est possible de suivre l'évolution des spectres PIXE et RBS ainsi que la construction des quatre cartographies élémentaires. A la fin de chaque balayage, tous les événements qui se sont produits sont triés en énergie ou en position, de façon à incrémenter les spectres et les cartographies.

1.2. Sélection de zones d'analyses

1.2.1. Distributions chimiques spécifiques / Sélection de zones

La couche cornée est constituée de cellules enrichies en protéines et de domaines intercellulaires enrichis en lipides. Cette couche joue un rôle important dans la formation de la barrière physiologique qui résulte de la différenciation des kératinocytes au sein de l'épiderme. Les kératinocytes produisent, entre autres, des kératines entrant dans la composition des filaments intermédiaires intracellulaires. Les kératines contiennent de la cystéine, un acide aminé soufré. Enfin, ces protéines contribuent pour 80 à 90% à la masse de l'épiderme ce qui explique donc la grande quantité de soufre détectée au niveau de la couche cornée.

La distribution en phosphore peut être expliquée par la présence des acides nucléiques à l'origine de la source d'énergie cellulaire, l'ATP, mais également des ARN et de l'ADN contenu dans les cellules, et enfin des phospholipides des membranes cellulaires.

1.2.2. Obtention du spectre associé

Afin de déterminer la concentration en minéraux dans des zones particulières ou d'intérêt de l'épiderme des échantillons analysés, il est possible de sélectionner ces zones et de construire les spectres locaux associés. Les zones d'intérêt des échantillons analysés peuvent alors être sélectionnées à l'aide du logiciel **SupaVISIO**. Les spectres associés ou spectres par zone sont alors enregistrés afin de permettre l'extraction des données quantitatives (masse organique de l'échantillon et composition chimique élémentaire) à l'aide des logiciels **Gupix** et **RUMPIN**. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la couche cornée et à la couche vivante de l'épiderme.

1.3. Traitement des spectres RBS (RUMPIN) et des spectres X (Gupix) – Extraction des données quantitatives et définition de l'incertitude sur la mesure.

Le programme RUMPIN permet d'ajuster au spectre expérimental la simulation du spectre en énergie des particules diffusées dans l'échantillon. Cet ajustement permet d'obtenir deux données essentielles à l'obtention des concentrations : **(i) la masse de la zone analysée en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$** . L'épaisseur de la cible et la stœchiométrie des principaux éléments constitutifs de l'échantillon (C, H, N, O majoritairement) permettent de déterminer la masse moyenne de la matrice organique. Elle est exprimée en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; **(ii) la correction pour l'atténuation des rayons X dans l'échantillon**. Des facteurs de correction sont aussi calculés à l'aide de ce programme. Ils permettent de tenir compte de l'auto-absorption du rayonnement X dans la cible elle-même ainsi que de la variation des sections efficaces d'ionisation en fonction du ralentissement des particules incidentes.

Le programme Gupix a été mis au point à l'université de Guelph au Canada. Il permet un ajustement des spectres expérimentaux et détermine la concentration (en masse surfacique) de chaque élément présent dans la zone analysée de l'échantillon.

Une fois déterminé : **(i) la masse** de l'échantillon en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et **les facteurs de correction** par simulation du spectre expérimental avec RUMPIN et **(ii) la concentration** des minéraux en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ avec le programme Gupix, il est alors possible de définir la composition chimique élémentaire de l'échantillon en obtenant des concentrations en minéraux exprimées en $\mu\text{g}/\text{g}$, d'après la formule suivante :

$$C_e = \frac{C_{e \text{ gupix}}}{m} \times MCF$$

Avec

C_e : la concentration de l'élément d'intérêt en $\mu\text{g}/\text{g}$

$C_{e \text{ gupix}}$: la concentration de l'élément d'intérêt en masse surfacique ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

m : la masse de l'échantillon en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

MCF : les facteurs de correction calculés par RUMPIN

Les concentrations obtenues pour chacun des éléments présentent une incertitude. Celle-ci dépend des incertitudes sur les grandeurs mesurées expérimentalement (PIXE et RBS).

Les grandeurs pouvant présenter des incertitudes sont :

M : La masse surfacique de l'échantillon

N : le nombre de protons incidents (Q/e)

Y : L'ajustement au spectre expérimental

Ω : l'angle solide du détecteur X

Les erreurs relatives à ces valeurs peuvent être additionnées afin d'obtenir l'erreur totale sur la concentration ($\Delta C/C$) calculée de l'élément d'intérêt.

$$\frac{\Delta C}{C} = \frac{\Delta N}{N} + \frac{\Delta M}{M} + \frac{\Delta Y}{Y} + \frac{\Delta \Omega}{\Omega}$$

Les erreurs sur le calcul de la charge et de la masse ont été évaluées à $\pm 2\%$ chacune. Celle de l'angle solide du détecteur X a été évaluée à 3% . Celle du calcul des concentrations est calculée par le logiciel Gupix lui-même et est spécifique à chaque élément.

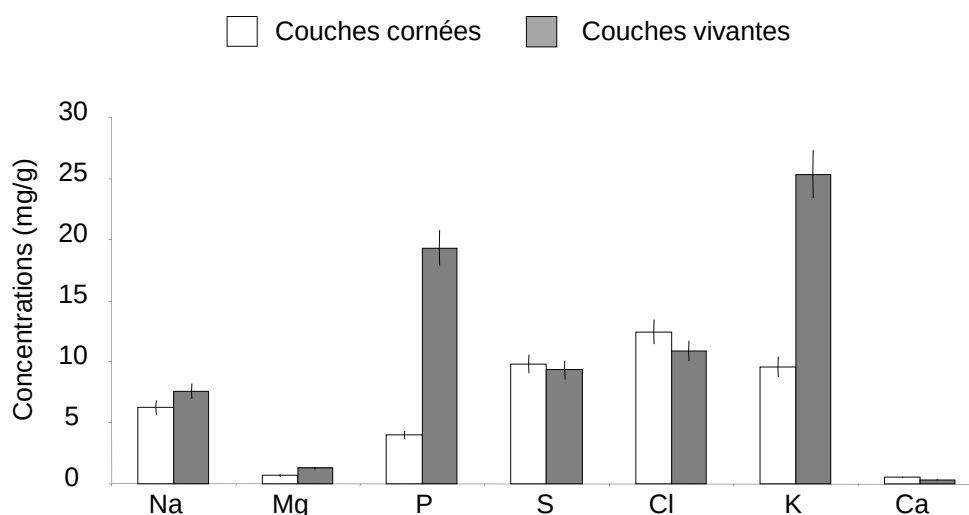


Figure 13: ***Incertitudes à la mesure** des concentrations de chaque élément constitutif des échantillons analysés au cours de ce chapitre et ce pour une couche cornée et une couche vivante.*

La somme de ces erreurs est représentée sur le graphique de la figure 13. Elle se situe aux alentours de 10% pour les éléments majoritaires et aux alentours de 15% pour les éléments dits « traces » tel que le calcium. Ces erreurs ne seront pas représentées sur les graphiques qui vont suivre lors de la présentation de ce manuscrit.

2. Peau d'oreille de porc, Peau Humaine et Epiderme reconstruit

Le groupe IPB possède depuis plusieurs années une expertise dans la caractérisation des espèces ioniques qui entrent dans la composition de la peau. Nous disposons donc de données expérimentales obtenues lors de précédentes analyses réalisées sur des échantillons de peaux humaines et d'épidermes reconstruits. Ces études ont été notamment réalisées lors de collaborations établies dans le cadre de consortium européen (Nanoderm) et/ou de collaborations antérieures avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre.

Il nous a donc semblé intéressant de comparer les données expérimentales obtenues avec ce modèle de peau de porc, aux échantillons de peau humaine et aux échantillons d'épidermes reconstruits (Skinéthic) analysés au préalable.

Ces études avaient montré en particulier que les ions inorganiques (minéraux) sont très compartimentés à l'échelle du tissu. En effet, la microanalyse par fluorescence X (PIXE) mise

en œuvre à l'aide d'un microfaisceau permet, en cartographiant simplement ces éléments (Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca...), de révéler l'ultrastructure tissulaire, parfois même de différencier des structures microscopiques uniquement par leur composition ionique. Les concentrations ioniques sont en général assez stables dans le milieu vivant. Leur modification sous l'effet d'un stress physiologique ou d'une substance active peut alors être directement mise en évidence par microanalyse de la structure impliquée.

Ces études sur peau native nous ont permis de mettre en évidence une variabilité interindividuelle qui dépend étroitement de l'état physiologique de l'individu et des conditions de prélèvement. Pour cette raison, en plus des raisons éthiques qui se concrétisent actuellement par des décrets sur l'expérimentation animale, un programme visant à tester un modèle d'épiderme reconstruit pour une utilisation future dans des expérimentations de pénétration percutanée de substances pharmacologiques et dermo-cosmétiques avait été entrepris.

Nous nous sommes donc attachés, dans le cadre de ce travail, à valider l'utilisation d'un modèle de peau d'oreille de porc maintenue en survie.

D'un point de vue histologique, le marquage hématoxyline-éosine réalisé sur des coupes de peau d'oreille de porc cryofixées révèle les 4 couches distinctes constitutives de l'épiderme que sont la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Elles présentent une organisation similaire, sous forme de strates, à celle observée dans de la peau humaine (Figure 14). Ces différentes structures cellulaires sont facilement identifiables comme le montre la figure 14.

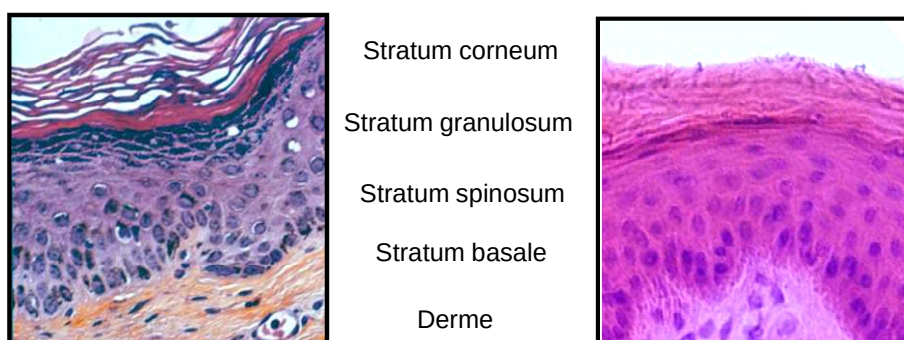


Figure 14 : *Coupe histologique de peau humaine (à gauche) et de peau d'oreille de porc maintenue en survie (à droite). Les noyaux sont marqués en bleu et les cytoplasmes en rose.*

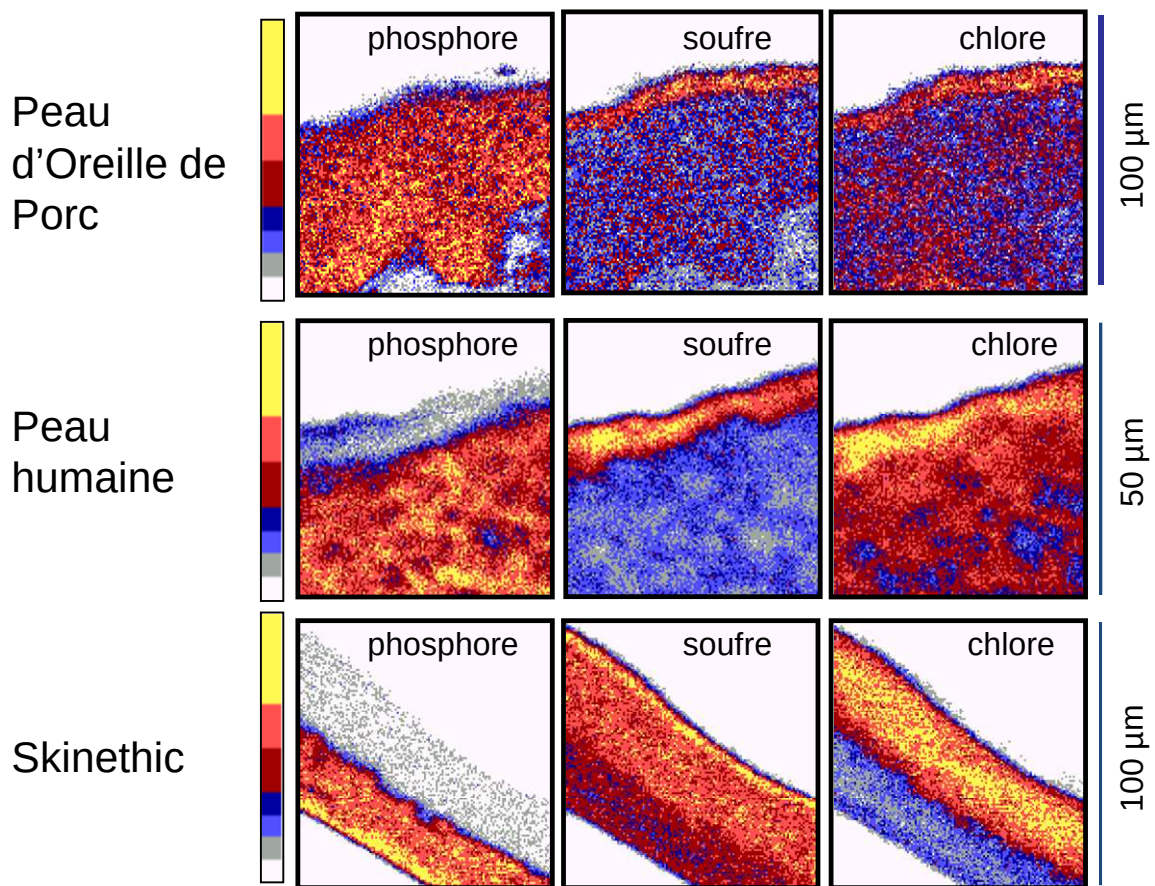


Figure 15 : *Cartographies chimiques des éléments Phosphore, Soufre et Chlore obtenues par microanalyse PIXE des modèles de peau de porc, peau humaine et épiderme reconstruits.* Après cryofixation, des coupes sériées de 16 à 20 μm ont été analysées par microfaisceau d'ions. Les distributions élémentaires des éléments phosphore, soufre et chlore montrent des structures tissulaires et des profils de distribution similaires entre les différents modèles analysés.

D'un point de vue composition chimique élémentaire, il est très intéressant de noter que dans la peau d'oreille de porc, les différentes espèces chimiques analysées présentent des profils de répartition tissulaire similaires à ceux décrits dans les modèles de peau humaine et d'épidermes reconstruits.

Par expérience, nous observons que **les concentrations ioniques** varient d'une espèce à l'autre mais peuvent également varier d'un individu à l'autre, il est donc nécessaire de posséder une référence « interne » afin de normaliser les données obtenues.

La concentration en soufre dans les différents échantillons analysés au laboratoire est la plus constante et la plus stable entre les différents échantillons d'un même modèle. Ainsi, cette

concentration est de l'ordre de 8 mg/g dans la peau d'oreille de porc et est identique dans les couches cornées et vivantes. Ceci n'est néanmoins pas visible sur les cartographies élémentaires où la couche cornée apparaît plus riche en soufre. Ce phénomène est dû à une densité plus élevée de la couche cornée qui entraîne cette répartition du soufre. En effet, la cartographie de la distribution chimique de cet élément rend compte du nombre d'atomes de soufre présents dans la zone analysée. Une fois les résultats normalisés par rapport à la masse de matière sèche de la zone analysée, **les concentrations en soufre sont identiques dans les couches vivante et cornée de l'épiderme. Il faut cependant noter que cet artefact de représentation nous permet de définir pour la suite de l'analyse la position de la couche cornée.**

La constance en concentration et en distribution du soufre dans les différentes couches de l'épiderme permet de l'utiliser comme standard interne naturel. Les résultats expérimentaux de ce paragraphe sont donc exprimés sous la forme de rapports de concentration (P/S, Cl/S, K/S...) dans le tableau de la figure 16. Ces valeurs correspondent aux concentrations obtenues dans des couches vivantes, couches au sein desquelles les concentrations ioniques sont généralement les plus stables. Par opposition à la distribution tissulaire du soufre, la distribution tissulaire du phosphore est essentiellement restreinte aux couches dites « vivantes » de l'épiderme.

Les rapports de concentrations entre les différents éléments chimiques composant l'échantillon (rapportés à la concentration du soufre) varient entre les différents types de peau.

	P/S	Cl/S	K/S	Mg/S	Na/S
Peau d'oreille de porc	2,22	1,23	2,88	0,16	0,86
Peau humaine	1,463	1,48	1,77	0,0306	0,1385
Skinethic	1,75	0,875	2,62		

Figure 16 : **Tableau comparatif des concentrations chimiques élémentaires de trois peaux : Peau d'oreille de porc, peau humaine et modèle d'épiderme reconstruit normalisées par rapport au soufre.**

Le rapport P/S est plus élevé dans la peau d'oreille de porc que dans la peau humaine et que dans le modèle de peau Skinethic. Le rapport Cl/S dans la peau d'oreille de porc est comparable avec celui de la peau humaine. En revanche, en ce qui concerne le rapport K/S, il se rapproche davantage de celui observé dans le modèle Skinethic. Il est aussi remarquable de noter que les rapports Na/S et Mg/S sont eux très différents de ce qui peut être observé dans des échantillons de peau humaine.

Les sélections de zones sont plus aisées dans un modèle d'épiderme reconstruit où les différentes couches de l'épiderme sont organisées de manière structurée avec des strates « parallèles ». La peau d'oreille de porc, comme la peau humaine, présentent de nombreuses invaginations de la couche basale. La variabilité géométrique observée entre les différentes strates des échantillons peut entraîner quelques incertitudes dans la sélection des zones d'analyses. Cette variabilité dans la sélection des zones peut être à l'origine des différences observées entre les modèles. Le nombre de cellules par zone peut aussi varier fonction de la peau analysée et ainsi entraîner des variations de concentrations en phosphore et en soufre. Cependant, il est également attendu que des variations inter-espèces existent et il est tout à fait attendu que la peau de porc ne soit pas la reproduction à l'identique de la peau humaine.

En conclusion, la morphologie du tissu, les distributions ioniques au sein du tissu et certains rapports de concentrations sont conservés entre la peau humaine et la peau d'oreille de porc. Ce modèle présente donc des caractéristiques d'intérêt pour une étude de la fonction barrière en réponse à des stress physiques ou chimiques.

3. Peau d'oreille de Porc et conditions de culture

3.1. Morphologie et distributions chimiques élémentaires des explants de peau d'oreille de porc maintenus en survie

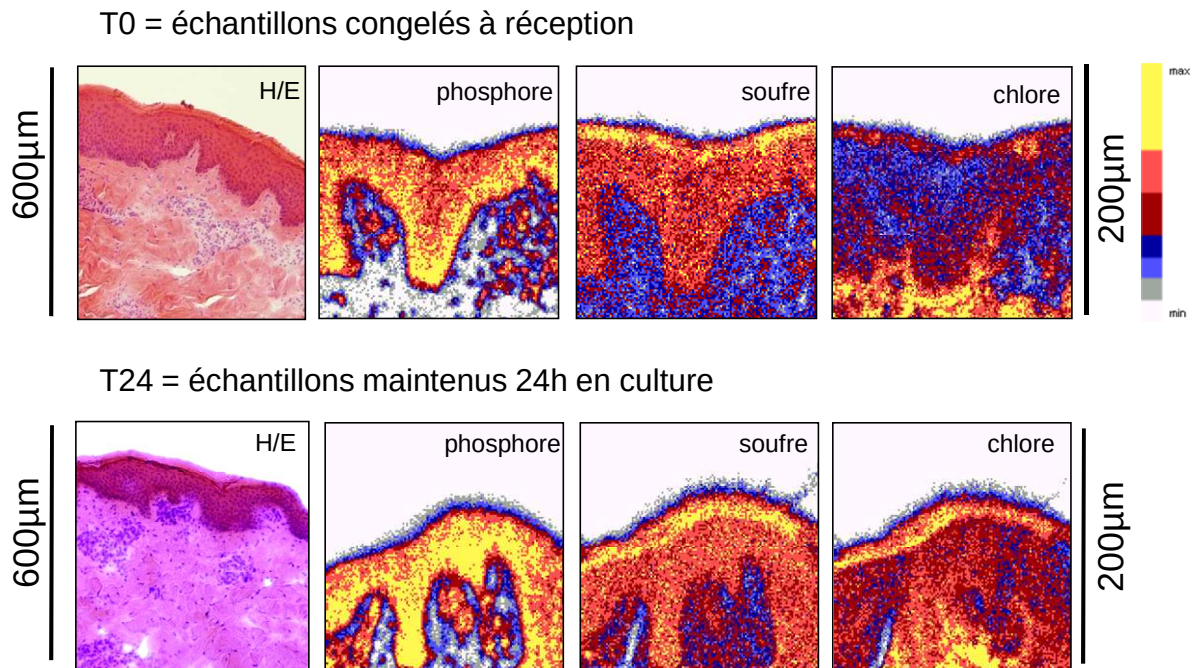


Figure 17 : **Effet de la mise en culture sur les distributions ioniques.** La structure histologique des coupes sériées des différents échantillons est révélée grâce à une solution d'hématoxyline/éosine. Les coupes sériées sont lyophilisées puis analysées par microsonde nucléaire. La distribution élémentaire du phosphore, du soufre et du chlore est représentée.

En histologie classique (marquage hématoxyline éosine), aucune différence morphologique entre les peaux congelées dès réception (T0) et les peaux maintenues 24 heures en culture n'a pu être décelée. Les distributions ioniques restent également inchangées. La représentation graphique de la répartition tissulaire du soufre permet de localiser la couche cornée. Le potassium et le phosphore restent localisés dans les couches dites « vivantes » : basale, épineuse, granuleuse (Fig.17).

3.2. Définition de l'impact de la culture des explants de peau de porc sur les compositions chimiques élémentaires

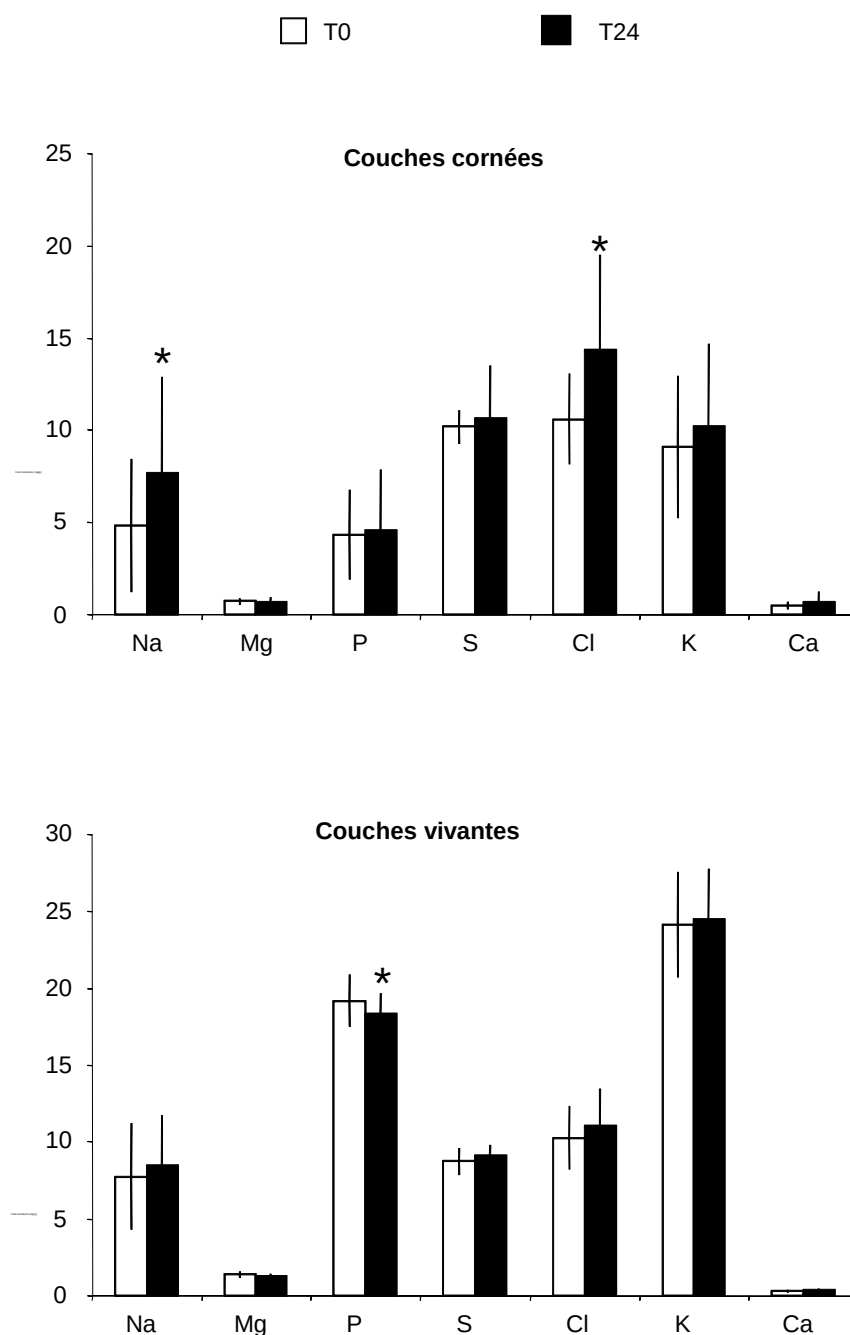


Figure 18 : *Définition de l'impact de la culture des explants de peau de porc sur les compositions chimiques élémentaires* Les concentrations des éléments chimiques quantifiées dans des échantillons de peau congelés à réception (T0) ou maintenus 24 heures en survie (T24) sont représentées pour les couches cornées (haut) et « vivantes » (bas). (*, $p < 0.05$, Test de Student)

La figure 18 présente les concentrations moyennes des principaux éléments chimiques constitutifs de la peau obtenus après analyse d'oreilles provenant de 5 donneurs différents. Les données quantitatives obtenues ne montrent pas de différence significative de la composition chimique élémentaire pour l'ensemble des éléments analysés, à l'exception du sodium et du chlore (*, $p < 0.05$). En effet, cette étude montre une légère augmentation des concentrations de ces deux éléments dans les couches cornées des échantillons maintenus 24 heures en culture par comparaison au temps T0. Selon toute vraisemblance, l'origine de ces deux éléments, Na et Cl est extra-tissulaire. Lors des phases de préparations, les échantillons sont « lavés » dans du milieu de culture avant leur mise en culture, il est donc fort possible que des échanges de Na et Cl interviennent entre le tissu et le milieu de culture.

L'absence de variations des concentrations entre 3 donneurs différents souligne le peu de variabilité interindividuelle pour les échantillons de peau d'oreille de porc. Ceci est un point très intéressant dans l'objectif d'études réalisées sur le long terme avec une nécessité absolue de reproductibilité.

3.3. Mise en évidence du gradient de concentration calcique

Le calcium semble jouer un rôle essentiel dans l'établissement et la régulation de la fonction barrière. Il est donc important de définir et de suivre le comportement de cet élément chimique dans un modèle de peau, d'autant plus qu'il a été montré qu'un gradient de concentration calcique est présent dans un tissu cutané dans des conditions physiologiques normales et que ce gradient est en revanche profondément altéré lors de lésions ou de pathologies cutanées comme dans le cas du psoriasis et de la dermatite atopique.

L'analyse par microfaisceau d'ions, nous a permis de mettre en évidence la présence d'un gradient calcique dans la peau d'oreille de porc. Ce gradient calcique est également maintenu au cours des 24 heures qui suivent la mise en culture. Des régions de 5 μm d'épaisseur ont été sélectionnées pour l'analyse de la composition et de la définition de la concentration en calcium.

Les résultats de ces analyses pour les échantillons congelés à réception (T0) et pour les échantillons maintenus en culture pendant 24 heures (T24) sont présentés dans les graphes 19 et 20, respectivement. Sur les figures 19 et 20, les valeurs obtenues sur 6 et 5 échantillons indépendants (respectivement) sont représentées. Une courbe de tendance illustrant les valeurs

« moyennes » a été également tracée. Comme attendu, les concentrations en calcium dans la couche cornée sont plus élevées que dans les couches profondes de l'épiderme.

La fonction barrière notamment au niveau ionique semble donc bien conservée dans nos différents échantillons et ne semble pas affectée par les conditions de culture.

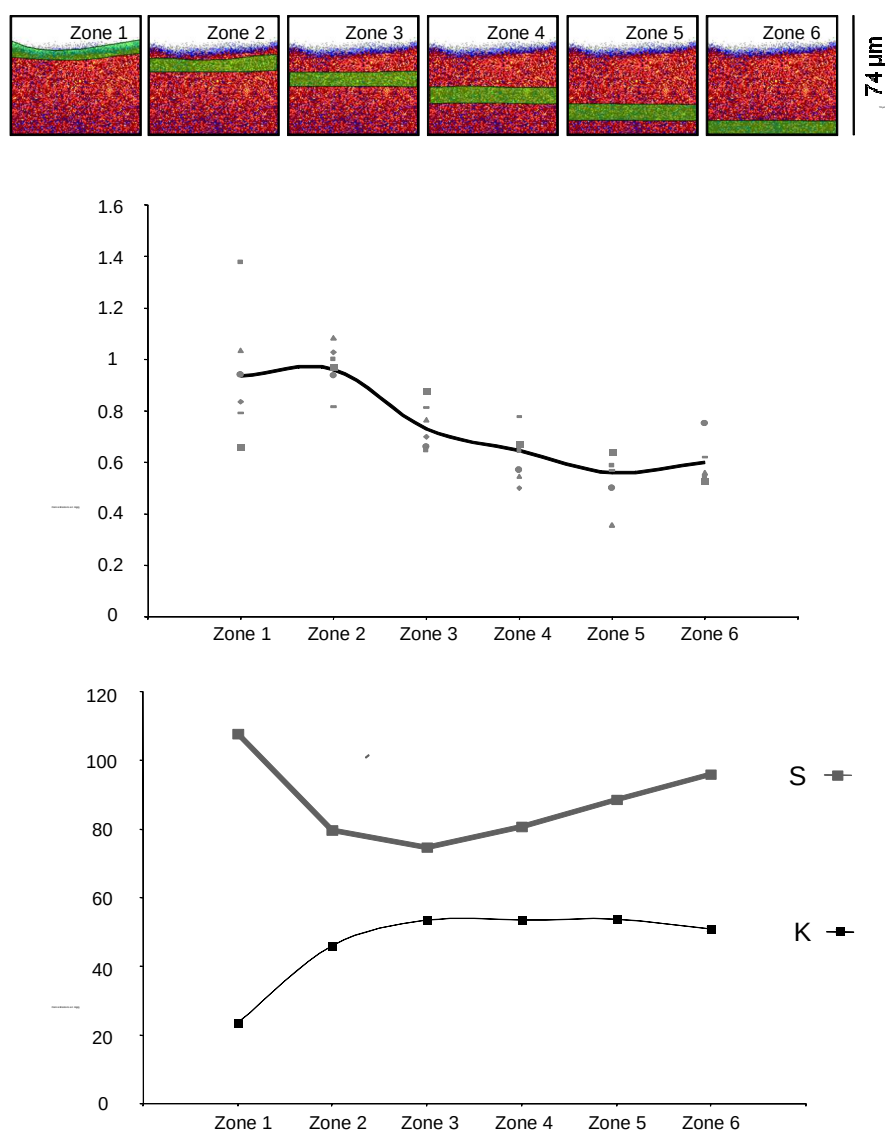


Figure 19: **Représentation séquentielle de la distribution tissulaire et des concentrations en calcium dans la peau d'oreille de porc à réception.** Cartographie PIXE et zones sélectionnées de la plus superficielle (zone 1) à la plus profonde (zone 6) dans l'épiderme d'une peau d'oreille de porc congelée à réception. Représentation graphique des concentrations calciques dans les différentes strates de l'épiderme. Sont également représentées les concentrations pour le potassium (K) et le soufre (S). Le potassium peut être assimilé à la couche vivante et le soufre à la couche cornée.

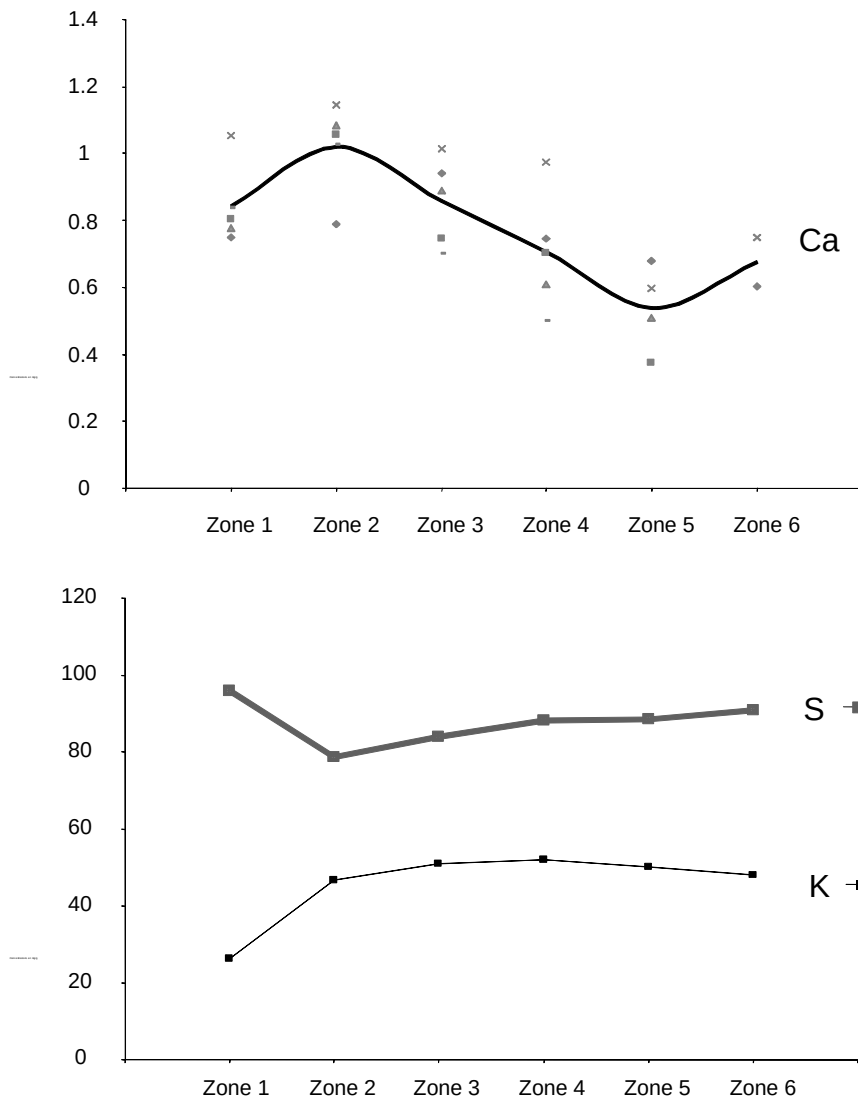
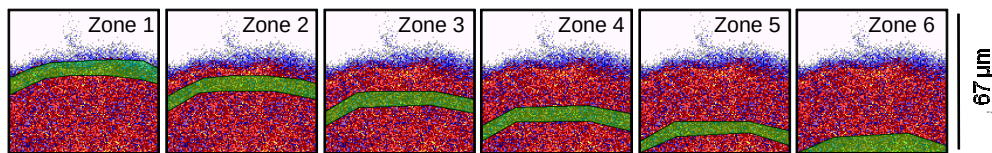


Figure 20 : **Représentation séquentielle de la distribution tissulaire et des concentrations en calcium dans la peau d'oreille de porc après 24 heures de culture.** Cartographie PIXE et zones sélectionnées de la plus superficielle (zone 1) à la plus profonde (zone 6) dans l'épiderme d'une peau d'oreille de porc congelée à réception. Représentation graphique des concentrations calciques dans les différentes strates de l'épiderme. Sont également représentées les concentrations pour le potassium (K) et le soufre (S). Le potassium peut être assimilé à la couche vivante et le soufre à la couche cornée.

4. Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement au SDS

Le *Sodium Dodécyl Sulfate* est un surfactant largement utilisé dans les procédures d'altération artificielle de la fonction barrière cutanée. Afin de fragiliser la fonction barrière, les différents échantillons ont été exposés à une solution diluée à 2 % (v/v) de SDS. Les échantillons contrôles et traités ont été analysés d'un point de vue histologique et d'un point de vue de leur composition chimique élémentaire (distribution, concentrations).

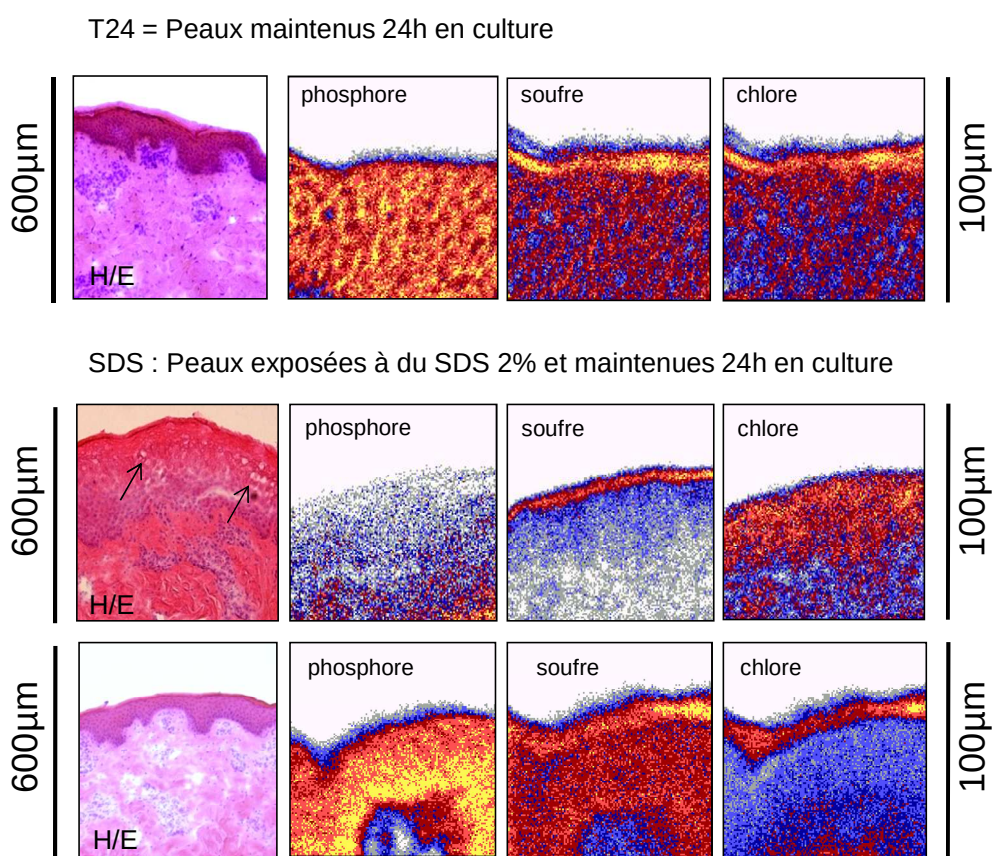


Figure 21 : **Altérations histologiques et modifications des compositions chimiques élémentaires induites par le SDS.** La structure histologique des coupes sériées des différents échantillons est révélée grâce à une solution d'hématoxyline/éosine. Des altérations de la structure de l'épiderme sont illustrées par la présence de vacuoles. Les coupes sériées sont lyophilisées puis analysées par microsonde nucléaire. La distribution élémentaire du phosphore, du soufre et du chlore est représentée et montre de profondes modifications dans la distribution de ces éléments. Sont représentés des échantillons contrôle (T24) et traités (SDS)

Cette étude a été réalisée sur trois ans et a permis de définir **3 types de réponses** bien définies aussi bien d'un point de vue **histologique** que d'un point de vue de la **concentration et de la distribution chimique élémentaire**.

Ainsi, lors de **l'analyse histologique** d'une première série d'échantillons, nous avons pu observer des altérations morphologiques importantes des échantillons exposés au SDS. Les tissus exposés présentent de manière uniforme sur l'ensemble de la coupe analysée **des vacuoles, une désorganisation structurale très marquée par rapport aux échantillons maintenus 24 heures en culture** (figure 21). Une seconde série d'échantillons présente également ces mêmes altérations morphologiques, cependant ces altérations sont restreintes à certaines zones de la coupe de l'échantillon analysé. Enfin, des coupes d'échantillons ne présentent aucune anomalie morphologique et structurale et semblent ne pas avoir subi d'altérations associées à une exposition SDS.

D'un point de vue de la distribution et de la composition chimique élémentaire, **3 profils de réponse ont été également décrits**. L'une des premières observations associées à l'exposition SDS concerne l'augmentation significative des concentrations en éléments Na et S. L'augmentation en sodium et en soufre pourrait être expliquée par un apport de ces espèces chimiques par le SDS lui-même. En effet, le SDS comme son nom l'indique (*Sodium Dodécyl Sulfate*) contient dans sa composition ces deux éléments. Ces deux éléments signent donc la présence de SDS dans la zone analysée. Le chlore quant lui est un élément souvent associé au sodium, très mobile et pourrait donc être « mobilisé » afin de rétablir un équilibre entre les ions Na et Cl. Il nous est donc possible de « suivre » la progression du SDS dans la profondeur de l'échantillon.

Comme dans le cas des observations histologiques, nous avons observé 3 profils de réponse différents. Ainsi, dans les échantillons présentant une homogénéité dans l'altération morphologique, la présence de Na et de S est retrouvée aussi bien dans les couches superficielles et profondes de l'échantillon, suggérant une **pénétration en profondeur du SDS** dans le tissu. En revanche dans les échantillons où les altérations morphologiques sont restreintes à quelques régions tissulaires, la pénétration du Na et du S reste à la verticalité de ces zones altérées d'un point de vue histologique. Ceci suggère donc un « **point** » de **pénétration du SDS** dans l'échantillon.

Pour les échantillons où les altérations morphologiques sont absentes, la présence de Na et de S n'est observée que dans la couche superficielle (couche cornée) de l'échantillon. Cette observation suggère **une faible pénétration du SDS dans l'échantillon**.

Ces 3 profils de réponse ont également été observés pour les autres éléments chimiques. Ainsi, nous avons mis en évidence une altération des distributions chimiques élémentaires dans les échantillons exposés au SDS avec une « disparition » du phosphore dans les couches supérieures de l'épiderme, une augmentation du soufre en surface de l'échantillon au niveau de la couche cornée, et des changements de localisation du chlore de la couche cornée vers les couches « vivantes ». Ces altérations de distribution ont été confirmées par l'analyse quantitative des concentrations.

Nous avons observé la diminution de la concentration en phosphore dans les couches « vivantes » et cornées, une augmentation de la concentration en soufre dans la couche cornée majoritairement, une augmentation de la concentration en sodium et en chlore puis une diminution des concentrations en phosphore et en potassium dans toutes les couches de l'épiderme.

A noter également que la concentration en calcium augmente dans les échantillons exposés au SDS. Cette augmentation de concentration en calcium suit les profils de concentration des éléments Na et S, ce qui laisse supposer que ce calcium provient de la solution de SDS.

Il est intéressant de noter que dans les échantillons où le SDS a « agi » sur les couches cornée et vivante, les concentrations en calcium sont plus importantes dans la couche cornée que dans la couche épineuse. Ceci semblerait aller dans le sens où le calcium est apporté par la solution de SDS appliquée sur la couche épineuse. En effet, si le calcium provenait du milieu de culture ou du derme, le gradient de concentration serait plutôt dirigé dans l'autre sens avec les plus fortes concentrations dans la couche vivante et les plus faibles vers la couche cornée.

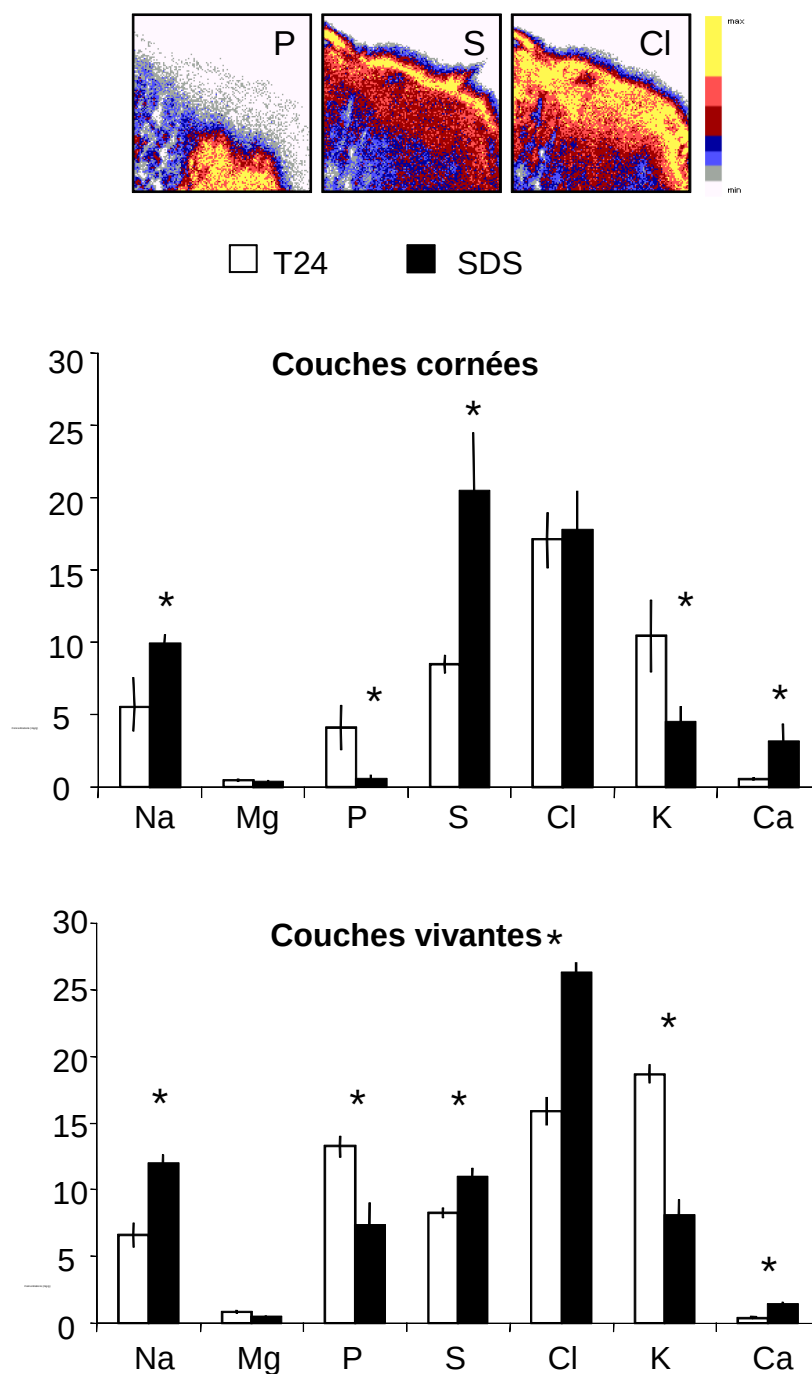


Figure 22 : **Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement au SDS.** Illustration des altérations de distributions des éléments chimiques (P, S, Cl) observées pour des peaux d'oreille de porc traitées au SDS 2%. Représentations graphiques des concentrations chimiques élémentaires dans des échantillons de peau maintenus 24 heures en survie (T24) et de peaux exposées à du SDS 2% puis maintenues 24 heures en survie (SDS), dans les couches cornées (haut) et vivantes (bas). Modifications des concentrations ioniques

dans les couches cornées et vivantes. Ces données illustrent la situation où les échantillons ont répondu au traitement SDS. (*, $p < 0.05$, Test de Student)

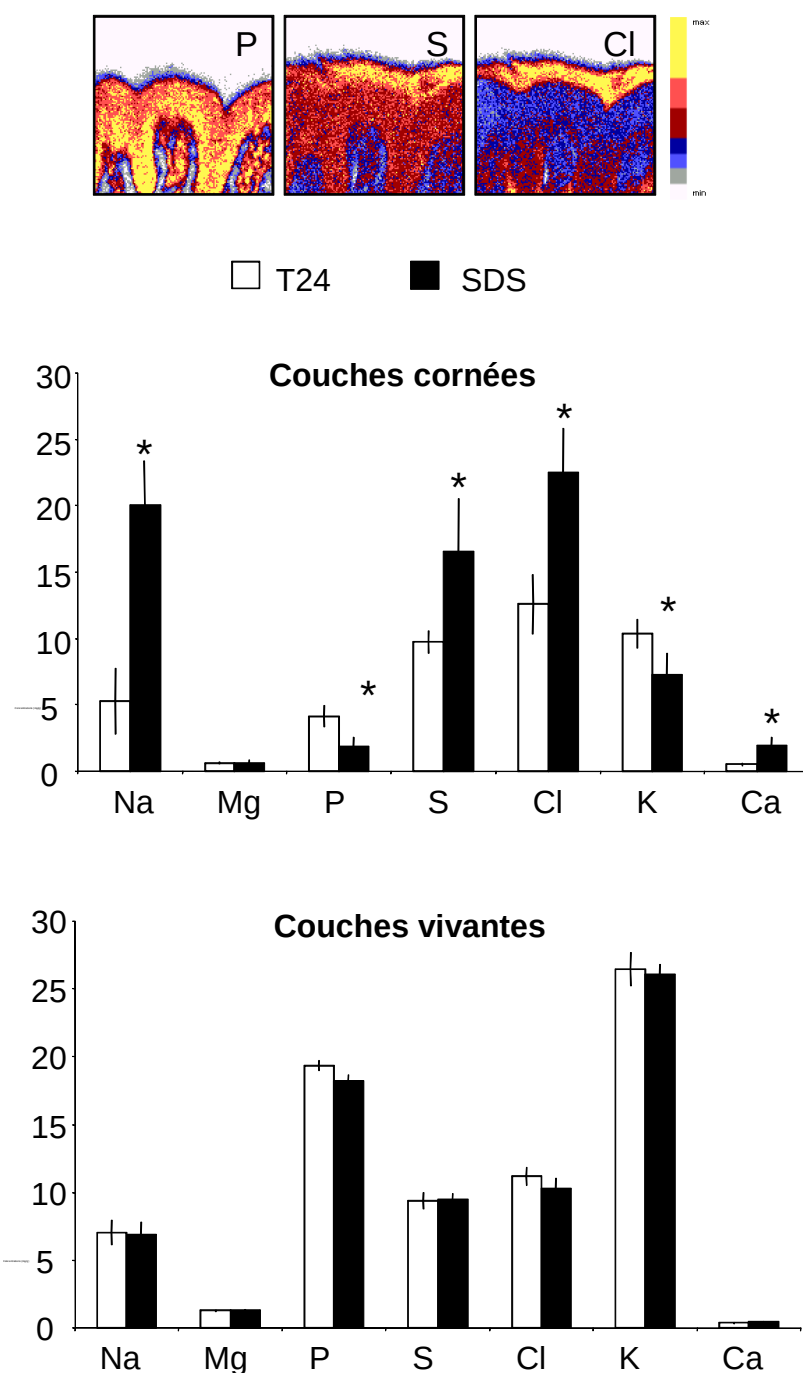


Figure 23 : **Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement au SDS.** Illustration des altérations de distributions éléments chimiques (P, S, Cl) observées pour des peaux d'oreille de porc traitées au SDS 2%. Représentations graphiques des concentrations chimiques élémentaires dans des échantillons de peau maintenus 24 heures en survie (T24) et de peaux exposées à du SDS 2% puis maintenues 24 heures en survie (SDS), dans les couches cornées (haut) et vivantes (bas). Modifications des concentrations ioniques dans les couches

cornées et vivantes. Ces données illustrent la situation où le traitement SDS ne semble avoir agi que dans les couches superficielles de l'échantillon. (, $p < 0.05$, Test de Student)*

Alors que la situation semblait très confuse, une analyse globale de l'ensemble des données obtenues au cours de ces 3 années d'expérience a permis de préciser et d'expliquer l'ensemble des observations obtenues suite aux traitements SDS. Ainsi, en reprenant l'ensemble des observations réalisées en microscopie optique et histologique, et en y associant l'ensemble des données obtenues en analyse par faisceau d'ions, j'ai mis en évidence **une relation étroite entre l'efficacité du traitement SDS et (i) l'épaisseur de la couche cornée des explants de peau d'oreille de porc et (ii) la présence ou non d'un follicule pileux.**

Ainsi, il apparaît que les échantillons qui présentent une très faible épaisseur de couche cornée sont ceux qui ont répondu le plus significativement au traitement SDS avec : pénétration du SDS dans les couches les plus profondes de l'échantillon, homogénéité des altérations histologiques, reproductibilité des altérations biochimiques observées illustrées par les désorganisations de distributions chimiques élémentaires.

Par opposition, les échantillons, dont l'épaisseur de la couche cornée est très importante, ne présentent aucune anomalie histologique et ne présente qu'un faible niveau de pénétration du SDS. Seule, la couche cornée la plus superficielle semble modifiée.

Enfin, les échantillons qui répondent partiellement sont en fait des échantillons dont l'épaisseur de la couche cornée est importante mais qui contiennent également un follicule pileux. Cette observation explique le fait que d'une zone à l'autre (proches en distance), nous pouvons observer 2 types de réponses (altération significative ou non).

L'ensemble de ces observations réalisées sur plusieurs mois d'analyse et sur plusieurs séries d'échantillons, permettent de démontrer le rôle que joue la couche cornée dans la fonction barrière. Ainsi, la couche cornée a un rôle tampon vis-à-vis de la pénétration au SDS et empêche significativement la pénétration de ce détergent dans les couches vivantes de l'épiderme. L'effet tampon de la couche cornée semble se maintenir sur les 24 heures d'exposition. Il serait donc intéressant de réaliser ce même type d'expérience et d'étudier le devenir de ces échantillons après 48 heures d'exposition. L'épaisseur de la couche cornée est donc un paramètre essentiel dans l'établissement d'une fonction barrière cutanée effective et efficace.

Il est cependant également important de souligner que la présence d'un follicule pileux influence significativement la réponse tissulaire suite à un traitement au SDS. Cette observation souligne donc une voie de passage potentielle, un point de fragilité de la barrière

cutanée, favorisant le passage d'éléments chimiques exogènes, comme le SDS. Il est donc primordial de prendre en considération le « rôle » de cette zone cutanée dans les processus de pénétration transcutanée. Dans le cadre d'études de pénétration transcutanée d'éléments exogènes potentiellement toxiques, il est donc fort recommandé de considérer avec un intérêt tout particulier cette région cutanée.

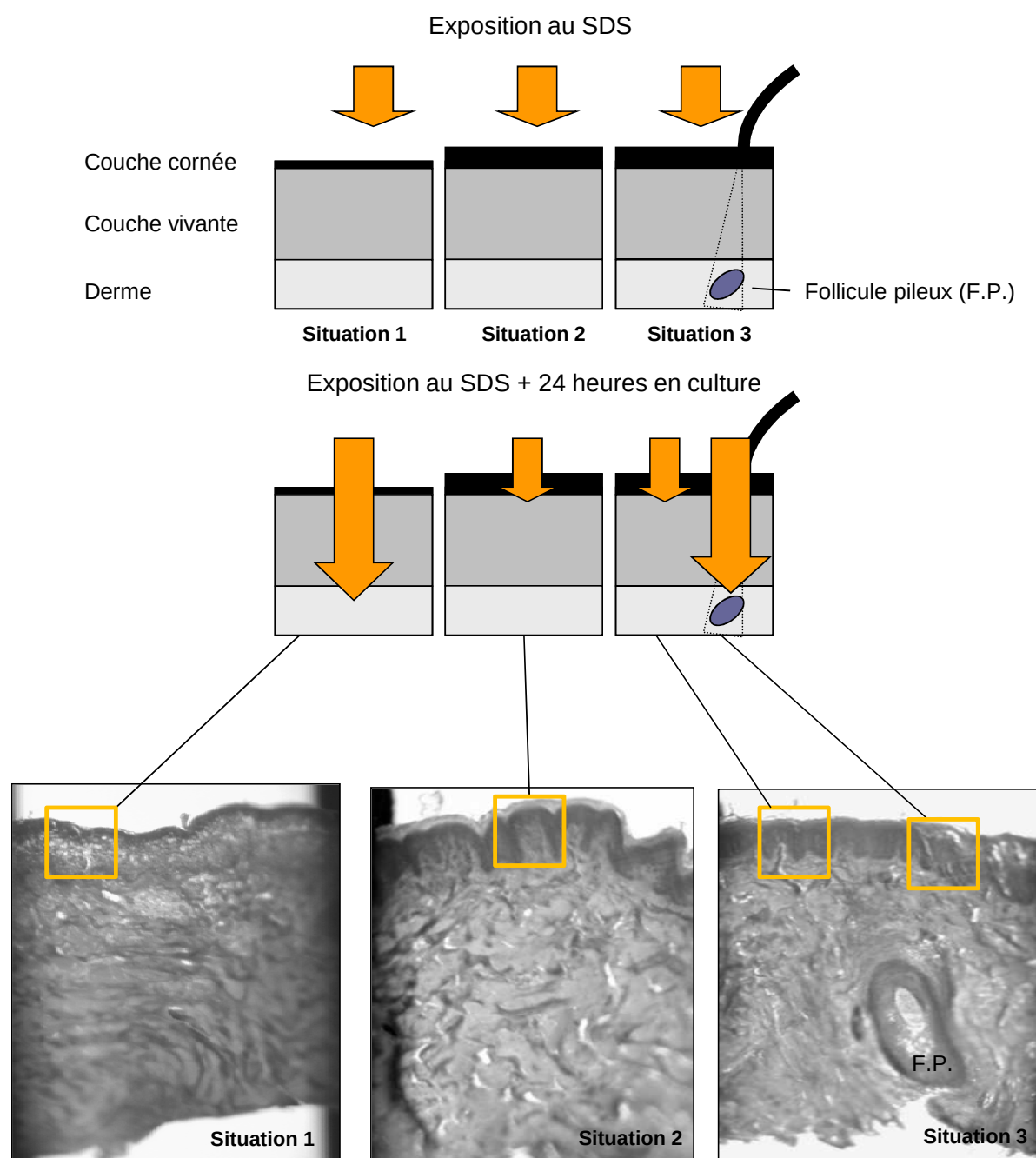


Figure 24 : *Illustration schématique du mode de pénétration du Sodium Dodécyl Sulfate dans un modèle de peau d'oreille de porc maintenu en survie. Le rôle de la couche cornée*

et de la présence du follicule pileux sont soulignés. Images en contraste de phase de coupes de peaux d'oreille de porc exposées au SDS puis cryofixées et lyophilisées.

En conclusion, ces données semblent impliquer l'épaisseur et l'intégrité de la couche cornée dans la réponse à un composé chimique. En effet, plus la couche cornée est épaisse, plus le passage de l'élément chimique considéré est ralenti. De plus, lorsque la couche cornée est intègre et fonctionnelle, l'élément chimique considéré pénètre préférentiellement via les follicules pileux altérant ainsi significativement les régions profondes de l'épiderme. L'ensemble de ces conclusions sont résumées dans le schéma récapitulatif de la figure 24.

5. Fonction barrière et exposition aux ultraviolets

In vivo, l'exposition de la peau aux rayonnements ultraviolets induit des altérations histologiques et semble également perturber l'intégrité de la perméabilité de la barrière épidermique. Les effets observés *in vivo* sont généralement dose dépendant.

Définir le comportement d'explants de peau maintenu en survie suite à une exposition aux rayonnements ultraviolets est donc un point essentiel. Dans ce sens, un protocole d'exposition aux rayonnements ultraviolets a été défini et comme pour le traitement SDS, nous nous sommes attachés à définir les réponses histologiques et biochimiques induites dans les explants de peau d'oreille de porc.

L'analyse histologique révèle la présence d'altérations spécifiques induites par les rayonnements ionisants comme la présence de noyaux pycnotiques dans les couches basales des échantillons exposés aux ultraviolets. Des analyses complémentaires en immunohistofluorescence ont été réalisées sur les coupes d'échantillons et révèlent l'activation de mécanismes apoptotiques, avec notamment la présence de caspase 3 clivée dans la couche basale de l'épiderme des tissus exposés. Cette protéine est en effet clivée lors des processus d'activation de la mort cellulaire programmée (apoptose) induits par des rayonnements UV. Ces observations soulignent donc que les expositions UV ont effectivement induits des dommages dans les couches profondes des échantillons.

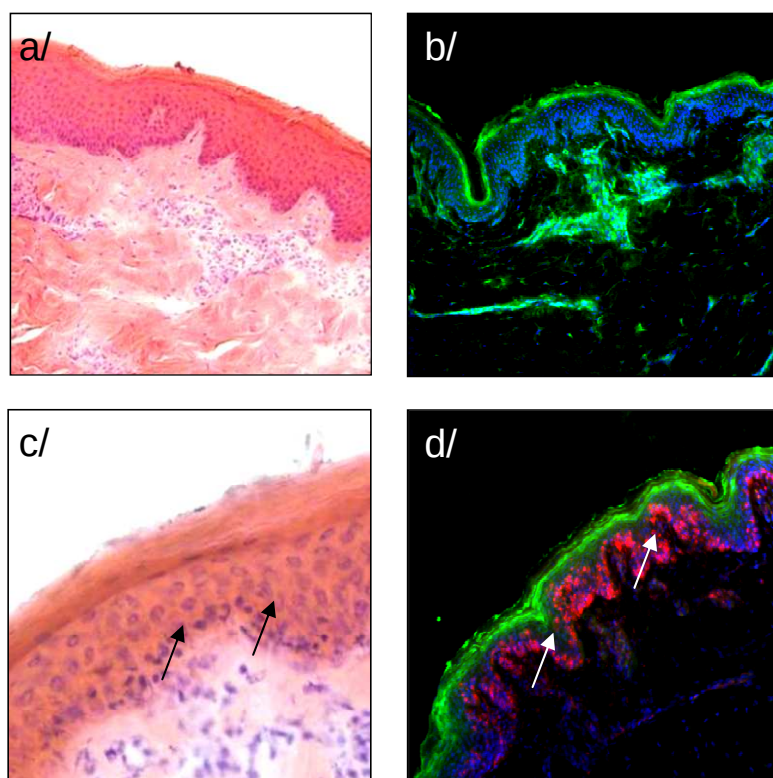


Figure 25 : **Mise en évidence d'altérations induites par les expositions aux rayonnements UV sur des peaux d'oreille de porc maintenues 24 heures en survie.** La comparaison des échantillons contrôles (T0) (a/ et b/) et des échantillons exposées aux UV et maintenues 24 heures en culture (c/ et d/) permet de mettre en évidence des altérations histologiques (hématoxyline-éosine) et l'activation de processus apoptotiques immunomarquage dirigé contre la caspase 3 clivée).

Sur les coupes immunomarquées les noyaux cellulaires (ADN) sont visualisés en bleu grâce à l'utilisation de l'agent intercalant : Hoechst³³³⁴². La caspase 3 clivée est révélée en rouge, l'involucrine, en vert. Les flèches désignent (i) sur les coupes histologiques : les noyaux pycnotiques, (ii) sur les coupes en fluorescence, les cellules en apoptose.

L'analyse des distributions et des concentrations chimiques élémentaires révèle des altérations significatives. Des variations statistiquement significatives en Na, Cl, K et Ca ont pu être observées dans les couches vivantes des échantillons irradiés (Figure 26). Cependant, nous avons aussi mis en évidence des variations dans la composition en Na et Cl dans les peaux maintenues en culture et non exposées aux rayonnements ultraviolets. Ces variations ne semblent donc pas liées directement aux effets délétères des ultraviolets et peuvent être expliquées par un artefact expérimental lors de la phase d'exposition (élévation de la

température), de préparation des échantillons, ou par des échanges avec le milieu de culture. Le sodium et le chlore sont des ions très mobiles et peuvent facilement être mobilisés (possibilité de provenance du milieu de culture...).

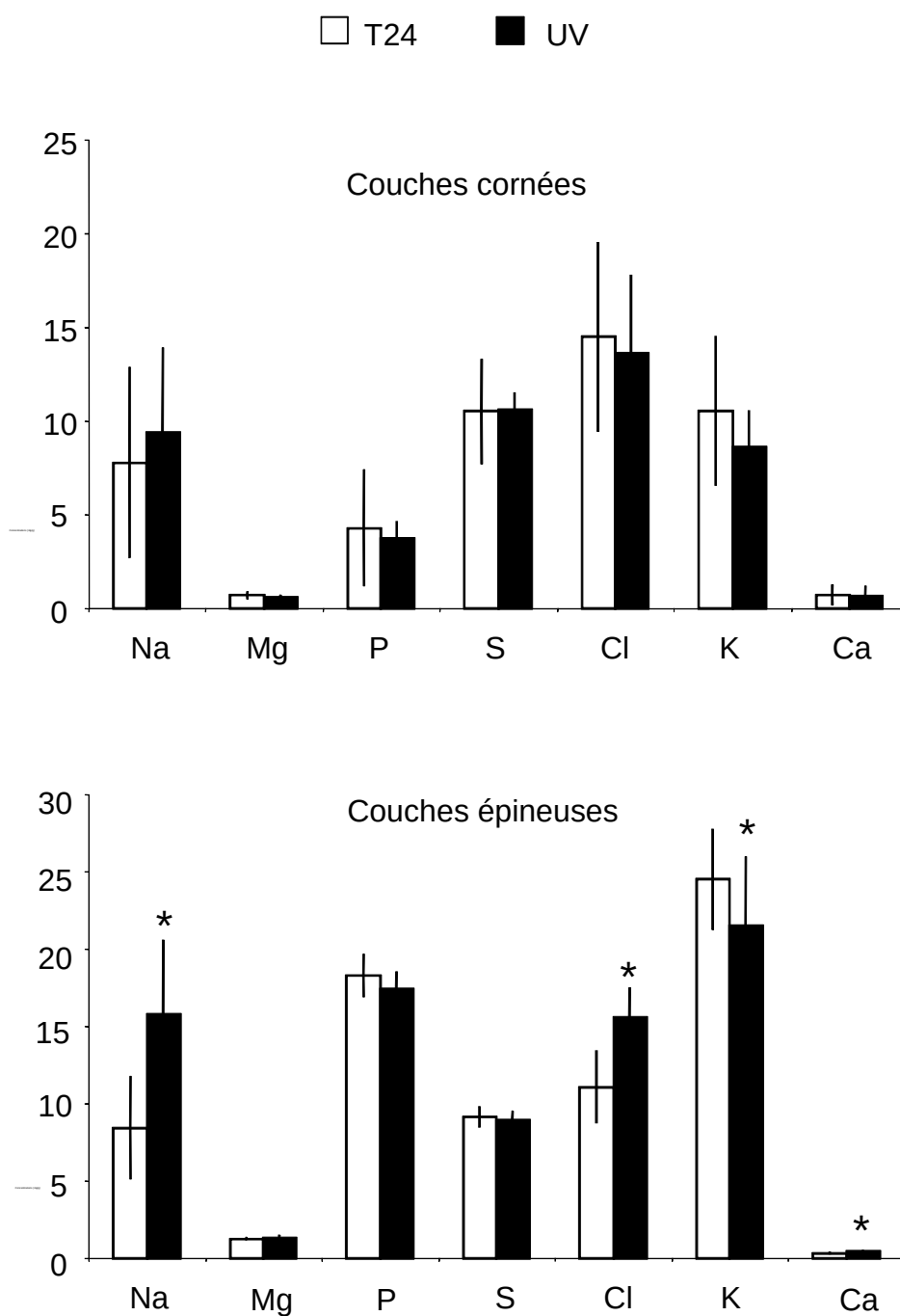


Figure 26 : **Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement aux rayonnements ultraviolets.** Comparaison des concentrations chimiques élémentaires dans des échantillons de peau maintenue 24 heures en survie (T24) et de peaux exposées aux UV puis maintenues 24 heures en survie (UV, 5DEM), dans les couches cornées (haut) et vivantes (bas). (*, $p < 0.05$, Test de Student)

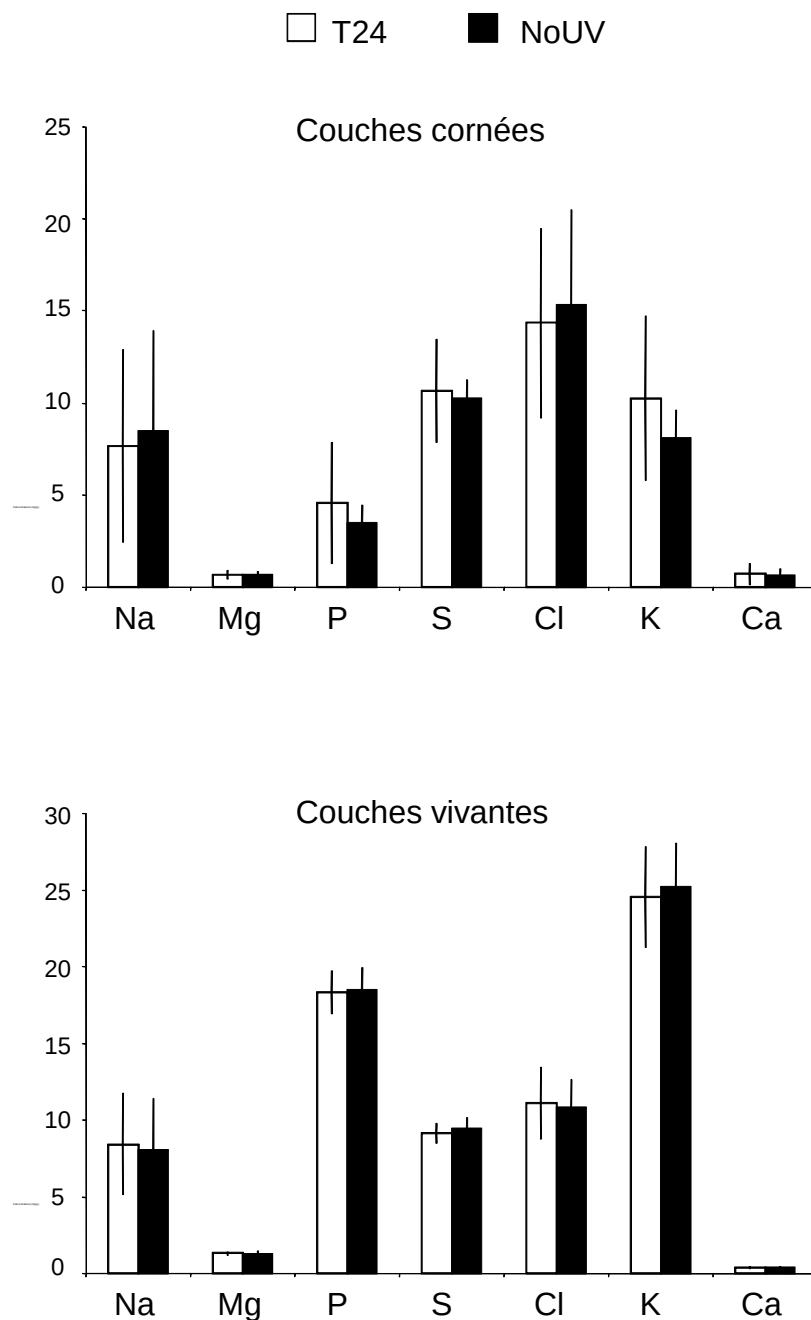


Figure 27 : **Caractérisation des altérations biochimiques induites par un traitement aux rayonnements ultraviolets et contrôles internes.** Comparaison des concentrations chimiques élémentaires dans des échantillons de peau maintenue 24 heures en survie (T24) et de peaux placés dans le SunTest mais protégés des UV par une plaque opaque (5DEM) puis maintenus 24 heures en survie (NoUV), dans les couches cornées (haut) et vivantes (bas).

Afin de vérifier que les conditions d'expériences lors de l'exposition aux ultraviolets n'induisent pas d'artéfacts, des échantillons ont subi la même procédure expérimentale à l'exception de l'exposition directe aux rayonnements UV. Les explants de peaux ont été protégés des rayonnements ultraviolets par une plaque en plastique opaque et ont été placés dans le SunTest lors d'une irradiation. Ces échantillons ont été ensuite analysés afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations.

Comme le montre la figure 27, aucune différence n'a pu être mise en évidence pour les échantillons NoUV par comparaison aux échantillons T24. Ces résultats ont été confirmés lors des deux campagnes d'analyse.

Ces études montrent donc que 24 heures après exposition à des doses significatives de rayonnements ultraviolets, les explants de peau d'oreille de porc présentent des dommages spécifiques et localisés à la membrane basale (ADN endommagés) et que des voies d'activation spécifiques sont induites comme l'apoptose. De plus, l'homéostasie ionique est significativement altérée dans les couches vivantes des peaux irradiées après 24 heures d'exposition. Il serait donc intéressant de suivre le comportement de ces explants à des temps de réponse plus longs. Il semble également que l'épaisseur, la présence ou non de couche cornée ne protègent pas contre les effets délétères des rayonnements ultraviolets.

FONCTION BARRIERE et OXYDES d'ALUMINIUM

Certains agents contenus dans des produits à usage domestiques sont suspectés d'induire des effets néfastes sur la santé humaine. Les sels d'aluminium contenus notamment dans les produits anti-transpirants sont soupçonnés de pénétrer la peau et d'être des agents responsables du déclenchement de pathologies graves comme le développement de cancer du sein. Nous avons, dans ce travail, participé à l'étude de la pénétration transcutanée de l'aluminium sur des explants de peau d'oreille de porc exposés à différentes formulations (anti transpirants, cicalfate...). Un protocole de diffusion passive a été mis en place pour cette expérience et réalisé à l'Institut de Recherche Pierre Fabre.

Afin d'évaluer la pénétration transcutanée potentielle de l'aluminium, la quantification des concentrations en aluminium dans les différents compartiments de l'épiderme des explants de peau d'oreille de porc a été réalisée par analyse par microfaisceau d'ions.

FONCTION BARRIERE et OXYDES d'ALUMINIUM

MATERIEL ET METHODES

1. Préparation des échantillons

Cette étude a été réalisée sur des explants de peau d'oreille de porc. Les traitements suivants ont été appliqués:

1. chlorure d'aluminium sur peau normale;
2. déodorant spray sur peau normale ;
3. déodorant crème sur peau normale;
4. cicalfate sur peau normale ;
5. cicalfate sur peau altérée par 15 strips consécutifs;
6. un témoin négatif.

Les échantillons ont été acheminés une fois congelés au CENBG puis stockés dans l'azote liquide jusqu'à leur traitement définitif pour l'analyse par microfaisceau d'ions.

L'ensemble des échantillons, des expositions et des congélations a été préparé par l'Institut de recherche Pierre Fabre.

2. Cryo-section et lyophilisation des échantillons

Les échantillons congelés sont montés à l'aide de Tissue Tek sur le support de coupe puis des coupes de tissus de 16 μm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryo-microtome (CM-3500, Leica) équipé d'un couteau en inox refroidi à -25°C . La lyophilisation des coupes est réalisée sur la nuit à -30°C . Les coupes lyophilisées peuvent alors être conservées à température ambiante et placées sur des supports dédiés à l'analyse par microfaisceau. Il est important de préciser qu'une attention toute particulière est apportée à la qualité (propreté des couteaux) et au sens des coupes afin de ne pas introduire accidentellement des traces d'aluminium dans l'échantillon.

3. Coloration histologique

Une coloration de routine à l'hématoxyline-éosine permet de visualiser de façon satisfaisante les composants cellulaires des tissus cutanés. Il nous est alors possible, par simple observations microscopiques, de déceler les éventuels changements morphologiques induits par les différentes conditions expérimentales.

Les coupes cryofixées et conservées à -80°C sont ramenées à température ambiante. 10 minutes dans un bain d'hématoxyline permettent sa fixation sur les noyaux cellulaires et donc leur coloration en une teinte violette. Cette étape est suivie d'un bain d'alcool chlorhydrique

fumant puis d'une immersion dans une solution d'éosine à 2% (v/v) pendant 2 minutes. Cette étape permet la coloration des cytoplasmes cellulaires en une teinte rose à rouge. La déshydratation du tissu par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70°, 95°, 100°) est suivie par une fixation avec du toluène. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelles à l'aide de milieu de montage EUKITT.

4. Immunohistofluorescence

Les coupes sont déposées sur lames superfrost, séchées sur la nuit à température ambiante, puis conservées à -80°C. Afin de réaliser l'immunohistofluorescence, les coupes sont ramenées à températures ambiantes, puis fixées dans un bain d'acétone, 20 minutes à -20°C. Les coupes sont alors séchées à température ambiante pendant 15 minutes puis lavées 2 fois dans un bain de TBS 1X. Ceci est suivi d'une étape de perméabilisation/saturation dans un tampon TBS1X/sérum de veau fœtal/ Triton X-100, 30 minutes à température ambiante. Les coupes sont mises en présence de l'anticorps primaire d'intérêt sur la nuit à 4°C. 2 rinçages dans un bain de TBS1X avant la mise en présence de l'anticorps secondaire.

5. Analyse des échantillons par microfaisceau d'ions

L'analyse des coupes est réalisée à l'aide de la microsonde nucléaire du CENBG sur la plateforme AIFIRA. La répartition des différents éléments est analysée sous vide par un faisceau de protons d'une énergie de 1,5 MeV. Les méthodes d'analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission), RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) et STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) sont utilisées simultanément afin de déterminer la composition élémentaire (P, S, Cl, Al...), la masse organique sèche et la structure des tissus analysés. Les détecteurs sont de type Si(Li) 80 mm² de surface active pour la détection des photons X et de type Si intrinsèque (PIPS – Canberra) pour les particules diffusées et transmises.

FONCTION BARRIERE et OXYDES d'ALUMINIUM

RESULTATS

1. Répartitions de surface de l'aluminium différentes en fonction du produit appliqué

L'analyse par microfaisceau d'ions montre que la distribution et la composition chimique élémentaire des éléments majeurs (P, S, Cl,...) entrant dans la constitution des explants de peau d'oreille de porc ne sont pas modifiées.

De manière très frappante, l'analyse plus spécifique des distributions de l'aluminium contenu dans les différentes formulations cosmétiques sur des échantillons de peau révèle des répartitions spécifiques à chaque formulation. Ainsi, la répartition de l'aluminium contenu dans des formulations de type « crèmes » ou « spray » montre une homogénéité de répartition à la surface de l'échantillon, alors que l'aluminium contenu dans la formulation dénommée « cicalfate » montre une distribution granulaire, très localisée à la surface de l'échantillon.

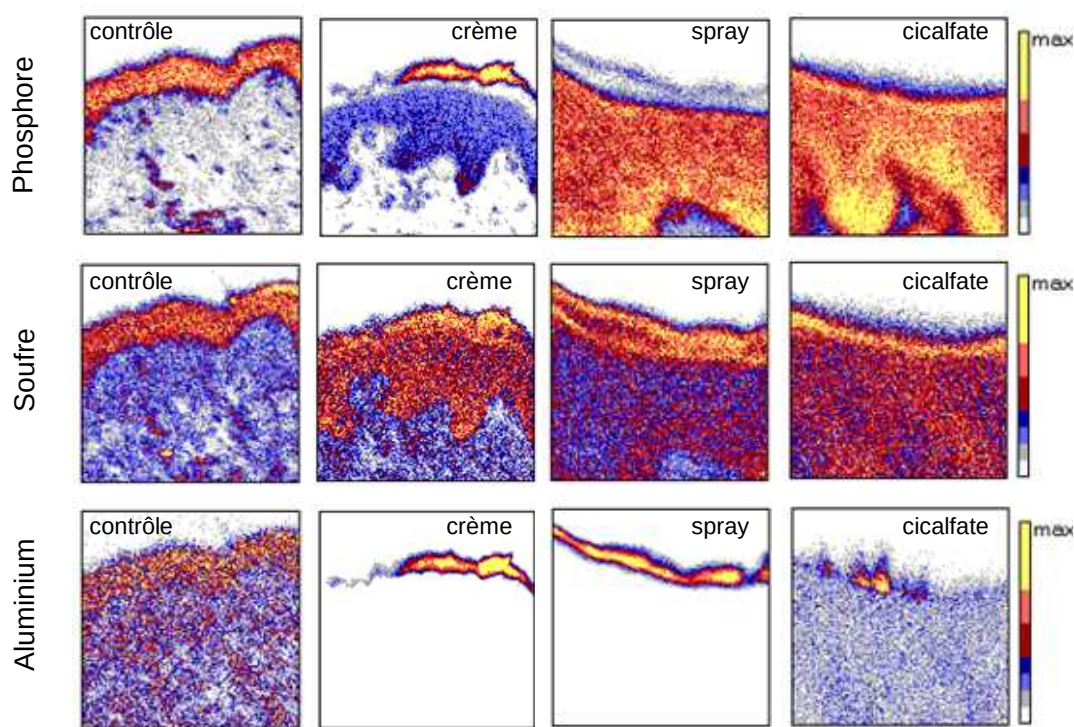


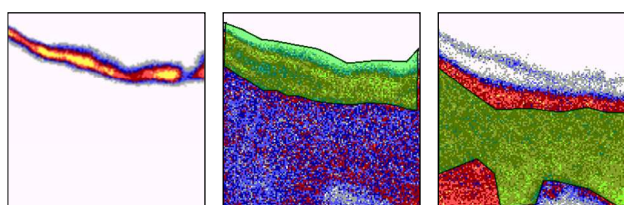
Figure 28 : **Répartition de surface de l'aluminium contenu dans différentes formulations cosmétiques.** Les cartographies chimiques élémentaires du Phosphore, du Soufre et de l'Aluminium sont présentées pour quatre types d'échantillons : (i) des « peaux contrôle » non exposées, des peaux exposées à (ii) du déodorant crème, (iii) du déodorant spray ou (iv) du cicalfate.

D'après les cartographies élémentaires PIXE de l'aluminium, nous sommes donc en mesure de mettre en évidence des différences de répartition de l'aluminium à la surface des peaux traitées en fonction du produit testé et donc d'apporter des compléments d'indications qui peuvent être utilisés pour comprendre les modes d'action de ces composés.

2. Quantification des concentrations d'aluminium dans les explants de peau d'oreille de porc en fonction du produit appliqué

Les observations des différentes cartographies élémentaires PIXE de l'aluminium suggèrent que cet élément, quelque soit la formulation considérée, reste à la surface des échantillons.

a/



	Couche Cornée		Couche Vivante	
	Aluminium (µg/g)	Limite de détection (µg/g)	Aluminium (µg/g)	Limite de détection (µg/g)
Peaux normales				
Peau non exposée	0	129	0	55
Chlorure d'aluminium	9800	90	0	78
Cicalfate	3980	62	0	57.8
Déodorant Spray	12200	35	0	24
Déodorant Crème	41000	81	0	37
Peaux altérées				
Cicalfate	1978	89	0	74

Figure 29 : **Analyse quantitative de la pénétration transcutanée d'aluminium par une étude de diffusion passive.** a/ Sélection des zones couches cornées et couches vivantes, b/ Concentrations en aluminium dans ces différentes couches épidermiques après expositions aux différents agents cosmétiques.

La définition précise des concentrations dans les différentes conditions expérimentales testées de l'ensemble des éléments chimiques, et plus particulièrement de l'aluminium, permet d'estimer la pénétration potentielle de cet élément dans ces mêmes échantillons.

Dans cette étude, nous avons procédé en deux étapes : (i) la sélection de la couche cornée et donc de la région sous-jacente a été réalisée à partir des cartographies PIXE du soufre. Le soufre permet la définition de la couche cornée ; (ii) la définition précise de la couche cornée a également été réalisée en superposant une cartographie PIXE de l'aluminium avec la cartographie STIM de la même zone analysée (densité).

D'après les données quantitatives présentées dans la figure 29, nous pouvons conclure que l'aluminium, contenu dans les différentes formulations et dans les conditions expérimentales testées, ne pénètre pas dans les couches vivantes de l'épiderme.

Les données obtenues sont reportées dans le tableau Figure 29,b. Dans tous les cas, aucune pénétration de l'aluminium n'a été observée. Il est toutefois important de préciser à ce niveau que ces observations sont limitées à la sensibilité de détection et à la résolution de notre instrument.

En conclusion, dans un protocole de diffusion passive appliqué à l'étude de la pénétration transcutanée sur des peaux d'oreille de porc, nous ne mettons pas en évidence de pénétration d'aluminium. La peau de porc est donc imperméable à cet élément.

The skin barrier function: a micro-PIXE study

***X-Ray Spectrom.* 2009, 38, 132–137**

**M. Simon, P. Barberet, P. Moretto, D. Bacqueville, A. Mavon
and H. Seznec**

Article 1

The skin barrier function: a micro-PIXE study

M. Simon,^{a,b,*} P. Barberet,^{a,b} P. Moretto,^{a,b} D. Bacqueville,^c A. Mavon^c
and H. Seznec^{a,b}

Human body is perpetually subjected to environmental exposures as sun, natural, urban or industrial pollutions and societal exposures. Skin is the main physiological barrier facing to these different stresses; however its response mechanisms are still not well understood. Skin models are thus necessary to understand skin physiology and behavior in normal conditions or under stress. Because of the large natural interindividual variability and of some difficulties in obtaining human skin biopsies, we have been developing and characterizing different skin models such as reconstructed epidermis *in vitro*, native pigskin and human keratinocyte cells. These models allow us to study the mechanisms involved in ion homeostasis in correlation with structural organization and biological responses. In the present study, we have characterized the pig ear skin model using micro-particle induced x-ray emission (PIXE) analysis with the aim of evaluating the distribution of inorganic ions under normal or stress conditions together with the transepidermal penetration of external agents, such as aluminum oxides. The nuclear microprobe analysis allowed us to validate the culture conditions of the tissue and we have shown an alteration of the inorganic ion patterns after exposure to a chemical compound (sodium dodecyl sulfate) known for its deleterious effects on the barrier function. Finally, we have shown no transepidermal penetration of aluminum oxides after different exposures to cosmetic formulations. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Introduction

Skin is the largest and outermost tissue in the human body and consequently, it is often exposed, either intentionally or unintentionally, to numerous both natural and chemical agents. Its major function is to protect the body from dehydration, loss of nutrients and unwanted effects of all the environmental agents coming into contact with the skin.

Skin is composed of different stacked layers, with the outermost part of the epidermis made up of a squamous epithelium. The appearance of the different epidermal layers simply results from progressive terminal maturation of the keratinocytes, inside the epidermis. Those cells are the main cellular component of the epidermis. They undergo a continuous differentiation process starting from the basal layer, and finally resulting in the final state of corneocyte cells assembled in the *stratum corneum*, a layer acting as a sort of passive barrier against a large number of diffusible substances.

For reasons of human safety assessment, new chemicals are systematically evaluated for potential toxic or irritant properties by topical application on native skin or on different epidermis models. The most relevant approach to obtain the data would be to conduct *in vivo* human studies, but considering ethical and economic limitations and large interindividual variations, especially in terms of mineral element contents, this is very difficult to achieve. So, there is a strong need to find new alternatives. Among all the animal models proposed and used, the pig ear skin (PES) appears to be of particular interest as it has often been reported to have similar permeability and physiological properties to human skin. On the other hand, PES is relatively easy to obtain.

The goal of the research described here is to contribute to the characterization of an *ex vivo* PES organ culture model by nuclear microscopy. Trace elements, mineral ions and their distribution in the outermost layers of the skin have been elucidated by particle induced x-ray emission (PIXE)/Rutherford backscattering

spectrometry (RBS) microanalyses. Scanning transmission ion microscopy (STIM) was also employed to elucidate the epidermis structure on a microscopic scale. In this paper, we describe the structure of a PES model and its elemental content. Methodological points are also discussed, especially those concerning sample preparation and the reproducibility of the model. In particular, we compared the ionic content of PES samples fixed immediately after delivery in our laboratory with samples fixed after 24-h recovery in order to check possible deleterious effects of sample preparations and culture conditions on the ionic content.

Finally, the putative percutaneous absorption of chemicals, such as aluminum oxides performed on PES has also been investigated using the different nuclear microscopy techniques.

Materials and Methods

Pig ear skin organ culture

Fresh pig ears were obtained from a local abattoir (Montauban, France); to ensure integrity of the skin barrier, ears were removed post-sacrifice before the carcass was exposed to the normal high-temperature cleaning procedure. The studies were carried out using ear skin from six pigs (Pietrain breed, female domestic pig,

* Correspondence to: M. Simon, CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires Bordeaux Gradignan, UMR 5797, Gradignan, F-33175, France.
E-mail: mailto:simon@cenbg.in2p3.fr

a CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires Bordeaux Gradignan, UMR 5797, Gradignan, F-33175, France

b Université de Bordeaux, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, UMR 5797, Gradignan, F-33175, France

c Laboratoire de Pharmacocinétique Cutanée, Institut de Recherche Pierre Fabre, Vigoulet Auzil, France

6 months) slaughtered on the day of the experiments. The ear was washed with water and dried using soft tissue.

PES culture were performed as previously described by Bacqueville *et al.*^[1] Briefly, after cleaning and shaving, the skin was immediately excised from the outer side with a scalpel, then sectioned at a thickness of 500 μm using a dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) and punched into 12-mm-diameter discs (1.1 cm^2). The punch areas were free of structural changes such as scratches, erosions and scars, as such skin damage could affect the organ culture responses to artificial exogenous stress. Before starting the organ culture, the explants were washed for 1 h in the culture medium at 37 °C in a 5% CO_2 /air incubator. The culture medium was Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1-mM pyruvate, 8-mM glutamine, 100-U penicillin, 100- $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 100- $\mu\text{g}/\text{g}$ gentamycin (all from Sigma), 2.5- $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone (Invitrogen) and finally a cocktail of essential and nonessential amino acids. The skin was then seeded dermal side down in polycarbonate Transwell inserts (12 mm diameter, 12- μm pore size, Corning Life Sciences) in 12-well plate prefilled with 1-ml culture medium. Thus, this *ex vivo* organ culture system maintained the explants at the air-liquid interface. The dermis and the epidermis were fed by nutrient diffusion through the insert. The culture medium was changed 2 h after seeding and the skin was cultured for a maximum of 24 h for all experiments.

One set of samples has been prepared following this protocol corresponding to the three conditions (1) T0: nontreated skin. The 12 $\times$ 12 mm^2 of explants were punched at reception; (2) T24: nontreated skin. The explants were fed with 1 ml of fresh culture medium and cultured for 24 h at 37 °C; (3) skin exposed to sodium dodecyl sulfate (SDS). Two hours after seeding, explants were exposed to a solution of SDS 2% (v/v) (Sigma). Immediately after the exposure, samples were fed with 1 ml of fresh culture medium and cultured for 24 h at 37 °C.

Percutaneous penetration experiments

Pigskin biopsies have been exposed to different cosmetic formulations or chemicals according to the protocol established by Mavon *et al.*^[2]: (1) aluminum chloride on normal skin, (2) antiperspiring spray on normal skin, (3) antiperspiring cream on normal skin, (4) cicalfate on normal skin, cicalfate on altered skin by tape stripping and (5) negative control.

Cryofixation and sectioning

All samples were shock-frozen in isopentane chilled by liquid nitrogen and stored under liquid nitrogen until sectioning or in a refrigerator at -80 °C for times ranging from a few days to several weeks. Tissue sectioning was carried out using a classical cryomicrotome equipped with a stainless steel blade in a cryostat at -30 °C. The 16- μm sections were left overnight in the cryostat until complete freeze-drying. Special attention was paid in order to avoid any sample contamination with the chemical elements under investigation [especially for aluminum (Al) studies]. Serial sectioning provided sections for analysis and adjacent sections for histology. The latter were collected on glass microscope slides and were stained with hematoxylin-eosin for examination before analysis. After careful selection under a binocular microscope, the freeze-dried sections were mounted in self-supported mode, stretched between two pieces of carbon tape stuck on specifically designed holders.

Ion beam microanalysis

For elemental mapping and analysis, we carried out different scanning nuclear microprobe techniques on prepared samples: PIXE, RBS and STIM. These techniques, previously described by Moretto in 1996,^[3] provide quantitative data on the distribution and concentration of inorganic ions and on the morphology of the samples. Briefly, skin sections were analyzed using the CENBG nuclear microprobe.^[4] A 1.5-MeV proton microbeam (focused down to a diameter of about 1 μm for STIM and 2 μm for PIXE and RBS) was scanned over areas of interest by means of a fast electrostatic scanning system. In the case of PIXE and RBS, typical beam currents in the range 50–150 pA are used. Induced x-rays emitted from light ions present in the sample (from Na to Ca) are collected by a high-resolution Si(Li) solid-state detector (Oxford Instruments, 145-eV resolution) positioned at 135°. Simultaneously, backscattered protons are detected at -135° by a surface barrier silicon detector (Canberra, partially depleted detector, 25 mm^2 , 12-KeV resolution). PIXE and RBS are carried out simultaneously to determine both the elemental content and the organic mass (carbon, oxygen and nitrogen) of sections. Quantitative results are expressed in terms of normalized concentrations ($\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight).^[5,6]

In the case of STIM analysis, the proton beam is strongly collimated to obtain a beam current of about 1000 protons/s on target. Transmitted protons are detected at 0° behind the sample. This technique allows mapping of the sample density.^[7]

Data reduction

To provide elemental maps, 128 $\times$ 128 pixels matrices are calculated from PIXE and RBS measurements. A simple energy windowing is used to select the x-ray lines and construct yield maps from events stored in the list files. For the extraction of quantitative results, x-rays (PIXE) and particles energy spectra (RBS) are obtained from the regions of interest after a careful identification of the different skin structures. This operation is carried out using the *SupaVISO* software.^[5] X-ray spectra are fitted using the *Gupix* software and the RBS spectra are treated using *RUMPIN*, a dedicated software developed at CENBG for the treatment of organic sections with heterogeneous thickness.^[8–10]

Results and Discussion

Characterization of a pigskin model

In order to characterize the PES model, we have focused our attention on the morphological integrity and on the ion content. These studies have been performed by comparison with reference data previously obtained using reconstructed epidermis (*Skinethics*) and native human skin biopsies prepared and analyzed in the same conditions.^[5,6] As shown on the histology micrograph after hematoxylin-eosin staining of a cryofixed section, the four distinct layers known as *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* and *stratum corneum* can be easily identified (see Fig. 1). A similar well-organized and stratified tissue structure had been previously observed in native human skin biopsies.^[5,6] Using PIXE and RBS microanalyses elemental maps have been obtained for elements ranging from Na to K (PIXE) and C, N, O (RBS). The absolute concentrations of the ion content in the PES freeze-dried sections were also determined.

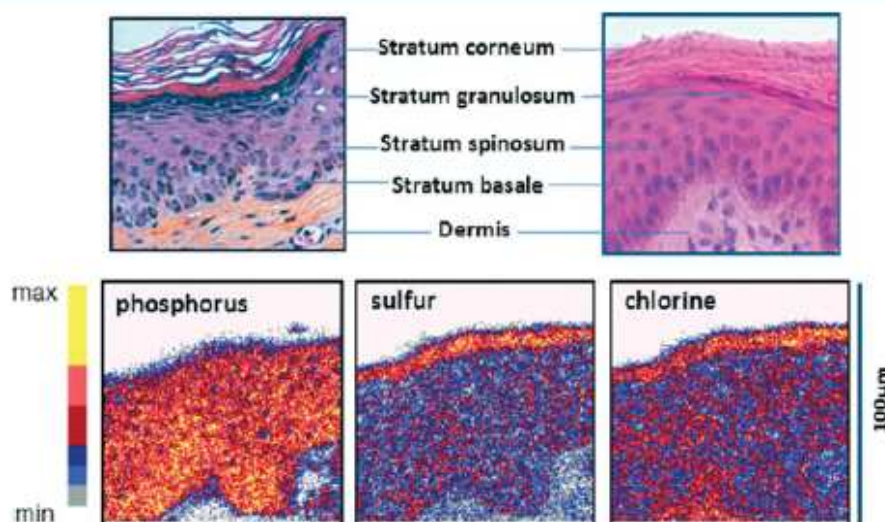


Figure 1. Stratified structure of human epidermis as shown by histological sections (hematoxylin–eosin staining) on native human skin (left) and native pig ear skin (right). Elemental yield maps of P, S and Cl of native pig ear skin (T0) after PIXE analyses. The x-ray emission increases from white to yellow in the scale. There is no conspicuous difference on ion distribution and structural organization between native human skin and pig ear skin.

The PES model confirms that sulfur is an excellent marker of the *stratum corneum* due to the presence in high quantity of proteins (such as keratins).^[11] The *stratum corneum* is indeed composed of protein-enriched cells, the corneocytes, and lipid-enriched intercellular domains. This layer plays an important role in the formation of the physiological barrier that results from the differentiation of keratinocytes within the stratified epithelium. The keratinocyte cells produce keratins, which belongs to a family of proteins that form intermediate intracellular filaments providing flexibility to the cell. The S-containing amino acid cysteine is one of the main components of those proteins, contributing up to 80–90% of the epidermis mass and explaining thus the high quantity of sulfur we have detected.

On the other hand, the phosphorus distribution is presumably due to the presence of nucleic acids at the origin of the cellular source of energy (adenosine triphosphate) and of cell membrane phospholipids mainly present in the *stratum spinosum*. Just after leaving the basal layer, the keratinocyte cells start to differentiate. During their migration through the *stratum spinosum* and *stratum granulosum*, they undergo drastic changes in both structure and composition. They synthesize numerous structural proteins and lipids (such as phospholipids, ceramids). In agreement with previous studies on human native skin by Moretto *et al.* and Pallon *et al.*,^[11,12] the PES analyses show high sulfur and phosphorus levels in *stratum spinosum* and *stratum corneum*, respectively (Fig. 1).

Considering the complete set of elemental maps (from Na to K) obtained using the PES model, no significant difference was found in the distribution of inorganic ions as compared to native or reconstructed human epidermis previously tested. In addition, the phosphorus/sulfur (P/S) and potassium/sulfur (K/S) concentration ratios measured in the different skin models are consistent, especially in the *stratum spinosum* ($P/S = 1.92 \pm 0.3$ and $K/S = 2.99 \pm 0.39$).

In conclusion, our data show that PES displays the same highly organized structure in four strata with the same ion distribution and content already found in native or reconstructed human epidermis during previous nuclear microprobe analyses. These observations contribute to validate the PES as a useful and relevant

human counterpart model for safety assessment and for systematic evaluation of new chemicals.

Culture medium and ion homeostasis

There is nowadays a great concern in modeling some human skin functions using animal tissues aiming at simplifying experimental procedures. When sufficiently characterized, those models have shown a high potential in applied research, especially in the cosmetics field. In this approach, to define precise and reproducible culture conditions, which allow the long-term preservation of explanted tissue is the prerequisite to establish a good *ex vivo* animal model.

In that study, we have tested the effect of defined culture conditions on the ion content of the PES. First, we have focused our analyses on samples maintained in culture at the air/liquid interface during 24 h (T24). In this set of experiments, the corresponding native PES shock-frozen at reception and prepared as described in material and methods (T0) constitutes the reference. The results presented hereafter concern experiments performed on two ears obtained from two different donors.

Figure 2 presents the hematoxylin eosin histological sections and the elemental maps of the following chemical elements: P, S, Cl, Na, K (PIXE) for two samples T0 and T24. We found no obvious alteration in the tissue organization or in the distribution of ions in the epidermis. Furthermore, we mainly focused our quantitative investigations on *stratum corneum* and *stratum spinosum*. As illustrated in Fig. 3, the ion concentrations have not been altered in those layers by the culture conditions. It is interesting to note that no difference was observed in PES coming from two different donors suggesting no drastic interindividual variations. These encouraging results suggest that the defined culture conditions employed to maintain the tissues have no or very limited effect on the ion homeostasis after 24 h of culture. Additional experiments will be performed to confirm these observations with higher statistics.

Exogenous stress and ion homeostasis: SDS stress

The epidermal permeability barrier is believed to come from the extracellular lipid-enriched component of the *stratum corneum*.

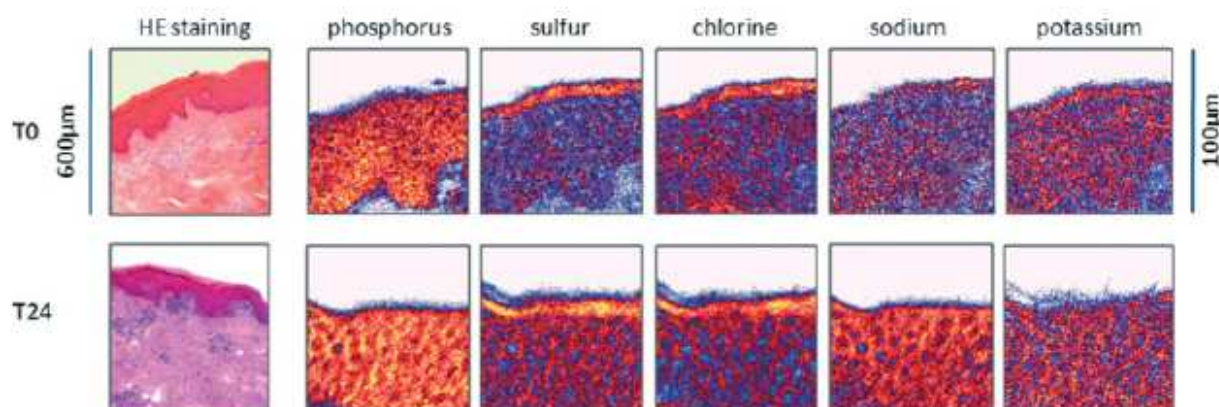


Figure 2. Culture medium and ion distribution. Hematoxylin–eosin staining (left) and elemental yield maps of P, S, Cl, Na and K after micro-PIXE analyses of native pig ear skin (T0) and pig ear skin maintained 24 h above-defined culture medium (T24). There is no major effect of the culture on the ions distribution.

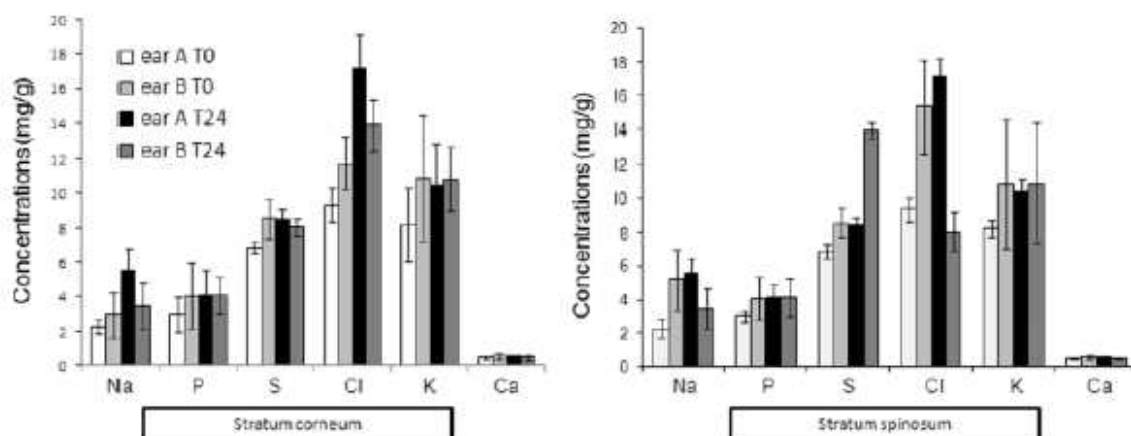


Figure 3. Effect of the culture medium on ion concentrations: histograms of P, S, Cl, Na, K and Ca concentrations in native pig ear skin (T0) and skin maintained above-defined culture medium for 24 h (T24), in *corneum* and *spinosum* strata. There is no significant difference between the T0 and T24 skin ion concentrations.

These intercellular lipid lamellae are thought to mediate transcutaneous water loss and play a vital role in the barrier function. Tape stripping, exposure to solvents (acetone) or detergent treatment are known to perturb this permeability barrier and trigger homeostatic responses in the underlying nucleated layers of the epidermis that lead to barrier recovery.

Acetone is an organic solvent that disrupts barrier function by extracting *stratum corneum* lipids. It results in a significant reduction of lamellar bilayers and in lacunar dilatation within the intercellular domains.^[13,14] On the other hand, tape stripping disrupts barrier function by mechanically removing the *stratum corneum*, including the corneocytes as well as intercellular

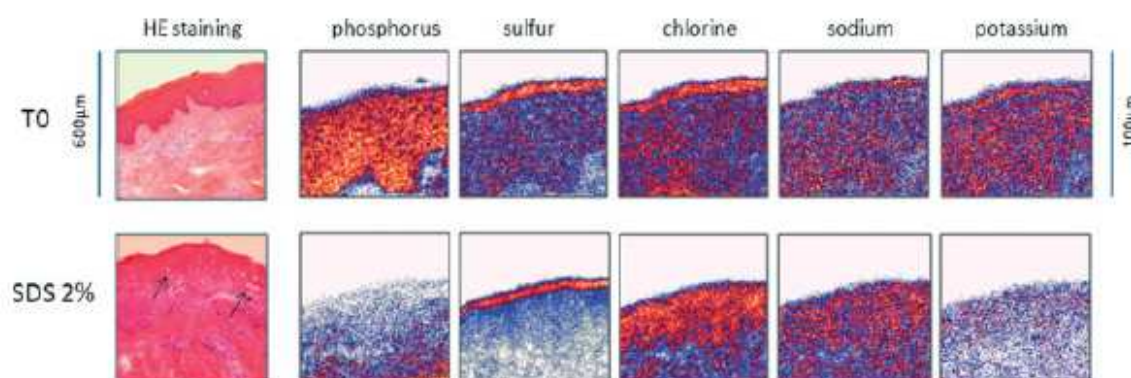


Figure 4. Effect of an exogenous stress on ion homeostasis. Hematoxylin–eosin staining (left) and elemental yield maps of P, S, Cl, Na and K after micro-PIXE analyses of native pig ear skin (T0) and pig ear skin exposed to a 2% of SDS solution and maintained 24 h above-defined culture medium (SDS). Morphological alterations may be seen with the advent of vacuoles, tissue disorganization and altered distribution of the elemental distribution in SDS-treated skins.

lipid bilayers. The surfactant SDS is also known to damage the intercellular lamellar bilayers in *stratum corneum* via the delamination of bilayers.^[15,16] Various studies have demonstrated significant increases in percutaneous absorption of topically applied drugs, such as hydrocortisone, caffeine, lidocaine, 5-aminolevulinic acid, nitroglycerin, ibuprofen, indomethacin, etc., in acetone-treated, tape-stripped and SDS-irritated skin.^[14,17,18] Up to now and even if numerous cell biological changes following those barrier disruptions have been reported, the cellular mechanisms involved are still unknown.

In order to characterize the permeability barrier of our PES model, we have applied different treatments (SDS, tape stripping and UV exposition) on samples maintained for 24 h in culture. The results presented in this paper are those obtained after a chemical exposure to an SDS solution at 2% (v/v). Investigations on the effect of tape stripping and UV exposition are still under progress.

Figure 4 presents a hematoxylin eosin histological sections and the P, S, Cl, Na, K elemental maps (PIXE) for two samples, T0 and SDS treated respectively. The hematoxylin eosin staining reveals the presence of vacuoles in SDS-treated PES and a strong alteration in the tissue organization illustrated by the complete disappearance of a well-defined *stratum basale*.

In addition, the elemental maps reveal highly unbalanced ion distributions within the epidermis, resulting from physiological and cytochemical changes induced by SDS stress. For example, a drastic loss of phosphorus and potassium may be observed in the *stratum spinosum*. The extraction of quantitative results (not shown here) has revealed similar behavior in *stratum corneum*. After SDS exposure, a high sulfur concentration may be still observed in *stratum corneum*. A two-fold concentration factor has been calculated compared with control whereas this factor is only 1.5 in *spinosum*. Consequently, on the sulfur maps of Fig. 4, the contrast between *corneum* and *spinosum strata* is higher for SDS than for T0. In addition, since *stratum basale* is disorganized after SDS treatment, sulfur appears washed out on the map.

This alteration of ion distributions may sign the effect of the SDS treatment at the cellular level, which is known to dramatically alter the membranes' integrity by damaging their lipid bilayers. Since this profound alteration of cellular membrane leads generally to cell death, the loss of intracellular ions such as phosphorus and potassium can indicate the damage of living material within the epidermis. By contrast, the altered distribution of sulfur could be a molecular indication of the complete disorganization of the epidermis. The increased sulfur concentration in both *spinosum* and *corneum strata* can be presumably attributed to the chemical fingerprint of SDS itself. In parallel, biochemical tests based on lactate dehydrogenase (LDH) have been performed in order to study the cell membrane integrity in these conditions. These tests are still in progress.

Even if more studies would be necessary to definitively conclude on the cellular mechanism induced in SDS-treated skin, we can hypothesize that SDS penetrates deeply into the epidermis.

Penetration study of aluminum compounds from cosmetic formulations

Aluminum distribution on skin surface

The second goal of the present study was to evaluate the capability of the micro-PIXE technique to reveal if Al compounds present in different cosmetic products penetrate into native or artificially altered skin from animal (pigskin biopsies). Owing to its multielemental capability, micro-PIXE analysis allows the

simultaneous mapping of several elements in tissue sections. It is thus particularly well adapted for the measurement of transepidermal penetration of mineral ions contained in cosmetic products, such as titanium dioxide^[19,20] or aluminum oxides. The information provided by this technique, makes it possible to investigate the physiological and biochemical mechanisms involved in the barrier function and also to identify the penetration pathways for these chemical substances.

For the different compounds topically applied on pigskin biopsies, the first observations were of Al distribution at the skin surface. Micro-PIXE maps reveal a homogenous distribution at the *stratum corneum* surface for both the spray and cream formulations (Fig. 5). By contrast, the topic application of the cicalfate formulation induced a heterogeneous accumulation that can be seen at the surface of the *stratum corneum* under the form of Al spots. This latest observation is in total agreement with the designed cicalfate formulation (Avène, Pierre Fabre Dermocosmetics).

Transcutaneous penetration of aluminum oxides

In order to evaluate the penetration of Al into the native or artificially altered skins, we have performed a careful micro-PIXE

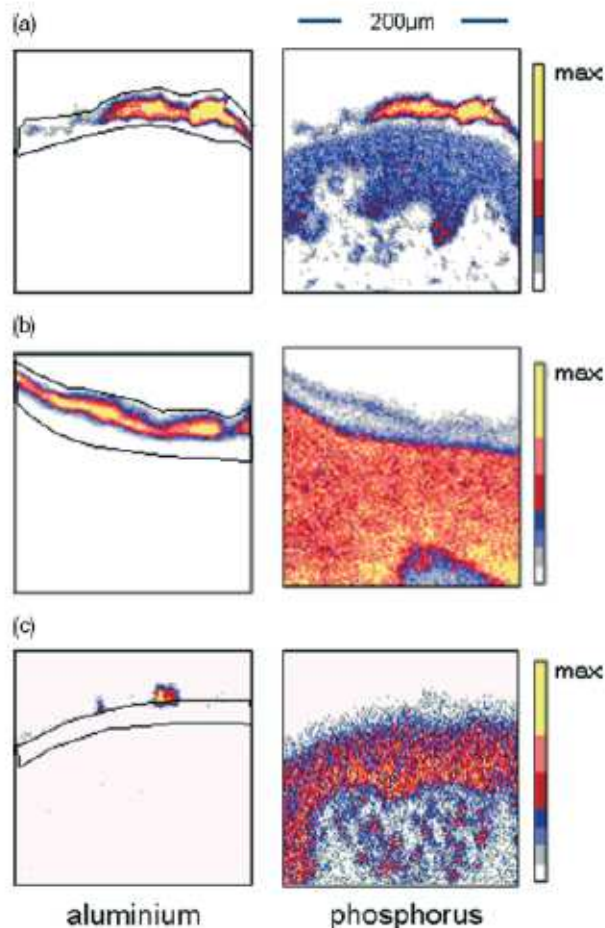


Figure 5. Distribution of aluminium in pigskin sections after different treatments: (a) cream, (b) spray and (c) cicalfate and corresponding phosphorus maps. The maps show that the aluminium distributions at the *stratum corneum* level (black square) are function of the compound tested.

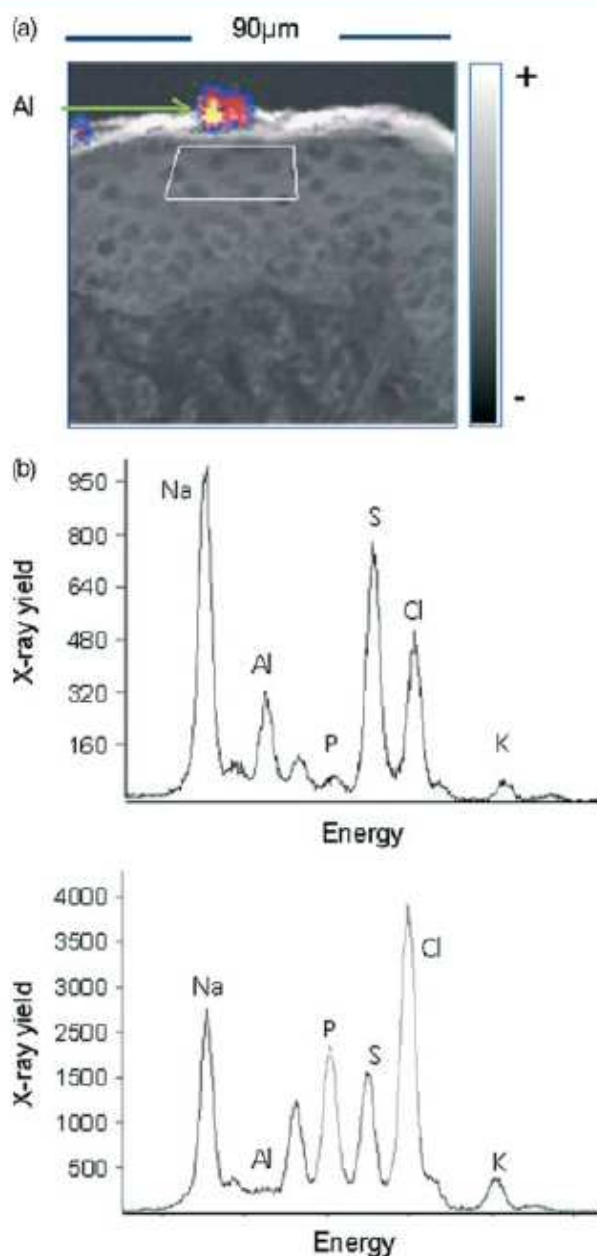


Figure 6. Superimposition of aluminum and STIM maps in a section of pig skin after exposure to cicalfate. X-ray spectra after PIXE analysis: (a) from the stratum corneum area, (b) from a region of interest (ROI) visible on the STIM map (in depth, just under the stratum corneum). There is no x-ray line visible on the ROI spectrum demonstrating the aluminum does not penetrate under stratum corneum.

analysis of the different epidermis layers. This multielemental mapping in combination with the superimposing of STIM maps from the same regions reveals an exclusive localization of Al in the outermost layers. The penetration seems to be limited to the stratum corneum. Quantification of Al in a region of interest located just below the stratum corneum does not reveal any Al trace at the limit of detection of the technique ($10 \mu\text{g/g}$) despite the high Al level detected at the epidermis surface (Fig. 6). According to these observations, we can conclude that Al does not penetrate native or altered skin by tape stripping, at levels exceeding the detection limit.

Conclusions

In this paper, we have reported micro-PIXE analysis of a PES model under development. The aim of this preliminary study was to investigate the tissue morphology using the distribution pattern of mineral ions. As initially described in different skin models such as native human skin biopsies or reconstructed epidermis, we found that these elements are compartmentalized enough to constitute useful markers of the tissue ultrastructure and of its integrity. The present work also provided an additional useful information about the effect of culture medium and SDS treatments on the elemental distribution and contents in the context of an *ex vivo* animal skin model. Complementary analysis should be performed to confirm these data and additional experiments will focus on the effects of tape stripping and UV exposure on the distribution pattern of mineral ions. On the other hand, nuclear microscopy has been also used to evaluate the transcutaneous penetration of metal oxide (Al) present in cosmetic formulations. No penetration of such compound has been found using our experimental methodology. Finally, the present study proved micro-PIXE analysis is a valuable technique to address environmental exposure studies and characterization of mammalian tissue models at the epidermis level due to its multielemental capabilities.

References

- [1] D. Bacquerville, A. Mavon, *Photochem. Photobiol.* **2008**, 84(5), 1164.
- [2] A. Mavon, C. Miquel, O. Lejeune, B. Payre, P. Moretto, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2007**, 20(1), 10.
- [3] P. Moretto, *Cell. Mol. Biol.* **1996**, 42(1), 1.
- [4] Y. Llabador, Ph. Moretto, H. Guegan, *Nucl. Instrum. Meth. B* **1993**, 77(1–4), 123.
- [5] Y. Barbotteau, E. Gontier, P. Barberet, M. Cappadoro, B. De Wever, C. Habchi, S. Incerti, A. Mavon, P. Moretto, T. Pouthier, R. W. Smith, M. D. Ynsa, *Nucl. Instrum. Meth. B* **2005**, 231, 286.
- [6] E. Gontier, P. Barberet, Y. Barbotteau, K. Gáspár, C. Habchi, J. Hunyadi, S. Incerti, B. Kiss, A. Mavon, P. Moretto, T. Pouthier, M. Rosdy, J. E. Surlève-Bazeille, M. D. Ynsa, *X-Ray Spectrom.* **2005**, 34, 381.
- [7] P. Aguer, L. C. Alves, P. Barberet, E. Gontier, S. Incerti, C. Michelet-Habchi, Z. Kertész, A. Z. Kiss, P. Moretto, J. Pallon, T. Pinheiro, J. E. Surlève-Bazeille, Z. Szikszai, A. Verissimo, M. D. Ynsa, *Nucl. Instrum. Meth. B* **2005**, 231, 292.
- [8] J. A. Maxwell, J. L. Campbell, W. J. Teedsdale, *Nucl. Instrum. Meth. B* **1989**, 43, 218.
- [9] P. Moretto, L. Razafindrabe, *Nucl. Instrum. Meth. B* **1995**, 104, 292.
- [10] Biopixe Website. **2004**, <http://biopixe.free.fr/SupaVISIO/news.htm> [12 October 2004].
- [11] P. Moretto, J.-E. Surlève-Bazeille, D. Licu, C. Michelet, P. Stoedzel, *Nucl. Instrum. Meth. B* **1999**, 158, 386.
- [12] J. Pallon, K. G. Malmqvist, Y. Werner-Linde, B. Forslind, *Cell. Mol. Biol.* **1996**, 42(1), 111.
- [13] G. K. Menon, P. M. Elias, *Skin Pharmacol.* **1997**, 10(5–6), 235.
- [14] J. C. Tsai, H. M. Sheu, P. L. Hung, C. L. Cheng, *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90(9), 1242.
- [15] R. R. Warner, Y. L. Boissy, N. A. Lilly, M. J. Spears, K. McKillop, J. L. Marshall, J. K. Stone, *J. Invest. Dermatol.* **1999**, 113(6), 960.
- [16] R. R. Warner, K. J. Stone, Y. L. Boissy, *J. Invest. Dermatol.* **2003**, 120(2), 275.
- [17] D. Wilhelm, P. Elsner, H. I. Maibach, *Acta Derm. Venereol.* **1991**, 71(2), 123.
- [18] J. C. Tsai, I. H. Chen, T. W. Wong, Y. L. Lo, *Br. J. Dermatol.* **2002**, 146(5), 853.
- [19] Z. S. Kertész, Z. Szikszai, E. Gontier, P. Moretto, J. E. Surlève-Bazeille, B. Kiss, I. Juhász, J. Hunyadi, A. Z. Kiss, *Nucl. Instrum. Meth. B* **2005**, 231, 280.
- [20] A. Verissimo, L. C. Alves, P. Filipe, J. N. Silva, R. Silva, M. Dolores Ynsa, E. Gontier, P. Moretto, J. Pallon, T. Pinheiro, *Microsc. Res. Tech.* **2007**, 70(4), 302.

APPLICATION DE L'ANALYSE PAR MICROFAISCEAU D'IONS A L'ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOPARTICULES DE TiO_2

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La fonction barrière et les particules ultra-fines

La barrière cutanée protège le corps de l'influence de l'environnement. Alors que des molécules de faible poids pénètrent dans les couches vivantes de la peau, il est généralement admis que les particules plus grosses ne pénètrent que dans la couche cornée superficielle, à moins de l'existence de microlésions.

En Europe et dans les pays industrialisés, les particules ultrafines comme les particules émises par les moteurs diesel, la poudre des toners, ou encore les pigments, sont de plus en plus présentes dans l'environnement et augmentent les risques d'exposition interne par ingestion et inhalation. **Le risque d'absorption percutanée est également davantage pris en compte.**

Ces particules ultrafines généralement micronisées et souvent sous la forme de TiO_2 entrent dans la composition de nombreux produits domestiques (produits d'entretien ménager) et dermo-cosmétiques (fond de teint, crème de soin, pâte dentifrice, rouge à lèvres et crèmes solaires). La plupart de ces produits étant employés quotidiennement, l'exposition est quasi-permanente. Parallèlement, les pathologies chroniques de la peau n'ont pas cessé d'augmenter en Europe depuis une vingtaine d'années (eczéma, peau atopique, allergies de contact, cancer cutané...). Par ailleurs, l'utilisation croissante de produits cosmétiques, les expositions plus longues et plus fréquentes aux rayons solaires, le taux croissant d'ozone et l'allongement de l'espérance de vie sont autant de facteurs qui peuvent altérer la fonction barrière de la peau et favoriser ainsi cette exposition.

Inocuité des nanoparticules ?

Le préfixe « *nano* » désigne un milliardième d'unité. Un nanomètre (nm) est un milliardième de mètre.

Les nanosciences sont donc l'étude des phénomènes et la manipulation de matériaux à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire. Les nanotechnologies concernent la conception, la caractérisation, la production et la mise en œuvre de structures, de mécanismes et de systèmes par le contrôle de leur forme et de leurs dimensions à l'échelle du nanomètre.

Ce qui fait l'intérêt des nanotechnologies, c'est l'apparition à l'échelle nanométrique de propriétés très différentes de celles constatées pour les mêmes matériaux à des échelles micro- ou macro-métriques.

Il y a deux raisons qui expliquent ces différences : **(i)** les nanomatériaux présentent une plus grande surface, pour une masse donnée, que les matériaux de taille plus importante ; ceci peut

entraîner une augmentation de leur réactivité chimique et modifier leurs propriétés mécaniques ou électriques. C'est ainsi que les nanotubes de carbone sont 100 fois plus résistants que l'acier et 6 fois plus légers ; **(ii)** aux échelles nanométriques, les effets quantiques entrent en jeu et peuvent affecter le comportement optique, électrique et magnétique du matériau initial.

Les nanoparticules manufacturées représentent aujourd'hui un enjeu technologique et économique majeur pour la société. Elles permettent des innovations majeures dans de nombreux domaines : santé, énergie, information, transports, sécurité...

Leur développement très rapide, l'absence de dispositifs réglementaires spécifiques et les inconnues concernant leur toxicité pour l'Homme ont provoqué des réactions d'inquiétude devant des risques qui semblaient nouveaux, en tout cas mal connus. Cette inquiétude s'est cristallisée autour de premiers résultats toxicologiques (nanotubes de carbone...) et sur le corpus d'études indiquant une pathogénicité possible pour l'Homme des particules ultrafines provenant de processus de chauffage ou de combustion (diesel...) présentes depuis toujours sur les lieux de travail et dans l'environnement.

Nous devons rester attentifs quant à l'innocuité des nanoparticules les plus fréquemment utilisées. Parmi ces nanoparticules, le TiO_2 est largement utilisé comme pigment dans les peintures, la nourriture et dans les produits cosmétiques. Le TiO_2 peut être produit sous forme cristalline (rutile, anatase). Sous cette forme, il absorbe les rayonnements ultraviolets et peut générer sous certaines conditions des radicaux libres, notamment dans les milieux vivants. Cette propriété est d'ailleurs exploitée dans la dégradation catalytique de polluants organiques des eaux ainsi que l'élimination de polluants atmosphériques (Hervé-Bazin, 2007).

Les atouts et les caractéristiques propres aux nanoparticules sont, par définition même, leurs dimensions infimes mais aussi leurs propriétés physiques et chimiques particulières qui les distinguent des particules de dimensions supérieures correspondantes. Ce sont ces caractéristiques mêmes qui suggèrent a priori que les nanoparticules peuvent entraîner des effets négatifs pour les systèmes biologiques :

- (i)** la toxicité des particules semble corrélée à la taille ; en d'autres termes, plus les particules sont petites, plus elles sont potentiellement toxiques;
- (ii)** des études indiquent que les nanomatériaux peuvent affecter les comportements biologiques aux niveaux cellulaire et subcellulaire ;

(iii) les nanoparticules semblent traverser les barrières biologiques, en particulier la barrière hémato-encéphalique protégeant le cerveau et plus généralement les membranes cellulaires et l'enveloppe nucléaire séquestrant le génome. De plus, plusieurs tentatives ont été faites pour vérifier si la pénétration percutanée de particules avait effectivement lieu. Des investigations par la méthode de "tape stripping", associée avec différentes techniques d'analyse ont été réalisées pour des applications topiques de crèmes solaires contenant des nanoparticules (de taille entre 20 et 50 nm) soit *in vivo* sur des volontaires sains, soit *in vitro* dans des cellules de Franz après excision de peau normale chez l'animal ou l'homme. Différentes méthodes d'analyses ont été utilisées pour la détection du titane : analyse X en dispersion d'énergie, spectrométrie d'absorption atomique, microscopie électronique. En général, une grande concentration de TiO_2 était trouvée dans les couches les plus externes de la couche cornée avec une décroissance exponentielle de la concentration en fonction de la profondeur (Schulz, 2002, Gontier, 2008). La présence de TiO_2 dans le derme fut démontrée une seule fois (Tan, 1996) mais ne fut pas confirmée par d'autres auteurs. Une étude récente met en évidence une pénétration de TiO_2 via la peau : après une application topique de formulations contenant différentes formes de TiO_2 , durant 30 jours chez le porc, les nanoparticules se retrouvent dans les couches profondes de l'épiderme. La même expérience chez des souris hairless, durant 60 jours met en évidence la présence de TiO_2 dans différents organes (Wu, 2009).

(iv) les mécanismes de défense de l'organisme humain ne sont pas aussi efficaces pour éliminer les nanoparticules des poumons, du tractus gastro-intestinal et d'autres organes que pour les particules plus grosses. Même si la pénétration des nanoparticules se limite à l'épiderme, des effets inattendus comme une réponse immunitaire ou un stress oxydatif peuvent intervenir. En particulier les particules de TiO_2 , bien qu'elles soient souvent considérées comme chimiquement inertes, peuvent générer une réponse immunitaire ainsi qu'un affaiblissement de la barrière cutanée. Un accroissement du taux d'anticorps allergène-spécifiques (IgE) a été rapporté après injection intrapéritonéale de particules de TiO_2 et SiO_2 chez la souris (Granum, 2001).

(v) la plus grande surface totale présentée par les nanoparticules relativement à leur masse entraîne une plus grande réactivité chimique. Il y a production accrue de substances réactives de l'oxygène (ROS), celles-ci endommageant les macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines) (Rahman, 2002), perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire (hyper prolifération, apoptose, mutation). Ces phénomènes de stress oxydant sont impliqués dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives, cancer,) et dans les processus de vieillissement. Ainsi, une action délétère du stress oxydatif sur l'ADN et l'ARN

cellulaire accompagnée d'inactivation enzymatique peut être suspectée au niveau de la peau. Les processus de photo-oxydation catalysés par les particules de TiO_2 ont été démontrés *in vitro* par différentes études. Des applications d'un effet bactéricide ont même été envisagées ainsi qu'une application à la photothérapie de cellules malignes. Une telle activité non photocatalysée cette fois, a pu être également observée lors de la pénétration de particules très fines dans les alvéoles pulmonaires.

A partir de 2004, de nombreuses autorités administratives et sociétés scientifiques américaines et européennes (la Royal Society du Royaume-Uni, le Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk de la communauté européenne, le Comité Consultatif National d'Éthique et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement en France, la Food and Drug Administration aux USA) appellent à la prudence et éditent des principes de précautions face à l'emploi et à la manipulation des nanoparticules. Ces administrations soulignent également que les nanomatériaux présentent un risque potentiel pour les travailleurs exposés et préconisent la mise en place de systèmes de confinement dans les industries.

Vers la définition de la nanotoxicité à l'échelle cellulaire *in vivo* des nanoparticules de TiO_2

Dans ce sens, et étant donnée notre expertise dans le domaine de la micro-analyse par faisceau d'ions, nous avons entrepris de développer une approche expérimentale afin de détecter, suivre et déterminer les effets des nanoparticules de TiO_2 au sein des tissus biologiques. Pour ce faire, nous avons mis en place une procédure qui combine différentes techniques d'analyses et d'imagerie et associé les techniques de synthèse et de modifications chimiques afin de fonctionnaliser des nanoparticules de TiO_2

Les méthodes actuellement validées pour des études de toxicité classique ne se révèlent pas efficaces pour les études de nanotoxicité. Il s'avère nécessaire de développer de nouvelles méthodes permettant l'étude des nanoparticules et du vivant. Ainsi, nous avons développé une nouvelle approche à l'échelle cellulaire afin de détecter, suivre ces nanoparticules et de tester leur toxicité potentielle.

Dans un premier temps, nous avons décidé de travailler sur un type de nanoparticules de TiO_2 particulier, les nanoparticules P25 de la société Degussa. Ces nanoparticules entrent dans la

composition de nombreux produits manufacturés et sont, de par leur utilisation massive, très bien caractérisées. Ces nanoparticules ont une taille moyenne de l'ordre de 30 nm et se présentent sous forme rutile (30%) et anatase (70%). En revanche, ces nanoparticules P25 ne sont pas utilisées dans les formulations dermo-cosmétiques développées pour les crèmes solaires. L'objectif de notre étude était d'obtenir des nanoparticules chimiquement modifiées afin de mettre en œuvre l'ensemble des techniques d'analyses disponibles en biologie cellulaire, et plus particulièrement les techniques d'imagerie en fluorescence.

Ainsi, il nous était possible de combiner trois techniques de microscopies à haute résolution (confocale, électronique et analyse par faisceau d'ions) afin de définir la toxicité de ces nanoparticules *in vitro/in vivo*.

Les résultats majeurs que j'ai obtenus durant cette étude sont les suivants :

(i) **Fonctionnalisation.** A l'aide d'une méthode simple de greffage chimique, nous avons réussi à modifier chimiquement ces nanoparticules à l'aide de molécules fluorescentes, classiquement utilisées en biologie (Fluorescéine, Rhodamine). Il est intéressant de noter que cette méthode de greffage, nous a permis d'obtenir rapidement et simplement des nanoparticules de TiO₂ fluorescentes. Les caractéristiques physico-chimiques de la nanoparticule n'interfèrent pas avec les processus physiques liés à l'excitation/émission de fluorescence. Ainsi, j'ai pu obtenir des nanoparticules de TiO₂ fluorescentes dont l'utilisation s'est avérée simple et aisée dans les conditions de culture cellulaire et compatible avec les techniques d'imagerie en épifluorescence et avec les protocoles d'immunodétection.

(ii) **Localisation subcellulaire.** De manière encore plus intéressante, mon étude a permis de montrer que non seulement ces nanoparticules chimiquement modifiées permettent de les suivre et de les localiser *in vitro* sur des populations cellulaires de kératinocytes, mais qu'elles ne présentent pas de différence de comportement par rapport aux nanoparticules natives. Ces nanoparticules présentent le même comportement de solubilisation, d'agrégation et présentent la même localisation biologique à l'échelle cellulaire. Les nanoparticules de TiO₂, modifiées ou non, se localisent dans les kératinocytes dans une zone périnucléaire, exclusivement cytoplasmique. Les données obtenues en microscopie électronique ne montrent pas de nanoparticules dans le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. En revanche, une étude réalisée en microscopie confocale, avec un marquage spécifique de l'appareil de Golgi à l'aide d'un anticorps dirigé contre la Golgin-67 de cellules exposées au TiO₂ fonctionnalisé semble indiquer une **co-localisation entre l'appareil de Golgi et les nanoparticules de TiO₂.**

De manière intéressante, la modification de l'état de surface des nanoparticules n'altère pas leur biodisponibilité, ni leur bio-distribution.

(iii) **Prolifération cellulaire.** L'impact d'une exposition de kératinocytes humains à ces NPs a été étudié. J'ai ainsi mis en évidence une diminution de la prolifération cellulaire en présence de NPs de TiO_2 . Les cellules exposées au TiO_2 modifié présentent aussi une diminution de la prolifération mais 2 fois moindre qu'en présence des nanoparticules d'origine. Cette différence n'est pas fonction du fluorophore utilisé et souligne donc **la relation entre état de surface et toxicité des nanoparticules.**

(iv) **Mort cellulaire.** La diminution de la prolifération pouvait être imputée à l'apparition de mort cellulaire des cellules exposées aux NPs de TiO_2 . J'ai réalisé des marquages à l'Annexine V (marqueur précoce de l'apoptose), l'iodure de Propidium (marqueur de nécrose), Caspase-3 clivée (marqueur tardif de l'apoptose). Ces études n'ont pas révélé de différence entre les cellules contrôles et les cellules exposées au TiO_2 . La diminution de prolifération cellulaire n'est donc pas due à une augmentation de la mort cellulaire, ni par apoptose, ni par nécrose.

(v) **Altération de l'homéostasie ionique.** Des analyses par microfaisceau d'ions ont été réalisées afin de déterminer si la composition chimique élémentaire des cellules variait lorsqu'elles étaient cultivées en présence de TiO_2 . L'analyse quantitative à l'échelle cellulaire ne révèle pas de modifications majeures dans la distribution et la composition chimique élémentaire pour la plupart des espèces chimiques étudiées (Na, Mg, P, S, Cl, K...). L'internalisation du TiO_2 a pu être estimée. Ainsi, j'ai pu montrer que l'état de surface des nanoparticules ne modifie en rien leur internalisation cellulaire. La différence de toxicité biologique des nanoparticules ne peut donc être expliquée par une différence d'internalisation (dose) mais plutôt par une modification de leur état de surface. Il est de plus intéressant de souligner qu'indépendamment de leur concentration, nous observons une **augmentation significative de la concentration en calcium** intracellulaire. L'augmentation de calcium intracellulaire est donc associée à l'état de surface des nanoparticules et également associée au niveau de prolifération cellulaire, c'est-à-dire du niveau de toxicité des nanoparticules.

(vi) **Calcium intracellulaire et différenciation kératinocytaire.** Il est très bien défini et décrit qu'une augmentation de calcium intracellulaire induit la différenciation des kératinocytes et entraîne une modification du cytosquelette d'actine (Pillai, 1990).

Afin de vérifier l'induction de la différenciation dans les kératinocytes exposés à des NPs, j'ai étudié l'expression de l'involucrine, protéine exprimée essentiellement dans les couches épineuse et granuleuse de l'épiderme et utilisée comme marqueur d'expression tardif de la

différenciation des kératinocytes. J'ai ainsi pu mettre en évidence **l'induction précoce de la différenciation** des cellules exposées aux NPs.

De plus, dans les cellules exposées à des nanoparticules, le **réseau d'actine est très significativement modifié avec une organisation périphérique dans les cellules**. Cette organisation dite « en nid d'abeille » est typique d'une réorganisation induite par une augmentation du calcium intracellulaire (Zamansky, 1991). Ces observations montrent que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire s'accompagne de conséquences cellulaires significatives (différenciation) et rendent compte de la toxicité de ces nanoparticules.

Enfin, ces données montrent une relation entre toxicité des nanoparticules et l'homéostasie du calcium intracellulaire, relation qui a déjà été décrite pour d'autres types de nanoparticules sur d'autres types cellulaires.

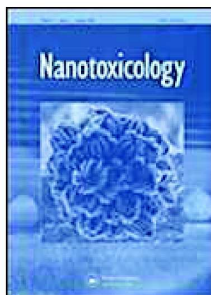
Ces données soulignent donc l'importance de l'homéostasie ionique comme voie métabolique potentiellement altérée en réponse à des expositions à des nanomatériaux.

L'ensemble des résultats est résumé dans l'article qui suit, soumis à publication.

**Intracellular Localization and Cytotoxicity of
Bared and Fluorescent Dye -Modified Titanium
Dioxyde Nanoparticles. Evidence of calcium
Homeostasis Alteration in Nanotoxicity
Mechanisms**

Article 2, soumis

**M. Simon, P. Barberet, M.H. Delville, P. Moretto,
and H. Seznec**



Intracellular Localization and Cytotoxicity Consequences of Bare and Fluorescent Dye-Modified Titanium Dioxide Nanoparticles. Evidence of Calcium Homeostasis Alteration in Nanocytotoxicity Mechanism

Journal:	<i>Nanotoxicology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	SIMON, Marina; Université Bordeaux1-CNRS/IN2P3, Interface Physique Biologie BARBERET, Philippe; Université Bordeaux1-CNRS/IN2P3, Interface Physique Biologie DELVILLE, Marie-Hélène; CNRS, Université de Bordeaux Moretto, Philippe; CNRS-IN2P3/Université de Bordeaux, CENBG SEZNEC, Hervé; Université Bordeaux1-CNRS/IN2P3, Interface Physique Biologie
Keywords:	Nanotoxicology, Nanoparticles, Mechanistic toxicology, Surface Chemistry



URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/tnan> Email: nanotoxicology@napier.ac.uk

Intracellular Localization and Cytotoxicity Consequences of Bare and Fluorescent Dye-Modified Titanium Dioxide Nanoparticles. Evidence of Calcium Homeostasis Alteration in Nanocytotoxicity Mechanism

MARINA SIMON ¹, PHILIPPE BARBERET ¹, MARIE-HÉLÈNE DELVILLE ², PHILIPPE MORETTO ¹ & HERVÉ SEZNEC ^{1,*}

¹ Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, Université de Bordeaux, CNRS/IN2P3, Chemin du Solarium, BP120, 33175 Gradignan, France, and ² CNRS, Université de Bordeaux, ICMCB, 87 avenue du Dr. A. Schweitzer, Pessac, F-33608, France

Correspondence: Hervé Seznec, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, Université de Bordeaux, CNRS/IN2P3, Chemin du Solarium, BP120, 33175 Gradignan, France. Tel: + 33 557120864. Fax: + 33 557120801. E-mail: seznech@cenbg.in2p3.fr

email addresses: simon@cenbg.in2p3.fr, barberet@cenbg.in2p3.fr, moretto@cenbg.in2p3.fr, delville@icmcb-bordeaux.cnrs.fr, seznech@cenbg.in2p3.fr

Keywords: Titanium, Nanoparticles, Cytotoxicity, Calcium Homeostasis, Cellular Imaging

Abstract

Deciphering the molecular basis of toxicology mechanism induced by nanoparticles (NPs) remains an essential challenge. In that purpose, we have successfully designed and synthesized fluorescent dye-modified TiO₂-NPs to not only detect and precisely quantify TiO₂-NPs but also track them *in vivo*. Combining three convergent high resolution imaging techniques (Transmission Electron Microscopy, Confocal Microscopy, Ion Beam Analysis), we provide both functional and quantitative results on the biological effects of both bare and fluorescent dye-modified TiO₂-NPs on keratinocytes. We evidence that the internalization of TiO₂-NPs altered the calcium homeostasis, a key cellular ion, inducing marked changes in the cell fate with a decrease in cell proliferation not associated to cell death but to an early keratinocyte differentiation. Additionally, our data clearly establish the relation between the state surface of the TiO₂-NPs and cytotoxicity and emphasize the importance of the calcium homeostasis alteration, as a common metabolic response in the presence of nanomaterials.

Introduction

The explosive growth in nanotechnology which refers to the study and design of systems at the scale of the atom, or the nanoscale, and bioengineering fields has led to a large number of new nanomaterials in order to create unique devices with novel targeted physical and chemical functional properties (Sounderya et al. 2008; Murr 2006; Hilt and Peppas 2005; Stevens and George 2005; Sharma et al. 2006). Indeed, nanoscale bioengineering focuses on the development of a fundamental understanding of nano-biostructures and processes, nanobiotechnology and techniques for a broad range of applications in biomaterials, biosystem based electronics and health (Freitas 2005; Suh et al. 2009). Materials and systems at the nanoscale operate to perform the vital functions required by living organisms, it is therefore logical that scientists are attempting to understand and mimic Nature's accomplishments. For such purposes, the use of nanoparticles is crucial, with sizes ranging from 1 to 100 nm, they approach that of proteins, DNA and other biological species and can then be used in bio-applications such as therapeutics (Silva 2008; De Jong and Borm 2008), anti-microbial agents (Rai et al. 2009; Li et al. 2008-a), transfection vectors (Slowing et al. 2008; Kumar et al. 2004), and fluorescent labeling (Wang et al. 2006; Moeller and Fritzsche 2006). However, the risks for adverse health effects due to prolonged or repetitive exposures at various concentration levels in humans have not yet been clearly established and results are scarce (Donaldson and Seaton 2007; Buzea et al. 2007). It has been notified by different public and governments' worldwide authorities that the current methods for chemical safety assessments had to be modified and reevaluated to address the particular characteristics of nanoparticles and more especially to assess the biological effects of these highly reactive materials (Linkov et al. 2009). In particular, the behavior of nanoparticles inside living cells is still an enigma, and no metabolic responses induced by these particles are understood so far. Nanotoxicology

(Brayner 2008; Oberdörster et al. 2005) takes up this challenge to decipher the molecular events that regulate bioaccumulation and toxicity of nanoparticles.

Titanium dioxide (TiO_2) is a natural mineral found primarily in rutile, anatase, and brookite forms. It is widely used in cosmetics (Nohynek et al. 2008), water treatment (Li et al. 2008), and pigment industries (Sahu et al. 2006). TiO_2 -NPs were previously classified as biologically inert, but after such widespread use, their potential to penetrate skin (dermal penetration), gastrointestinal tract (ingestion), respiratory tract (inhalation) and blood circulation (injection) suggests that TiO_2 -NPs could induce an exposure risk to humans (IARC 2006). Numerous *in vitro* studies have reported toxicity in various cell types with different observations (Federici et al. 2007; Lai et al. 2008; Li et al. 2008-b, Rahman et al. 2002; Kiss et al. 2008). As many nanomaterials, TiO_2 -NPs have been shown to localize within the cells (Pioletti et al. 1999; Osano et al. 2003; Geiser et al. 2005). The toxicological alarm can be explained by the multiple properties of nanoparticles, such as small size, large specific surface area, and generation of free radicals. TiO_2 -NPs can cause inflammation (Sayes et al. 2006; Donaldson et al. 2001), fibrosis, pulmonary damage (Warheit, et al. 2006), and even DNA damage (Rahman et al. 2002). Eventually, the production of reactive oxygen species (Long et al. 2007; Park et al. 2008; Xia et al. 2006), photogenotoxic potential and genotoxicity (Wang et al. 2007; Vevers and Jha 2008) have also been reported in different cell systems. Up to now, it has been very difficult to detect, track, and precisely quantify TiO_2 -NPs (with high resolution microscopy), in cell cultures, simultaneously with proteins localization, specific sub-cellular compartments as well as metabolic pathways. In this paper, we propose to validate a new imaging methodology that allows *in vitro* studies, combining technologies for on the one hand, the detection, tracking, and quantification of TiO_2 -NPs and on the other one, the use of indicators for ion homeostasis, cell metabolism, or cell fate. This work presents the results of the *in vitro* biological effects of fluorescent-dye modified TiO_2 -NPs analyzed with three

different convergent techniques: transmission electron microscopy, ion beam analysis, and confocal microscopy.

For this purpose, we used cultured human skin cells (primary human foreskin keratinocytes - PHFK), as an *in vitro* model for epidermal toxicity and various concentrations of bare or chemically modified TiO₂-NPs homogeneous suspensions. Following the nanoparticles uptake, a comprehensive study of their cytotoxic effects was performed to determine their cytotoxic potential and threshold. The choice of the keratinocyte cells is due to the fact that they are potential targets after skin exposure to exogenous nanoparticles (cell culture monolayer is exposed to homogeneous suspensions of TiO₂-NPs sonicated in serum-free cell culture medium). The TiO₂-NPs considered here are commercially available nanosized P25 from Degussa (30 nm in size). This material is uncoated, photo-active and consists in a mixture of anatase (80%) and rutile (20%) phases. Degussa P25 is a widely distributed material used in water treatment, self-cleaning windows, and anti-microbial coatings and paints and should not be confused with the non-photoactive nanomaterial currently used in sun blocks and cosmetics.

Material and Methods

Nanoparticles

TiO₂-P25, 80% anatase and 20% rutile was obtained from Degussa AG (Düsseldorf, Germany). Specific surface area by BET 55 m²g⁻¹, particles diameter between 25 nm and 35 nm.

Synthesis of fluorescent dye-modified TiO₂-NP

0.6 g of TiO₂-NPs (TiO₂-P25, Degussa) were dispersed in 50 mL of a solution of ethanol containing 3 mL of ammonium hydroxide. 100 µL (6 equivalents) of aminopropyl triethoxysilane were added to the mixture. The suspension was stirred for 48 hours in a water bath at room temperature (RT) and 2 hours at 100°C. After five cycles of washing using ethanol and centrifugation (8000 g, 10 min), the residual powder of amino-doped TiO₂ NPs was dispersed in 30 mL of a 0.01 M carbonate/bicarbonate buffer (Na₂CO₃, pH 10.7). 0.007 g of TRITC or 0.005 g of FITC were added, respectively. The suspension was stirred at room temperature for 48 h. The excess of unreacted TRITC/FITC was removed by five cycles of centrifugation (8000 g, 10 min) –dispersion in ultra pure water (5 min of sonication in a continuous mode). The TRITC-TiO₂-NPs and FITC-TiO₂-NPs were dried for 24 hours in a vacuum at 40°C.

Fluorescent dye-modified TiO₂-NPs suspension

Suspensions of fluorescent dye-modified TiO₂-NPs and corresponding native TiO₂-NPs were prepared in Keratinocyte-SFM medium (Invitrogen) at a final concentration of 0.1 and 1 mgmL⁻¹. Nanomaterials were dispersed by sonication at RT using a continuous mode, 3 x 5 min. These suspensions were sterilized by autoclaving and will be called “stock suspensions”.

For cell exposure, these stock suspensions were diluted at the appropriate concentration in culture medium in order to obtain exposure suspensions of final concentrations ranging from 0.2, 2 to 20 μgcm^{-2} . As TiO_2 nanoparticles in suspension in culture medium tend to deposit on cell dish, it is well admitted to consider a concentration per surface area of culture instead of a concentration per volume of culture medium. Concentration per surface allows a better reproducibility between experiments independently from the cell culture dish used. These suspensions were passed on a needle (28G, Terumo) and sonicated 3 times 5 min at RT.

Characterization of fluorescent dye-modified TiO_2 -NPs suspensions

TEM was performed at RT on a JEOL JEM-2000 FX transmission electron microscope, using an accelerating voltage of 200 kV. Diffuse reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) characterizations were performed using a Bruker IFS Equinox 55FTIR spectrometer (signal averaging 64 scans at a resolution of 4 cm^{-1} in KBr pellets containing ca. 2 mass % of material). X-ray photoelectron spectra (XPS) were obtained using a VG 220i-XL Escalab spectrometer, employing non-monochromatized $\text{MgK}\alpha$ source ($h\nu = 1253.6$ eV). The X-ray gun was operated at 10 kV and 20 mA (pressure: 10^{-8} bar). Powdered samples were pressed onto small indium foils and survey spectra obtained in the constant pass energy mode of 150 eV. The C1s contamination line (BE = 284.6 eV) was used to calibrate all binding energy values.

Cell culture

PHFK cells, derived from normal human tissue, were obtained from Invitrogen. They were grown in Defined Keratinocyte-SFM supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin/streptomycin. They were maintained at 37°C in a 5% (v/v) CO_2 atmosphere and passed at 80% of

confluence. Exposures to fluorescent dye-modified TiO₂-NPs and corresponding native TiO₂-NPs, respectively, were done on sub-confluent cells.

Measurement of cell population doublings

PHFK cells were seeded in 6-well plates at a density of 10 000 cells/well. After 24 h of culture, cells were exposed to 2 mL of fresh medium supplemented with exposure suspensions containing bare TiO₂-NPs, TRITC-TiO₂-NPs and FITC-TiO₂-NPs, respectively, at final concentrations of 0.2, 2 or 20 µgcm⁻². Every 24 hours, cells were collected using trypsin-EDTA (0.25%) and resuspended in another culture medium for counting using a Malassez cell.

Cell preparation for transmission electron microscopy (TEM)

Cells grown on 8-well Labtek II (Nunc) were exposed during 24 h to bare or fluorescent dye-modified TiO₂-NPs. These treatments result in exposure of the culture monolayers to 0.2 and 2 µgcm⁻² respectively. Cells were chemically fixed in 2.5% glutaraldehyde. After rinsing the samples twice with 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4 and 5 min for each rinsing), post-fixation was performed for 1h30 at RT using a 1% osmium tetroxide solution in 0.1 M PBS at pH 7.4. After two 5 min additional rinsing steps in the same type of buffer, dehydration was carried out in an ethanol series at RT. Then the specimens were immersed twice in propylene oxide before embedding them in a mixture (1:1) of propylene oxide and Epon 812 for 2 h, then in pure Epon overnight and then in pure fresh Epon for 4 h. Polymerization took place at 60°C for 48h. Ultra-thin (50-100 nm) sections were cut from the embedded samples using an ultramicrotome (Leica) equipped with a 35° diamond knife (Diatome). Sections were collected on copper grids (Delta microscopie), counterstained with lead citrate and uranyl

acetate, and were investigated in a transmission electron microscope (H7650, HITACHI) with an 80 kV acceleration voltage.

Membrane permeability to propidium iodide (PI)

Cell number, concentrations, and culture conditions were similar for all the performed analyses. After exposure to TiO₂-NPs, TRITC-TiO₂-NPs or FITC-TiO₂-NPs, cells were stained with PI and Hoechst³³³⁴² for 15 min and then cells/samples were analyzed (605-635 nm and 405 nm, respectively). Each experiment was repeated at least 3 times.

Cell preparation for immunodetection

Cells grown on glass slides were exposed during 24 h to fluorescent dye-modified TiO₂-NPs (0.2, 2 μgcm^{-2}). Cells were fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 15 min at 4°C followed by permeabilization with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 min. They were then pre-incubated with 1% (w/v) BSA in PBS for 30 min to block non specific staining.

Annexin-V staining. Annexin-V staining was performed to differentiate apoptosis from necrotic cell death. The staining was carried out as manufacturer's instruction. Analyses were performed by serial acquisition using epifluorescence microscopy and ImageJ analysis software cell counting.

Actin reorganization studies. After repeated washings with PBS, F-actin was labeled with tagged AlexaFluor⁵⁹⁴-phalloidin (Molecular Probes). Slides were mounted and visualized on Leica DMRE TCS SP2 AOBS confocal microscope.

Involucrin detection. After fixation and permeabilization, cells were incubated with mouse monoclonal anti-involucrin antibody (SY5 clone, Santa Cruz Biotechnology) and with goat anti-mouse AF⁴⁸⁸ antibody. Slides were mounted and visualized on confocal microscope.

Golgi apparatus immunodetection. In Golgi colocalization experiments, exposed cells were incubated with anti-human golgin-97 mouse monoclonal antibody (Molecular Probes) and with goat anti-

mouse IgG conjugated to AlexaFluor⁴⁸⁸ or AlexaFluor⁵⁹⁴ antibody, depending on the fluorescent-dye modified TiO₂-NPs used. Slides were mounted and visualized on confocal microscope.

Image Acquisition with Confocal Laser Scanning Microscopy

Three-dimensional images were acquired with a Leica DMRE TCS SP2 AOBS confocal microscope (oil-immersion objective x 63, 1.4 NA), assembled, and reconstructed using the Leica Confocal software. During z-acquisition, data were recorded in up to three channels simultaneously and stacks of horizontal slices were collected automatically using an optimized z-step (around 0.240 μm). Sets of 50 to 100 slices were recorded per z-stack to map the entire cellular volume. Image acquisition (512*512 pixels, 8 bits) under well-defined criteria is essential for error-free and subsequent objective analysis. Confocal Laser Scanning imaging allows evaluation of the 3-dimensions distribution of cellular volume with improved spatial resolution compared to epifluorescence sectioning microscopy. We applied confocal scanning to map the 3-dimensions of cellular volume into several 2D images (z-Stack). Image stacks were stored as Tiff files and transferred to a PC running on Microsoft Windows XP.

Cell preparation for Ion Beam microanalysis (IBA)

Cells were cultured directly onto ion beam microprobe sample holders as adapted from previous studies (Carmona et al. 2008). Briefly, cells were directly grown at 60 % confluence on 2- μm -thick polycarbonate foil for 24 hours in defined keratinocyte medium, and then exposed to fluorescent dye-modified TiO₂-NPs and bare TiO₂-NPs for 24 h at different concentrations (0.2, 2 or 20 μgcm^{-2}). Control cells were prepared similarly with no addition of TiO₂-NPs. Cells were rinsed twice in defined keratinocyte medium, rinsed in phosphate buffered saline (PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺), and very briefly rinsed in ultrapure water to

remove excess of extracellular salts from PBS. Finally, cells were cryofixed at -160°C into liquid nitrogen chilled isopentane, and freeze-dried at -35°C for 96 h. For elemental mapping and analysis, different scanning nuclear microprobe techniques were carried out on samples: PIXE and RBS. These analytical techniques provide both high resolution morphological imaging and precise quantitative data concerning the elemental chemical composition, their spatial distribution and concentration.

Ion beam microanalysis (IBA)

Quantitative chemical element imaging was carried out at the microprobe beamline of AIFIRA facility using the two complementary ion beam analytical techniques: PIXE and RBS. AIFIRA facility involves a 3.5 MV HVEE Singletron particle accelerator. Briefly, freeze-dried cells were analyzed using the CENBG nuclear microprobe. A 1.5 MeV proton microbeam (focused down to a diameter of about 2 μm for PIXE and RBS) was scanned over areas of interest by means of a fast electrostatic scanning system. Measurements on narrow areas containing a limited number of cells (usually 1 to 10) were performed. This spatial resolution enabled to discriminate the cytosol and nuclear areas of the cells. The acquisition time and the scan sizes ranged respectively from 8 to 12 hours and from 60 x 60 to 150 x 150 μm^2 . In the case of PIXE and RBS, typical beam currents in the range of 50–150 pA were used. Induced X-rays emitted from light ions present in the sample (from Na to Ca) were collected by a high-resolution Si(Li) solid-state detector (Oxford Instruments, 145-eV energy resolution) positioned at 135°. Simultaneously, backscattered protons were detected at -135° by a silicon detector (Canberra, partially depleted detector, 25 mm^2 , 12 KeV resolution). PIXE and RBS were carried out simultaneously to determine both the elemental content and the organic mass (carbon, oxygen, and nitrogen) of cell populations. Quantitative results were expressed in terms of normalized concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight).

Data reduction

To provide elemental maps, 128×128 pixels matrices were calculated from PIXE and RBS measurements. A simple energy windowing was used to select the X-ray lines and construct yield maps from events stored in the list files. For the extraction of quantitative results, X-rays (PIXE) and particles energy spectra (RBS) were obtained from the regions of interest. This operation was carried out using the SupaVISIO software (Biopixe web site 2004). X-ray spectra were fitted using the Gupix software (Maxwell et al. 1989) and the RBS spectra were treated using the SIMNRA software.

Results

Design and synthesis of fluorescent-dye modified TiO₂-NPs

Our experiments were designed to obtain fluorescent dye-modified nanoparticles choosing commonly used molecules in biology such as Fluorescein Isothiocyanate (FITC) and Tetra-Methyl-Rhodamine-Isothiocyanate (TRITC). The design, synthesis, and chemical characterizations of these fluorescent dye-modified TiO₂-NPs (FITC-TiO₂-NPs and TRITC-TiO₂-NPs, respectively) are detailed in the Material and Methods Section. Briefly, this surface modification was realized in two major steps. The first step consists in the grafting of aminopropyl triethoxysilane on bare TiO₂ (P25 from Degussa). The second step allowed the grafting of the fluorescent-dye (FITC or TRITC) on aminopropyl triethoxysilane which plays the role of a link between TiO₂-NPs and fluorescent-dye. DRIFT and XPS data confirmed the chemical modification of the NPs.

TiO₂-NPs decreased the keratinocyte proliferation

Viability assays are essential in toxicology because they may explain the cellular response to a toxic agent. They also give information on cell death, survival, as well as metabolic activities. To perform these tests, cells have to be maintained in culture for several days. Thus, it was necessary to obtain nanomaterials with properties suitable for cell culture, routine microscopy, and high resolution microscopy and compatible with classical biological markers such as fluorescent-labeled antibodies or fluorescent indicators. The cell proliferation in response to different concentrations of either bare or fluorescent TiO₂-NPs present in the culture media was evaluated by a cell population doubling assay. In a first step, we focused on cell proliferation response to bare TiO₂-NPs. Figure 1a presents an average growth curve of

PHFK in culture medium with incubation time (one to eight days) for different doses of native TiO₂-NPs. [Insert Figure 1 about here]

Whatever the TiO₂-NPs concentrations are, the cell proliferation is basically the same, for the four first days. Dramatic changes occurred on the fifth day and as the concentration of TiO₂-NPs increased, the cell proliferation after 8 days of incubation was seriously altered in a dose-dependent way. In comparison with the control cell population, cells exposed for 8 days to 0.2 μgcm^{-2} TiO₂-NPs showed a proliferation decrease of 13 % whereas those exposed to 20 μgcm^{-2} TiO₂-NPs exhibited a proliferation decrease as high as 93 %. In a second step, we undertook a cell population doubling assay with fluorescent-dye modified TiO₂-NPs in order to determine their impact on the cell proliferation status (Figure 1b).

Figure 1b shows that whatever the surface state of the nanoparticles, the TiO₂-NPs treatment induced a dose-dependent decrease cell proliferation. Even if the fluorescent dye-modified TiO₂-NPs follow the same trends, they however, seem to be much less aggressive than native nanoparticles (with a cell population twice as high as in the case of native TiO₂-NPs).

In order to determine (i) if there is a difference in the cellular uptake and localization (ii) the presence or not of specific cell death characteristics, PHFK cells were exposed to different doses of TiO₂-NPs, FITC-TiO₂-NPs, and TRITC-TiO₂-NPs and studied in details after a prolonged incubation period of 8 days.

After the uptake of the initially well-dispersed fluorescent dye-modified nanoparticles in PHFK, the aim was first to examine their specific localization in the different compartments of the cell and the relationship with cytotoxic effects. PHFK were cultured with the three different kinds of nanoparticles, TiO₂-NPs, FITC-TiO₂-NPs and TRITC-TiO₂-NPs, respectively.

Internalization and intracellular distribution of TiO₂-NPs

Cell imaging was performed after 24 h, using phase contrast microscopy. Interestingly, most of the TiO₂-NPs were detected as dark and dense deposits mainly aggregating in/on the keratinocytes with a specific pattern suggesting a perinuclear distribution. These observations did not show marked morphological changes, which are the first and most readily noticeable effects following exposure of cells to toxic materials, indicating the keratinocytes were still healthy. Ultra-thin sections of fixed keratinocytes were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM) as illustrated in Figure 2. [Insert Figure 2 about here]

A common result is that the different kinds of TiO₂-NPs displayed the same ability to enter the cell and to locate in the perinuclear region independently of their surface state. Figure 2 illustrates this bio-distribution of the TiO₂-NPs in keratinocytes treated with 2 µgcm⁻² of TiO₂-NPs and FITC-TiO₂-NPs. Untreated cells showed no abnormalities (Figure 2a, Figure 2c), whereas exposed cells showed both bare TiO₂-NPs (Figure 2e, Figure 2g) and FITC-TiO₂-NPs (Figure 2b, Figure 2d, Figure 2f, Figure 2h) aggregates near the cell nucleus, both free in the cytoplasm (Figure 2d-h) and inside vesicles (Figure 2g). Generally speaking, the TiO₂-NPs were found to concentrate mainly in a punctuated perinuclear region in the cytoplasm in the close vicinity of the nuclear membrane. No nuclear penetration was observed neither with the modified nor the unmodified TiO₂-NPs. It is interesting to note that the vesicles which contain the nanoparticles (arrow in Figure 2g) as well as the nanoparticle aggregates free in the cytoplasm, (arrows in Figure 2b, Figure 2h) are both lodged in nuclear invaginations. These invaginations of the nuclear membrane were never found in unexposed cells. We also observed cytoplasmic vesicles with FITC-TiO₂-NPs (Figure 2d) near the cell membrane, suggesting that nanoparticles could enter the cells through endocytosis. It should be mentioned that no TiO₂-NPs were found inside the cytoplasm organelles and that neither mitochondria nor endoplasmic reticulum observed in either control or exposed cells showed

any evident signs of alterations. We did not observe any influence of the particle surface functionalization on the uptake, the localization, and the sub-cellular disorganization.

TiO₂-NPs co-localized with Golgi apparatus

Since the TEM results revealed that the different kinds of TiO₂-NPs (modified or not) were localized in a punctuated perinuclear region in the cytoplasm we checked if this perinuclear distribution pattern could also be that of the Golgi apparatus. We therefore performed co-localization studies using both these fluorescent-dye modified TiO₂-NPs and antibodies recognizing a specific protein that serves as a marker for the Golgi apparatus (Figure 3).

[Insert figure 3 about here]

PHFK cells were exposed for 24 h in the same culture medium with FITC-TiO₂-NPs (green) at a final concentration of 2 μgcm^{-2} , then fixed, and treated for immunofluorescence with Propidium Iodide (PI) and Hoechst³³³⁴². High resolution confocal images of these paraformaldehyde-fixed PHFK exposed to fluorescent-dye modified TiO₂-NPs are shown in Figures 3a-c. The specific localization of the FITC-TiO₂-NPs in the perinuclear region close to the nuclear membrane shows that the different protocol procedures do not alter the sub-cellular distribution of the TiO₂-NPs. Confocal microscopy highlighted the fact that keratinocytes internalize and concentrate the fluorescent-dye modified TiO₂-NPs. These nanoparticles co-localize with a peripheral membrane protein localized on the cytoplasmic face of the Golgi apparatus, called Golgin-97 (Figure 3d) (Griffith et al. 1997). 3D reconstructions (Figure 3e and f) allow us to define more precisely the co-localization sites between the Golgin-97 and the TRITC-TiO₂-NPs. This observation suggests that the TiO₂-NPs toxicity could result in biological responses of the cell involving Golgi apparatus functions.

TiO₂-NPs did not induce cell death in keratinocytes

In order to assess the presence, extent and mode of cell death potentially induced by the TiO₂-NPs, the cell viability was tested by a series of microscopic observations using markers such as PI, Hoechst³³³⁴², specific labeling targeted towards Annexin-V or the cleaved Caspase-3/CPP-32 (Asp175). The PI exclusion test is based on the ability of this cationic dye to enter the cells only if the cellular membrane is permeable or damaged, then indicating apoptosis or necrosis. Complete absence of PI from cells even after prolonged incubation time and in presence of increased doses of TiO₂-NPs in the cytoplasm indicated no alteration of the membrane permeability (data not shown). Hoechst³³³⁴² staining by contrast allows the precise definition of the nature and status of chromatin in living cells. No decondensation or fragmentation illustrating apoptosis was observed after exposure to TiO₂-NPs. This is in agreement with experiments performed to test the cell viability by evaluating the membrane integrity using specific apoptotic labeling markers such as Annexin-V (data not shown). In addition, immunofluorescence using antibodies targeted against the cleaved Caspase-3 revealed no metabolic activity related to apoptosis. Caspase-3 (CPP-32) is a critical executioner of apoptosis, as it is either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins. Finally and in agreement with these microscopic observations, TEM analyses did not reveal the typical compaction and marginalization of chromatin at the nuclear periphery of exposed cells, which is an important feature of the initial stages of apoptosis (Figure 2) and no structural difference was either detected for organelles such as mitochondria.

TiO₂-NPs disturbed intracellular calcium homeostasis

Aiming at providing new data on cell/TiO₂-NPs interactions, we investigated this issue using ion beam analysis (IBA). IBA is a powerful quantitative micro-analytical method for imaging

elemental distribution in biological specimens (Simon et al. 2009; Moretto et al. 1996), especially in cells (Carmona et al. 2008). Briefly, IBA is based on two methods called PIXE (Particle Induced X-Ray Emission) and RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry). PIXE, based on X-rays emission after the collision of incident protons with the constitutive atoms, provides not only the chemical composition of the sample, but also its two-dimensional elemental maps. The second method (RBS) is simultaneously carried out with PIXE to measure low-Z elements such as carbon, nitrogen, and oxygen. It is thereby possible to determine the dry mass of organic samples. This method is based on the energy measurements of backscattered protons after elastic collision with sample atom nuclei. The advantages of these two methods are: (i) a rather simple sample preparation without fixation and staining, (ii) a large observable area with the option to zoom into the region of interest (ROI), (iii) the easy quantification of concentrations at a level of sensitivity of a few parts per million. The distribution of trace elements from sodium to heavy metals is collected simultaneously with sub-cellular spatial resolution and high sensitivity. Figure 4 shows 2D elemental maps of an exposed cell population to TiO₂-NPs at a concentration of 2 µgcm⁻² using PIXE. [Insert Figure 4 about here]

Phosphorus and potassium are constitutive elements of cells and their spatial repartition helps to delimitate the cell shape (ROI) (Figure 4a). Elemental map representative of titanium shows a more specific and punctuated pattern in the vicinity of the phosphorus- and potassium-rich region (Figure 4a), exclusively in exposed cells (at the resolution of the system, in the order of 2 µm). Results consist in a two-dimensional projection of the volumetric distribution of elements in a whole cell. Using the combination of PIXE and RBS spectra, quantitative analysis can be obtained for each element, for both control and exposed cells, and revealed no difference in the composition and distribution for elements such as Na,

Mg, Cl, P, K, S (Figure 4b). In addition, no difference in the intracellular uptake for either TiO₂-NPs or FITC-TiO₂-NPs was detected. By contrast, calcium is significantly increased in exposed cells for both TiO₂-NPs and FITC-TiO₂-NPs (Figure 4c). Note that the concentration of calcium in exposed cells is strongly related to the nature of TiO₂-NPs used. No significant amount of calcium was observed in control cells ($0.31 \pm 0.02 \text{ mgg}^{-1}$), while an intracellular calcium signal could be detected in cells exposed to $2 \mu\text{gcm}^{-2}$ for both fluorescent-dye modified ($0.59 \pm 0.17 \text{ mgg}^{-1}$) and native TiO₂-NPs ($1.19 \pm 0.11 \text{ mgg}^{-1}$) (as illustrated in the quantitative data shown in Figure 4c). The highest intracellular calcium concentration is found in cells exposed to the native form of TiO₂-NPs. As no additional calcium was used in the different steps of the experimental procedure, we hypothesized that the intracellular calcium found in the exposed keratinocytes came from the defined culture medium containing low calcium concentration ($<0.1 \text{ mM}$). The molecular mechanism by which TiO₂-NPs induced intracellular calcium uptake is not yet elucidated.

TiO₂-NPs induced actin reorganization and keratinocyte differentiation

Intracellular calcium is a very important signaling molecule within cells (Clapham 2007). As it is well-established that a rise in intracellular calcium concentration is associated with actin reorganization and human keratinocytes differentiation (Pillai et al. 1990), we investigated whether these processes were altered or not in TiO₂-NPs exposed keratinocytes by looking both at the actin distribution and at the expression of involucrin (a component of the keratinocyte cross-linked envelope). Because actin reorganization is among the first responses stimulated by elevated concentrations of cytoplasmic calcium (Zamansky et al. 1991; Vasioukhin et al. 2000), we compared this actin organization in keratinocytes before and after exposure to TiO₂-NPs. Both control and exposed keratinocytes displayed stress fibers without peripheral actin reorganization when grown in the same culture conditions after 8 days of

incubation with TiO₂-NPs (Figure 5a). However, it is exclusively in the presence of FITC-TiO₂-NPs, that exposed keratinocytes reorganized their actin cytoskeleton after intracellular calcium was raised, forming regular honeycomb patterns at the periphery of the cells containing the nanoparticles (Figure 5b). [Insert figure 5 about here]

In the present study, we also used the involucrin expression to determine the status of differentiation of the different PHFK populations (exposed and controls) in culture. Involucrin, a well established marker of early keratinocyte differentiation, is expressed in the spinous and granular layers of the epidermis and forms the outer portion of the cornified envelope during the terminal stages of differentiation (Watt and Phil. 1983). As shown in Figure 5c-d, immunodetection using markers such as involucrin revealed an induced differentiation explaining the decrease cell proliferation in absence of cell death, previously described. The presence of involucrin is highlighted using specific antibody and the whole cell is stained in green. In addition, using computational methods in routine based on ImageJ software, the proportion of differentiated cells has been followed over 8 days for control sample and two types of TiO₂-NPs (Figure 5e). The level of induced differentiation is strongly related to the nature of the of TiO₂-NPs surface, the bare nanoparticles being the most efficient (this could be related to the presence of a negative charge and anionic oxygen at their surface as compared to the modified ones). Interestingly, we observed in cell population exposed to TiO₂-NPs that keratinocyte differentiation is induced earlier with a higher involucrin expression than for the control after 3 and 5 days of exposure. After 8 days, there is much less difference between cells exposed to TRITC-TiO₂-NPs and control. This could be explain by the fact that control cell populations have the highest proliferation rate and, consequently took less time to reach the confluence which in turn induced spontaneous differentiation. Nevertheless, the difference is still present between control cells and cells exposed to bare TiO₂-NPs, emphasizing the relation between the TiO₂-NPs surface and

nanotoxicity. Taken together, these data show that the TiO_2 -NPs induce nanocytotoxicity by modifying the cellular homeostasis of key ions such as calcium with marked changes in the cell fate.

Discussion

Deciphering the molecular basis of toxicology mechanism induced by nanoparticles (NPs) remains an essential challenge. The aim of this study was to investigate the toxicity of TiO₂-NPs and compare it to fluorescent dye-modified TiO₂-NPs. In this study, we have successfully designed and synthesized fluorescent dye-modified TiO₂-NPs choosing molecules commonly used in biology such as Fluorescein Isothiocyanate (FITC) and Tetra-Methyl-Rhodamine-Isothiocyanate (TRITC) to detect them, follow them and track them in vivo.

We evidence that cell exposure to TiO₂-NPs induces a clear decrease in cell proliferation which is related to the exposure dose of nanoparticles and to the surface chemistry state of these TiO₂-NPs. One possible explanation of this general dose-dependent decrease in cell proliferation would be an alteration of the cell viability, with the expression of an increased cell death. These parameters have been tested and an absence of cell death (apoptosis, necrosis) has been revealed. Absence of cell death in human cells exposed to TiO₂-NPs has been previously described by several authors (Wang et al. 2007, Koeneman et al. 2009). This result indicates that another mechanism is involved in this decrease in cell proliferation. Nevertheless, as proposed by Kang et al., TiO₂-NPs induce ROS generation in lymphocytes, thereby activating p53-mediated DNA damage checkpoint signals (Kang et al. 2007). But as we did not observe any indications of cell death such as apoptosis or necrosis even for long term and high dose exposure (up to 8 days with 20 μgcm^{-2}), this suggests that TiO₂-NPs cytotoxicity could be cell line dependent.

The difference in cytotoxicity between bare and fluorescent dye-modified TiO₂-NPs could be explained by a difference in cellular uptake linked to a different charge surface chemistry of the TiO₂-NPs. After the uptake of the initially well-dispersed fluorescent dye-modified

nanoparticles in PHFK, the aim was first to examine their specific localization in the different compartments of the cell and the relationship with cytotoxic effects. Surface modifications did not alter the internalization capabilities of the TiO₂-NPs as illustrated with the quantitative analysis that did not reveal difference in the intracellular content of bare and fluorescent dye modified TiO₂-NPs. The bio-distribution in the cell of both forms of TiO₂-NPs was not impaired. As described by Bhattacharya et al., agglomerated and single particles were found near the nucleus and surrounded by mitochondria. No TiO₂-NPs were found within the nucleus or intracellular organelles such as mitochondria (Bhattacharya et al. 2009). This demonstrates that the nanoparticle surface did not interfere with the intracellular uptake and the bio-distribution. By contrast, the cytotoxic effects of TiO₂-NPs are modulated by the difference in their surface reactivity state, where an oxy-hydroxy surface of bare TiO₂-NPs is to be compared to an organically modified one in the fluorescent particles. Indeed, as shown by IBA experiments, internalization of TiO₂-NPs in keratinocytes induces a clear increase in intracellular calcium concentration, a key cellular ion. The concentration of calcium content in exposed cells is strongly related to the nature of TiO₂-NPs used and underlines the link between TiO₂-NPs toxicity and the surface chemistry state.

Many cellular functions are directly or indirectly regulated by the free cytoplasmic calcium concentration and calcium content must be very tightly regulated in time, space and amplitude because cells manage to extract specific information from these three parameters (Clapham, 2007). In keratinocytes, an increase in the calcium intracellular concentration is known to induce cell differentiation. In that purpose, we evidence that keratinocytes exposed to TiO₂-NPs express differentiation markers such as involucrine, earlier than in control keratinocytes. It is interesting to point out that involucrin mRNA transcription is normally controlled by cytoplasmic calcium. An increase in this cytoplasmic calcium concentration does stimulate the involucrin RNA synthesis via activation of an AP-1 promoter site inducing marked

changes in the cell fate with a decrease in cell proliferation not associated to cell death but to an early keratinocyte differentiation explaining the cell proliferation decrease in absence of cell death, previously described.

A clear difference in intracellular calcium increase is observed between native and fluorescent dye-modified TiO₂-NPs, which suggest a strong relationship between the particle surface modification, the cell proliferation and the intracellular calcium content, *i.e.*, nanocytotoxicity. These data clearly demonstrated the relation between state surface of the TiO₂-NPs and nanocytotoxicity and emphasized the close relation between nanocytotoxicity and calcium homeostasis.

Our observation concerning the intracellular calcium increase is of great importance in the perspective of understanding the biological impact of nanoparticles on human keratinocytes since an excess of calcium can be linked to functional defects in cells like oxidative stress, inflammation, or cytotoxicity. In addition, intracellular calcium content heterogeneity have also been observed in different cell types (monocyte, intestinal and macrophage cell lines) exposed to different nanomaterials such as carbon nanotubes, ultrafine carbon particles or TiO₂-NPs (Bussy et al. 2008; Koeneman et al. 2009; Brown et al. 2004). An excess in the calcium signal was detected using indirect and semi-quantitative methods based on fluorescent dye imaging or X-ray fluorescence microscopy (μ XRF). One of the major interests of our methodology based on IBA is the simultaneous detection, mapping and quantification of the various chemical species at the cellular level. Moreover, the observations of clear changes in the elemental distribution of the cells exposed to TiO₂-NPs validate the sensitivity of IBA for this purpose and confirm the relevance of this technique in the field of nanotoxicology. In combination with TEM and confocal microscopy, IBA provided both functional and quantitative results on the biological effects of modified TiO₂-NPs on living cells and confirmed the existence of a common metabolic response to the presence of

nanomaterials. In addition, the TiO₂-NPs were shown to localize in the close vicinity of the nuclear membrane and partly co-localize with the Golgi apparatus. This central cellular organelle has been described as an important intracellular calcium pool regulator (Short and Barr, 2000; Missiaen et al. 2007) and it has also been shown that it could play a role in defense against external agents in keratinocyte by producing specific protein involved in innate immune system (Behne et al. 2003; Braff et al. 2005).

Thus, a potential contribution of keratinocytes to cutaneous defense is suggested through the induction of biological responses to avoid the deleterious effects of exogenous nanomaterials. And it emphasizes the importance of the calcium homeostasis alteration, as a common in vivo metabolic response in the presence of nanomaterials.

Acknowledgements

The authors acknowledge P. Legros and C. Poujol, from PICIN, for their helpful and friendly assistance in fluorescence microscopy techniques. Authors wish to acknowledge E. Gontier at the Pôle Microscopie Electronique/Bordeaux 2, for his assistance in TEM techniques. We also wish to thank the technical staff members of the AIFIRA facility. The AIFIRA facility and the technical development of the microbeam line have been financially supported by the Région Aquitaine. Special thanks to R. Ortega, A. Carmona and G. Devès (CNAB) for their technical support, assistance and scientific discussion. This work and M.S. were supported by Institut de Recherche Pierre Fabre (Vigoulet-Auzil, Castanet-Tolosan).

References

- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E 2009. Part Fibre Toxicol. 21: 6-17.
- Behne MJ, Tu CL, Aronchik I, Epstein E, Bench G, Bikle DD, Pozzan T, Mauro TM 2003. J Invest Dermatol 121: 688-694.
- Biopixe Website 2004. Available from: <http://biopixe.free.fr/SupaVISIO/news.htm>
- Buzea C, Blandino Pacheco II, Robbie K 2007. BioInterphases 2:MR17-MR172.
- Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL 2005. J Invest Dermatol 125:9-13.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V 2004. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286:344–354.
- Bussy C, Cambedouzou J, Lanone S, Leccia E, Heresanu V, Pinault M, Mayne-L'hermite M, Brun N, Mory C, Cotte M, Doucet J, Boczkowski J, Launois P 2008. Nano Lett 8:2659-2663.
- Carmona A, Devès G, Ortega R 2008. Anal Bioanal Chem 390:1585–1594
- Clapham DE 2007. Cell 131:1047-1058. De Jong WH, Borm PJ 2008. Int J Nanomed 3:133-149.
- Donaldson K, Seaton A 2007. J Nanosc and Nanotech 7:4607-4611.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W 2001. Occup Environ Med 58:211-216.
- Federici G, Shaw BJ, Handy RD 2007. Aquat Toxicol 84:415-430.

Freitas RA 2005. Nanomedicine 1:2-9.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P 2005. Environ Health Perspect 113:1555-1560.

Griffith KJ, Chan EK, Lung CC, Hamel JC, Guo X, Miyachi K, Fritzler MJ 1997. Arthritis Rheum 40:1693-1702.

Hilt JZ, Peppas NA 2005. Int J Pharm 306:5-23.

International Agency for Cancer Research (IARC) 2006. 93:1-4

Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW 2008. Environ Mol Mutagen 49(5):399-405.

Kiss B, Bíró T, Czifra G, Tóth BI, Kertész Z, Szikszai Z, Kiss AZ, Juhász I, Zouboulis CC, Hunyadi J 2008. Exp Dermatol 17:659-667.

Koeneman BA, Zhang Y, Westerhoff P, Chen Y, Crittenden JC, Capco DG 2009. Cell Biol Toxicol DOI 10.1007/s10565-009-9132-z

Kumar MN, Bakowsky U, Lehr C-M 2004. Nanobiotechnology: Concepts, applications and perspectives; Niemeyer CM, Mirkin CA Series Eds. Wiley-VCH, Chapter 1, pp 319-342.

Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, Dukhande VV, Bhushan A, Daniels CK, Leung S W 2008. Int J Nanomed 3:533-545.

Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Li MV, Liga D, Alvarez PJ 2008. J Water Research 42:4591-4602.

Li SQ, Zhu RR, Zhu H, Xue M, Sun XY, Yao SD, Wang SL 2008. Food Chem Toxicol 46:3626-3631.

Linkov I, Steevens J, Adlakha-Hutcheon G, Bennett E, Chappell M, Colvin V, Davis J M, Davis T, Elder A, Foss Hansen S, et al 2009. *J Nanopart Res* 11:513-527.

Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B 2007. *Environ Health Perspect* 115:1631-1637.

Maxwell JA, Campbell JL, Teedsdale WJ 1989. *Nucl Instrum Meth B* 43:218.

Missiaen L, Dode L, Vanoevelen J, Raeymaekers L, Wuytack F 2007. *Cell Calcium* 41: 405-416.

Moeller R, Fritzsche W 2006. *Annual Review of Nano Research: Biosensors based on gold nanoparticles labeling* [Online]; Cao G, Brinkers GJ, Series Eds. chapter 1, pp 429-466.

Moretto P 1996. *Cell Mol Biol* 4: 1-16.

Murr LE 2006. *JOM* 58:23-33.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J 2005. *Environ Health Perspect* 113:823-839.

Nohynek GJ, Dufour EK, Roberts MS 2008. *Skin Pharmacol Physiol* 21:136-149.

Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K 2008. *Toxicol Lett* 180:222-229.

Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M 1990. *J Cell Physiol* 143:294-302.

Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, Wood D, Sung KL 1999. *J Biomed Mater Res* 46:399-407.

Osano E, Kishi J, Takahashi Y 2003. *Toxicol In Vitro* 17:41-47.

Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, Jonas L, Weiss DG, Schiffmann D 2002. *Environ Health Perspect* 110:797-800.

Rai M, Yadav A, Gade A 2009. *Biotech Adv* 27:76-83.

Sahu KK, Alex TC, Mishra D, Agrawal A 2006. Waste Manage Res 24:74–79.

Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL 2006. Toxicol Sci 92:174-185.

Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B 2006. Adv Colloid Interf Sci 123-126, 471-485.

Short B, Barr FA 2000. Curr Biol 10: R583-R585. Silva GA 2008. BMC Neurosci 9 Suppl3: S4.

Simon M, Barberet P, Moretto P, Bacqueville D, Mavon A, Seznec H 2009. X-Ray Spectrom 38:132–137.

Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y, 2008. Adv Drug Deliv Rev 60:1278-1288.

Sounderya N, Zhang Y 2008. Recent Patents on Biomedical Engineering 1:34-42.

Stevens MM, George JH 2005. Science 310:1135-1138.

Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH 2009. Prog. Neurobiol 87:133-170.

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E 2000. Cell 100:209-219.

Vevers WF, Jha AN 2008. Ecotoxicology 1:410-420.

Wang F, Tan WB, Zhang Y, Fan X, Wang M 2006. Nanotechnology 17:R1-R13.

Brayner R 2008. Nano Today 3:18-55.

Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H 2007. Mutat Res 628:99-106.

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL 2006. Toxicol Sci 91:227-236

Watt FM, Phil D 1983. J Invest Dermatol 81:100s-103s.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE 2006. Nano Lett 6:1794-1807.

Zamansky GB, Nguyen U, Chou I-N 1991. J Invest Dermatol 97:985-994.

Figure 1

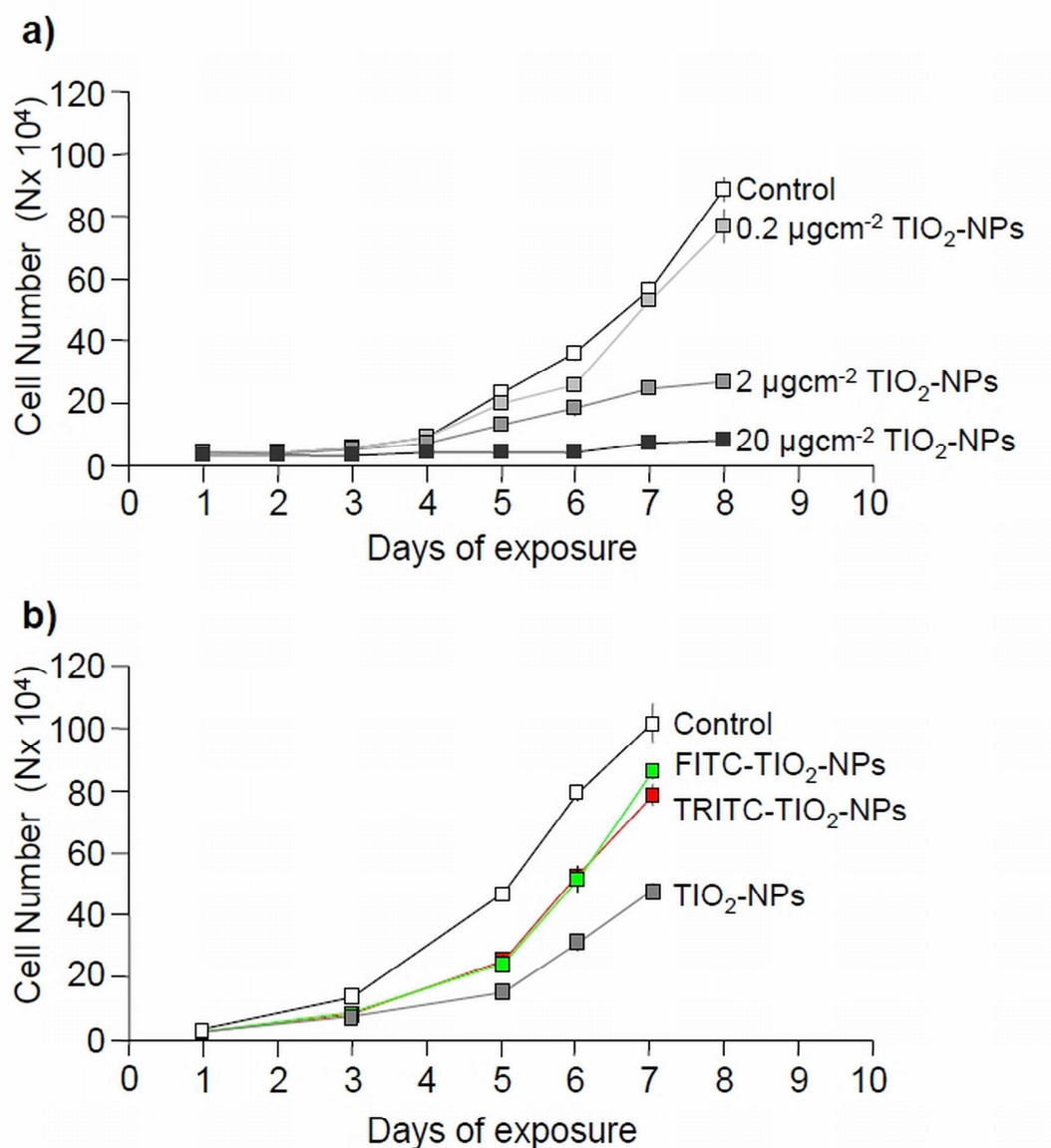


Figure 1. Representative growth curve for PHFK cells. (a) in normal culture medium (control) or with 0.2, 2 and 20 µgcm⁻² of native TiO₂-NPs. (b) in normal culture medium (control) or with 2 µgcm⁻² of native TiO₂-NPs or fluorescent-dye modified TiO₂-NPs (FITC-TiO₂-NPs and TRITC-TiO₂-NPs, respectively). The error bars in (a) and (b) represent mean values +/- standard deviation of 3 independent experiments.

Figure 2

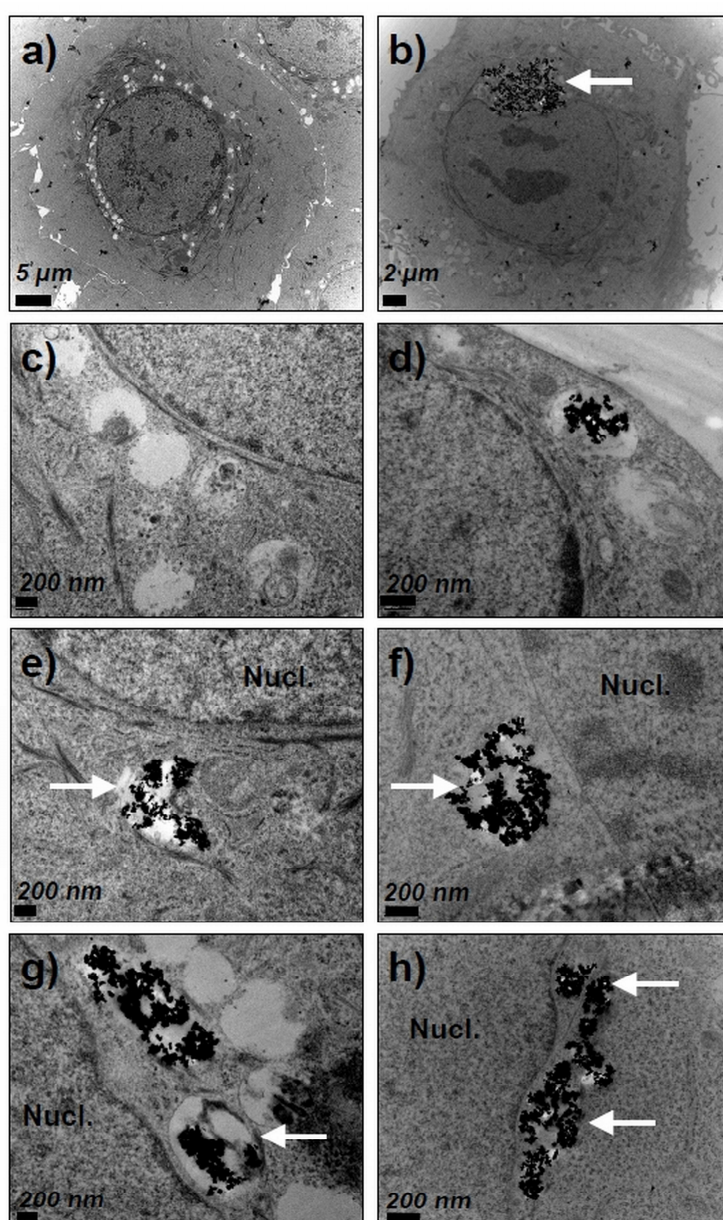


Figure 2. TEM images of ultra-thin sections of PHFK cells. (a) Untreated PHFK cell. (b) PHFK cell treated with 2 μgcm^{-2} FITC-TiO₂-NPs. Nanoparticle aggregates located in the perinuclear region in the close vicinity of the nuclear membrane are clearly seen (white arrow). (c) Details of the perinuclear region of an untreated PHFK cell. (d) Details of the perinuclear region of a PHFK cell exposed to FITC-TiO₂-NPs. (e) PHFK cells treated with 2 μgcm^{-2} of TiO₂-NPs, showing unsequestered nanoparticles free in the cytoplasm. (f, h) Details

of the perinuclear region of a PHFK cell exposed to FITC-TiO₂-NPs, showing both unsequestered nanoparticles free in the cytoplasm as well as the deformation of the nuclear volume. (g) PHFK cells treated with TiO₂-NPs for 24 h magnifying the deformation of the nuclear volume already observed in (b), and showing TiO₂-NPs inside a vesicle (white arrow).

Figure 3

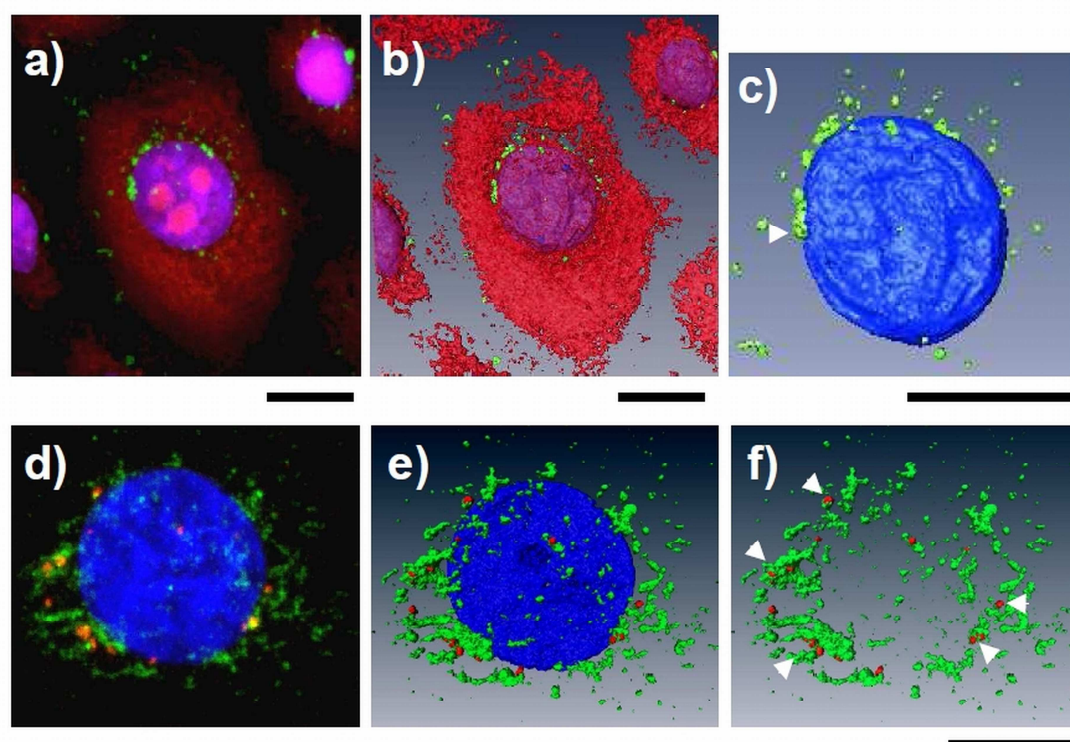


Figure 3. High resolution confocal images and 3D-reconstructed images using the Amira software of paraformaldehyde-fixed PHFK cells exposed to fluorescent-dye modified TiO₂-NPs. (a, b, c) PHFK cells were treated for 24 h with FITC-TiO₂-NPs (green) at a final concentration of 2 μgcm^{-2} and were fixed, treated for immunofluorescence with PI (cytoplasm and nucleolus, red) and Hoechst³³³⁴² (nucleus, blue). (a) FITC-TiO₂-NPs (green) are specifically localized in the perinuclear region in the close vicinity of the nucleus. (b, c) Detail of the 3D-reconstructed image. Deformations of the nuclear volume are indicated by the white arrow. (d, e, f) PHFK cells stained with Hoechst³³³⁴² (nucleus, blue) and exposed to 2 μgcm^{-2} TRITC-TiO₂-NPs (red) for 24 h were then fixed and stained with antibody targeted against the anti-Human Golgin-97 (green). (f) Co-localization between TRITC-TiO₂-NPs (red) and Golgi apparatus (green) is indicated with white arrows. *Bar:* 10 μm .

Figure 4

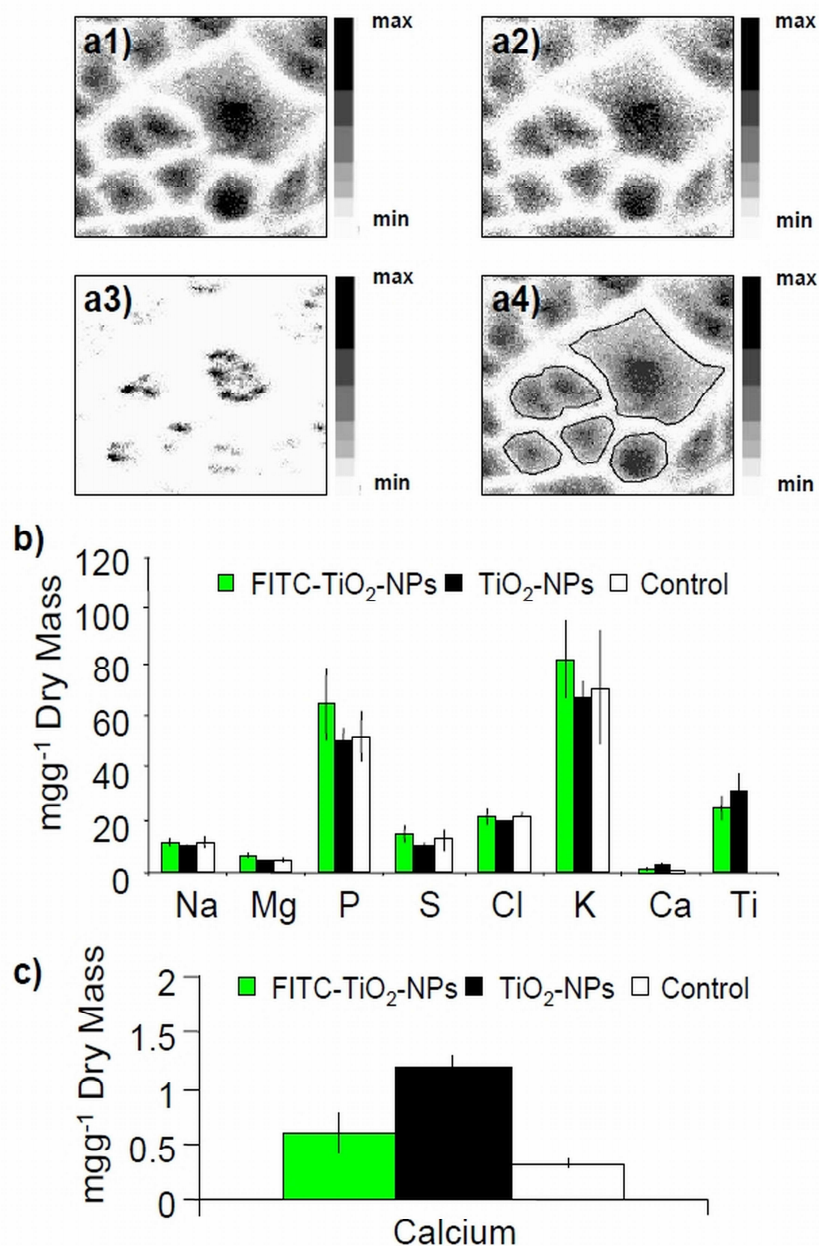


Figure 4. PHFK elemental composition and distribution maps determined by ion beam analysis after exposure to $2 \mu\text{gcm}^{-2}$ TiO₂-NPs. Phosphorus (a1), potassium (a2) and titanium (a3) maps obtained by PIXE analysis (image size: $83 \times 83 \mu\text{m}^2$). The region of interest (ROI) selected for mapping and quantification are delineated by black line (a4). The gray scale increases from low to high concentrations from white to black. (b) Quantitative analysis of the elemental composition (from Na to Ti). (c) Quantitative representation of the intracellular

calcium content. Difference was observed between cells exposed 24 h to 2 μgcm^{-2} of FITC-TiO₂-NPs or bare TiO₂-NPs and control. (*, $p < 0.05$, Student Test)

Figure 5

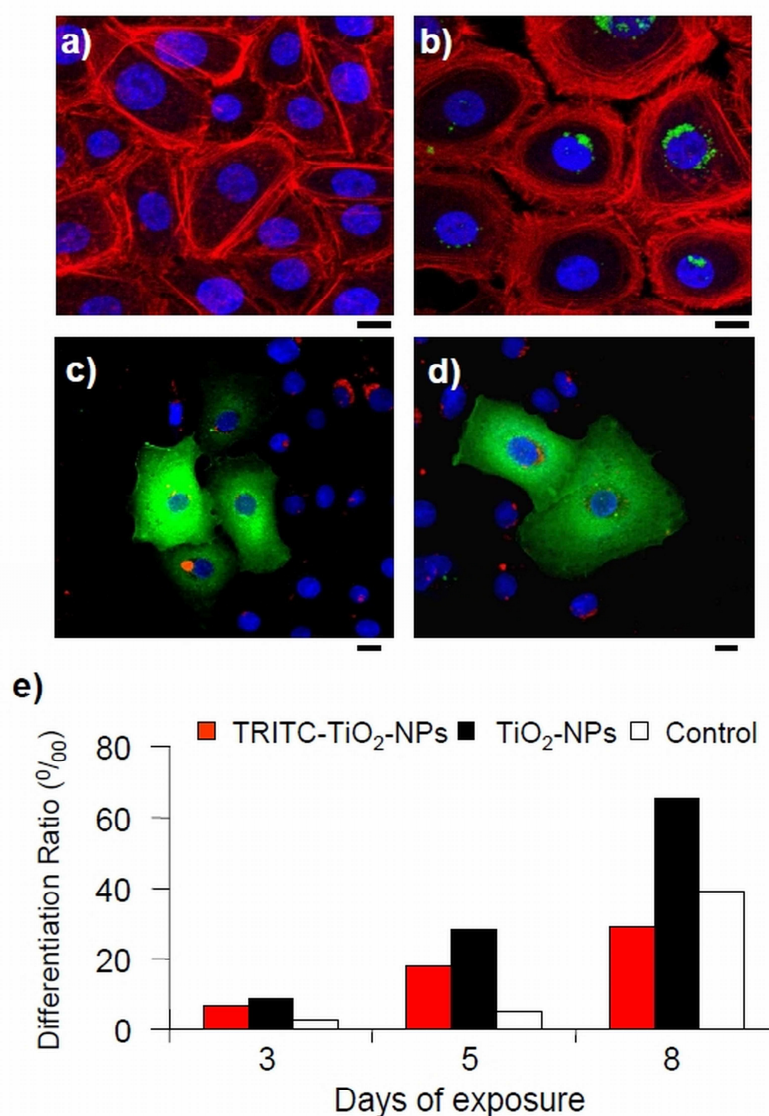


Figure 5. Actin reorganization and keratinocyte differentiation. (i) PHFK in (a) normal culture medium (control) or (b) exposed 8 days with 2 μgcm^{-2} FITC-TiO₂-NPs. Keratinocytes were stained for actin using labeled phalloidin (red, details in Experimental section). (a) Control cells displayed stress fibers without peripheral actin reorganization when grown in normal medium (low-calcium). (b) Actin in exposed keratinocytes formed regular honeycomb patterns at the internal periphery of each cell, suggesting an increase of the intracellular calcium concentration. The specific intracellular distribution of FITC-TiO₂-NPs is easily detected (green dots). (ii) PHFK in normal culture medium exposed for 8 days with 2 μgcm^{-2}

of TRITC-TiO₂-NPs (red dots). Involucrin expression in these cases is used to determine the status of differentiation of the different keratinocyte populations. (c, d) Confocal images of differentiated keratinocyte positive for involucrin immunodetection. The differentiated keratinocyte expressing involucrin are stained in green. (e) Using computational methods in routine based on ImageJ software, the number of positive cells for involucrin expression (green) was determined after 3, 5 and 8 days of exposure with TRITC-TiO₂-NPs or native TiO₂-NPs. *Bar*, 10 µm.

CONCLUSION-DISCUSSION

La définition des mécanismes intrinsèques impliqués dans la fonction barrière cutanée restent encore mal définis à l'heure actuelle. Les dysfonctions de cette fonction barrière peuvent conduire à des pathologies souvent incurables dont les conséquences et les mécanismes physiopathologiques restent à démontrer.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai participé au **développement et à la validation d'un modèle de peau *ex vivo* afin d'étudier et de définir le rôle de certains paramètres dans l'homéostasie de la fonction barrière.**

En collaboration avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre, j'ai ainsi participé à la caractérisation d'un modèle de peau d'oreille de porc maintenu en survie. Différentes conditions expérimentales ont été testées afin d'établir leur impact et les conséquences induites sur les compositions chimiques élémentaires d'un explant de peau d'oreille de porc maintenu en survie. Dans ce contexte, j'ai appliqué des techniques d'analyse par faisceaux d'ions. Cet **outil d'analyse autorise l'étude d'un tissu dans son intégralité, le suivi de molécules d'intérêts au sein de ces mêmes tissus afin d'obtenir des données qualitatives et quantitatives sur les aspects structuraux et fonctionnels du tissu considéré.**

J'ai réalisé des cartographies des distributions 2D et obtenu des **données quantitatives sur la composition chimique élémentaire d'un tissu biologique d'intérêt.** Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai mis en œuvre des protocoles de préparation d'échantillons spécifiques combinant des techniques de culture cellulaire, de dermo-cosmétique, de biologie cellulaire, de physique et de chimie.

1. En collaboration avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre, j'ai étudié deux aspects : **(i) l'homéostasie ionique dans des conditions définies (temps, milieu de culture), (ii) puis à partir de ces conditions expérimentales, des méthodes d'altération de la fonction barrière ont été appliquées afin de définir précisément l'impact de ces différents stress sur l'homéostasie ionique de l'épiderme.** Ainsi, j'ai pu précisément définir par comparaison l'effet d'une exposition au Sodium Dodécyl Sulfate et aux ultraviolets sur la distribution ionique de la peau d'oreille de porc maintenue en survie.

Ces trois années d'études m'ont permis de préciser et de souligner l'intérêt de ce modèle pour l'étude de la fonction barrière cutanée mais aussi pour de futures applications en recherche dermo-cosmétique. Mes travaux m'ont également permis de préciser le mode de pénétration transcutanée du SDS en fonction de la topologie tissulaire. Cette pénétration transcutanée de SDS s'accompagne de modifications précises et spécifiques de l'homéostasie ionique

(distribution, quantification). Cette étude permet également de souligner une voie préférentielle de pénétration transcutanée (follicule pileux).

Définir le comportement d'explants de peau maintenus en survie suite à une exposition aux rayonnements ultraviolets est aussi un point essentiel. Dans ce sens, un protocole d'exposition aux rayonnements ultraviolets a été défini et comme pour le traitement SDS, nous nous sommes attachés à définir les réponses histologiques et biochimiques induites dans les explants de peau d'oreille de porc. Mes données montrent que 24 heures après exposition à des doses significatives de rayonnements ultraviolets, les explants de peau d'oreille de porc présentent des dommages spécifiques et localisés à la couche basale (ADN endommagé) et que des voies d'activation spécifique sont induites comme l'apoptose. De plus, l'homéostasie ionique est significativement altérée dans les couches vivantes des peaux irradiées après 24 heures d'exposition. Il serait donc intéressant de suivre le comportement de ces explants à des temps de réponses plus longs. Il semble également que l'épaisseur, la présence ou non de couche cornée ne protègent pas contre les effets délétères des rayonnements ultraviolets.

En parallèle, nos techniques d'analyses ont été appliquées à **l'étude de la pénétration transcutanée de composés dermo-cosmétiques, tel que les oxydes d'aluminium**. Cette étude réalisée à partir d'expérience de diffusion passive appliquée à des peaux d'oreille de porc a été réalisée en collaboration avec l'Institut de Recherche Pierre Fabre. Ainsi, différentes formulations cosmétiques contenant des oxydes d'aluminium ont été appliquées et testées. Mes résultats ont permis notamment de définir quantitativement la répartition et la distribution des différentes formulations d'oxydes d'aluminium sur et dans les peaux. Notre analyse par microfaisceau d'ions n'a pas révélé la présence d'aluminium dans les différentes couches « vivantes » des peaux de porc exposées.

Il est important de souligner que cette étude a permis de montrer le rôle de l'épaisseur de la couche cornée dans l'effet protecteur lors d'une exposition à un agent chimique tel que le SDS. Nos données soulignent aussi l'importance de la pénétration de cet agent chimique par la voie transannexielle. Ces données suggèrent donc que ces deux paramètres doivent être pris en compte dans le cadre d'études concernant la pénétration transcutanée d'agents exogènes. En particulier, il serait intéressant de poursuivre l'étude de la pénétration transcutanée des oxydes d'aluminium et de se focaliser sur les régions cutanées situées à proximité d'un follicule pileux. Ce type d'études pourrait également être appliqué à la pénétration

transcutanée d'oxydes de titane contenus dans les produits dermo-cosmétiques, car des incertitudes demeurent quant à la capacité des NPs de titane à pénétrer des peaux dont la fonction barrière est altérée consécutivement à des pathologies ou à des pratiques hygiéniques quotidiennes (rasage, épilation).

Dans les perspectives de ce travail, étant donné que les explants de peau maintenus en survie répondent aux différentes expositions et permettent de définir des profils de réponse spécifiques, il serait intéressant d'étudier leurs effets sur des temps de réponse plus longs, et déterminer les cinétiques et dynamiques de ces réponses. Il serait en effet intéressant de déterminer si ce type de modèle de culture *ex vivo* a la capacité de restaurer son état physiologique initial (distribution et composition chimique élémentaire). Ceci est d'autant plus important que cela peut dépendre des conditions de culture et plus particulièrement de la biodisponibilité des éléments chimiques impliqués (Ca, S, K...). Ces études sont en cours de développement à l'IRPF par D. Bacqueville.

Dans la continuité des études en relation avec la pénétration transcutanée d'**agents exogènes de type particuliers ou nanoparticulaires**, je me suis attachée à développer et à valider une approche expérimentale afin de réaliser la détection et le suivi de nanoparticules à l'échelle cellulaire et tissulaire. Ces études ont pour but de définir notamment la toxicité de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂). Ces nanoparticules, utilisées comme filtre physique anti-UV dans les crèmes solaires, sont en effet des candidats potentiels au franchissement de la barrière cutanée et suspectés de jouer un rôle délétère dans la genèse et le développement de pathologies cutanées graves comme le cancer.

Ainsi, afin de définir la **nanotoxicité *in vitro* des nanoparticules de TiO₂**, j'ai mis en œuvre une **méthodologie expérimentale combinant différentes techniques d'imageries en association avec des techniques de fonctionnalisation chimique des nanoparticules** que j'ai appliquée à l'étude de cultures cellulaires de kératinocytes primaires humains. L'internalisation des nanoparticules de TiO₂ par les kératinocytes entraîne une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire associée à une diminution de la prolifération cellulaire (en absence de mort cellulaire). L'internalisation des nanoparticules de TiO₂ induit également une différenciation précoce des kératinocytes. L'état de fonctionnalisation des nanoparticules définit également le niveau de toxicité.

Ces études *in vitro* soulignent l'intérêt des techniques d'analyse par microfaisceau d'ion combinée aux techniques d'imagerie par microscopies confocale et électronique afin de

définir les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les voies de nanotoxicité. Ainsi, j'ai montré l'implication du calcium dans la réponse à une exposition à des NPs de titane. L'implication de cet ion a déjà été démontrée dans d'autres types d'exposition à d'autres types de NPs (Bussy, 2008 ; Koeneman, 2008 ; Brown, 2004) et suggère donc un mécanisme de nanotoxicité commun.

Ces observations sont d'autant plus intéressantes qu'elles montrent la toxicité potentielle des NPs de TiO₂. De plus, si l'on considère que la voie transannexielle est un point d'accès au niveau de la pénétration transcutanée, il n'est pas exclu dans certaines conditions (pratiques hygiéniques) que les NPs de titane puissent entrer en contact avec les cellules vivantes présentes à la base du follicule pileux. Ces cellules présentent une activité de régénération, de prolifération et de différenciation importantes souvent sous le contrôle de seconds messagers intracellulaires tels que le calcium.

Il serait aujourd'hui intéressant d'utiliser la méthodologie développée et validée à l'échelle cellulaire pour détecter, suivre et quantifier des NPs de titane appliquées sur des explants de peau d'oreille de porc maintenue en survie. Ces études *ex vivo*, permettraient de répondre à la question de la pénétration des NPs de titane dans la peau (voie transannexielle, irritations, UV...).

Tout au long de ce travail, j'ai utilisé le microfaisceau d'ions du CENBG dont la sensibilité et les résolutions sont compatibles avec les études à l'échelle biologique, cependant, elles restent limitées à des échelles submicroniques.

Les mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité de la couche cornée et de la fonction barrière sont suspectés de se jouer majoritairement dans la couche granuleuse. L'analyse par microfaisceau ne nous permet que difficilement de distinguer cette strate de l'épiderme qui ne comporte que quelques assises cellulaires.

Vers des études à l'échelle nanométrique

Il apparaît donc essentiel d'améliorer et d'optimiser les résolutions et sensibilités de ces techniques afin de définir plus précisément les interactions au niveau des organelles, des structures cellulaires... C'est la raison pour laquelle, au CENBG, un nouvel outil est en cours de développement et de validation : la nanosonde ou nanofaisceau.

Les avancées technologiques réalisées au laboratoire avec la mise en œuvre de cette ligne nanofaisceau permettront de mener des investigations plus précises avec des résolutions pouvant atteindre la centaine de nanomètres.



Figure 30 : **La ligne nanofaisceau du CENBG et la chambre d'analyse.** A gauche, nouvelle ligne nanofaisceau. A droite, ligne microfaisceau actuelle.

L'application de cette technique à l'étude de la nanotoxicologie se révélera elle aussi très enrichissante en apportant des informations sur les localisations ioniques intracellulaires beaucoup plus fines qui permettront de définir plus précisément les localisations intracellulaires des ions et des espèces chimiques étudiées.

Une première cellule (kératinocyte primaire humain) a été analysée en microscopie à transmission (STIM) à l'aide de la ligne nanofaisceau comme le montre la figure 31. Il est possible de distinguer le noyau et le cytoplasme avec une résolution de l'ordre de 200 nm.

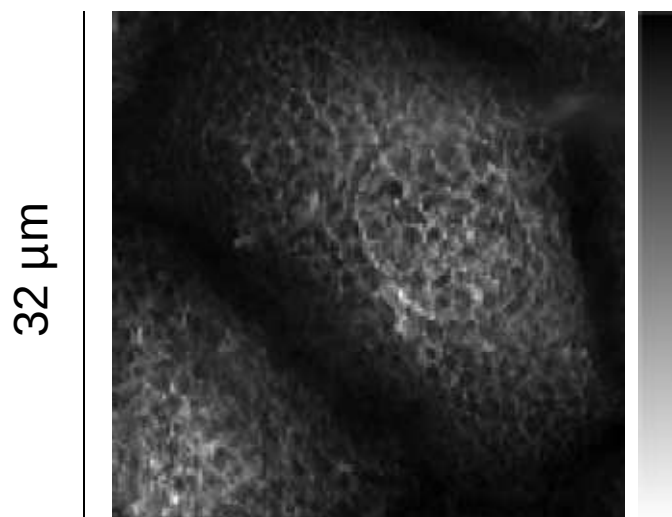


Figure 31 : Première image de kératinocytes humains par analyse STIM sous nanofaisceau. Kératinocyte primaire (PHFK) cryofixé et lyophilisé, puis analysé sous vide par nanofaisceau. Résolution 150nm en x, 250nm en y.

Cependant, la résolution obtenue avec ce nouveau dispositif soulève peut être des artefacts de préparation d'échantillons. De plus, il sera nécessaire de valider cet outil pour des analyses en routine : les temps d'analyse seront sans doute plus longs que sur la ligne micro-faisceau, du fait du faible courant que l'on obtiendra sur cible.

Il reste donc encore à redéfinir les conditions expérimentales aussi bien en ce qui concerne la préparation des échantillons (méthodes de cryofixation), que les conditions d'analyse sous nanofaisceau.

Au cours de ma thèse, les études de nanotoxicité vis-à-vis d'agents exogènes comme les nanoparticules de TiO_2 ou les oxydes d'aluminium que j'ai réalisées concernaient leurs effets vis-à-vis de la santé humaine. Cependant, aujourd'hui se pose aussi la question du devenir de ces composés dans l'environnement. En effet, il était déjà connu que les crèmes solaires, notamment les filtres chimiques anti-UV qu'elles contiennent, représentent une menace pour l'environnement du fait de leur potentiel endocrinien en contribuant entre autres, à la féminisation des espèces de poissons. Une équipe de chercheurs italiens a récemment révélé un autre phénomène : les crèmes solaires pourraient accélérer le blanchiment des coraux (Danovaro, 2008). Il est donc nécessaire d'étudier et de comprendre l'effet de ces nanoparticules sur l'environnement. En ce sens, une approche environnementale de l'effet de ces

nanoparticules à l'aide d'un organisme multicellulaire tel que *C. elegans*, s'avère très intéressante.

Vers des études à l'échelle d'un organisme multicellulaire : C. elegans

C. elegans est un modèle animal reconnu et admis pour réaliser des études de toxicologie *in vivo*. *C. elegans* est sensible à un certain nombre d'agents comme les métaux lourds, les toxines inorganiques, et un très grand nombre de molécules neuroactives chez l'homme. Ces molécules peuvent être assimilées par 3 voies : (i) ingestion, (ii) voie transcutanée, (iii) voie neuronale au travers des terminaisons synaptiques neurosensitives.

Dans le contexte des études concernant **l'effet des expositions environnementales à des métaux ou nanoparticules**, l'utilisation de *C. elegans* se justifie parfaitement. Classiquement, les nématodes sont les plus abondants représentants des métazoaires dans le sol et leurs fonctions sont primordiales dans la gestion des ressources en nourriture des sols. Les nématodes interagissent étroitement avec les autres organismes et leurs activités affectent la production primaire, la décomposition, les flux énergétiques et le recyclage des nutriments. Au sein des écosystèmes naturels, il a été largement montré que l'analyse de l'abondance des nématodes et de leurs structures communautaires sont des indicateurs très sensibles de la présence de stress induits par des polluants ou de la désorganisation des écosystèmes.

Plusieurs tests de toxicité basés sur *C. elegans* ont été développés afin d'estimer les risques écologiques au niveau des sols et de l'eau. A ce jour, cependant peu de tests basés sur *C. elegans* ont été réalisés en ce qui concerne les recherches en nanoécotoxicologie. Récemment des études ont démontré l'effet toxique et délétère des nanoparticules sur la santé de *C. elegans* avec notamment des altérations de leur capacité reproductive (Pluskota, 2009; Roh, 2008). Les mécanismes d'action restent cependant encore à élucider.

Outre le fait que cet organisme se retrouve dans la nature, il présente anatomiquement les différents organes susceptibles d'être exposés et ciblés par les expositions et les différents modes d'expositions retrouvées chez l'homme se retrouvent chez *C. elegans*. De plus, les effets peuvent être étudiés sur l'adulte, l'embryon et au cours des générations successives.

C. elegans possède en outre une spécificité importante : son corps est transparent. Il serait donc intéressant d'exposer les *C. elegans* aux NPs de TiO₂ fonctionnalisées avec un fluorophore (nanoparticules réalisées durant mon travail de thèse) et de les suivre à l'intérieur de ce ver. Il serait alors possible dans un premier temps de définir des localisations spécifiques des nanoparticules dans cet organisme multicellulaire. Enfin, les différentes

méthodes d'analyses en microscopie confocale, électronique et ionique peuvent être aisément appliquées à ce modèle et permettraient de réaliser des analyses complémentaires et de définir plus précisément les mécanismes de nanotoxicité.

De plus les données que l'on pourrait obtenir sur un organisme multicellulaire comme *C. elegans* pourraient faire avancer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les réponses de nanotoxicité, et être transposées à l'homme.

En conclusion, au cours de ce travail de thèse j'ai pu montrer l'intérêt des techniques d'analyse par faisceau d'ions en recherche interdisciplinaire.

Ces techniques restent cependant longues, exigeantes à mettre en œuvre et nécessitent un temps d'analyse et de traitement des données à ne pas négliger. Néanmoins les informations obtenues sont précieuses et apportent des données difficilement accessibles avec d'autres méthodes d'analyse. En biologie, elle s'avère très complémentaire à des techniques de microscopie plus classiquement utilisées (microscopie optique, confocale, électronique...) ce qui permet d'obtenir une vue d'ensemble des différents processus impliqués dans la physiologie cellulaire et tissulaire.

Ainsi il est possible d'obtenir des données structurales (microscopie électronique), dynamiques (microscopie confocale) et ioniques (analyse par faisceau d'ions).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anane, R., Bonini, M., Grafeille, J. M., Creppy, E. E. (1995) Bioaccumulation of water soluble aluminium chloride in the hippocampus after transdermal uptake in mice. *Arch.Toxicol.* 69, 568-571
- Auclair, F., Besnard, M., Dupont, C., Wepierre, J. (1991) Importance of blood flow to the local distribution of drugs after percutaneous absorption in the bipedicated dorsal flap of the hairless rat. *Skin Pharmacol.* 4, 1-8
- Bachelez, H., Basset, SN., Crickx, B. (2005) Les grandes fonctions de la peau. *Ann Dermatol Venerol.* 132, 8S49-68
- Barbero, A. M., Frasc, H. F. (2009) Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol.In Vitro* 23, 1-13
- Bartek, M. J., LaBudde, J. A., Maibach, H. I. (1972) Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J.Invest Dermatol.* 58, 114-123
- Behne, M. J., Tu, C. L., Aronchik, I., Epstein, E., Bench, G., Bikle, D. D., Pozzan, T., Mauro, T. M. (2003) Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca²⁺ stores. *J.Invest Dermatol.* 121, 688-694
- Bieber, T. (2008) Atopic dermatitis. *N.Engl.J.Med.* 358, 1483-1494
- Blank, I. H., Griesemer, R. D., Gould, E. (1957) The penetration of an anticholinesterase agent (sarin) into skin. I. Rate of penetration into excised human skin. *J.Invest Dermatol.* 29, 299-309
- Boudry, I., Trescos, Y., Vallet, V., Cruz, C., Lallement, G. (2008) [Methods and models for percutaneous absorption studies of organophosphates]. *Pathol.Biol.(Paris)* 56, 292-299
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E., Weerheim, A. M., Ijzerman, A. P., Ponc, M. (1998) Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J.Lipid Res.* 39, 186-196
- Brown, D. M., Donaldson, K., Borm, P. J., Schins, R. P., Dehnhardt, M., Gilmour, P., Jimenez, L. A., Stone, V. (2004) Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 286, L344-L353
- Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., Congdon, E. R. (1982) Methods for in vitro percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 62, 481-488
- Buchau, A. S., Gallo, R. L. (2007) Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin.Dermatol.* 25, 616-624
- Bussy, C., Cambedouzou, J., Lanone, S., Leccia, E., Heresanu, V., Pinault, M., Mayne-L'hermite, M., Brun, N., Mory, C., Cotte, M., Doucet, J., Boczkowski, J., Launois, P. (2008) Carbon nanotubes in macrophages: imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy. *Nano.Lett.* 8, 2659-2663
- Campbell J.L., Hopman T.L., Maxwell J.A. & Nejedly Z. (2000). The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* 170(1-2): 193-204.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, 328-340
- Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., Andre, M., Casteilla, L., Penicaud L (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Let.t* 579:3487-3492.

- Chapman, S. J., Walsh, A., Jackson, S. M., Friedmann, P. S. (1991) Lipids, proteins and corneocyte adhesion. *Arch.Dermatol.Res.* 283, 167-173
- Chilcott, R. P., Dalton, C. H., Hill, I., Davidson, C. M., Blohm, K. L., Hamilton, M. G. (2003) Clinical manifestations of VX poisoning following percutaneous exposure in the domestic white pig. *Hum.Exp.Toxicol.* 22, 255-261
- Chilcott, R. P., Dalton, C. H., Hill, I., Davison, C. M., Blohm, K. L., Clarkson, E. D., Hamilton, M. G. (2005) Evaluation of a barrier cream against the chemical warfare agent VX using the domestic white pig. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 97, 35-38
- Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058
- Coulomb, B., Lebreton, C., Dubertret, L. (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J.Invest Dermatol.* 92, 122-125
- Coulombe, P. A. (1993) The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5, 17-29
- Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S., Wirtz, D. (2000) The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol.* 10, 420-428
- Craig, F. N., Cummings, E. G., Sim, V. M. (1977) Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX. *J.Invest Dermatol.* 68, 357-361
- Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L., Pusceddu, A. (2008) Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ.Health Perspect.* 116, 441-447
- Darbre, P. D. (2005) Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J.Inorg.Biochem.* 99, 1912-1919
- Denda, M., Katagiri, C., Hirao, T., Maruyama, N., Takahashi, M. (1999) Some magnesium salts and a mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery. *Arch.Dermatol.Res.* 291, 560-563
- Dick, I. P., Scott, R. C. (1992) Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J.Pharm.Pharmacol.* 44, 640-645
- Duncan, E. J., Brown, A., Lundy, P., Sawyer, T. W., Hamilton, M., Hill, I., Conley, J. D. (2002) Site-specific percutaneous absorption of methyl salicylate and VX in domestic swine. *J.Appl.Toxicol.* 22, 141-148
- Dymnikov, A.D., Fishkova, T. Ya., Yavor S. Ya. (1965) *Sov. Phys. –Tech. Phys.* 10, 340.
- Eckert, R., Tillotson, D. L., Brehm, P. (1981) Calcium-mediated control of Ca and K currents. *Fed.Proc.* 40, 2226-2232
- Elias, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J.Invest Dermatol.* 80 Suppl, 44s-49s
- Elias, P. M., Williams, M. L., Maloney, M. E., Bonifas, J. A., Brown, B. E., Grayson, S., Epstein, E. H., Jr. (1984) Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J.Clin.Invest* 74, 1414-1421
- Elias, P. M., Menon, G. K., Grayson, S., Brown, B. E. (1988) Membrane structural alterations in murine stratum corneum: relationship to the localization of polar lipids and phospholipases. *J.Invest Dermatol.* 91, 3-10

- Elias, P. M., Menon, G. K. (1991) Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv.Lipid Res.* 24, 1-26
- Exley, C. (2004) Aluminum in antiperspirants: more than just skin deep. *Am.J.Med.* 117, 969-970
- Falchi, M., Bataille, V., Hayward, N. K., Duffy, D. L., Bishop, J. A., Pastinen, T., Cervino, A., Zhao, Z. Z., Deloukas, P., Soranzo, N., Elder, D. E., Barrett, J. H., Martin, N. G., Bishop, D. T., Montgomery, G. W., Spector, T. D. (2009) Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. *Nat.Genet.* 41, 915-919
- Farr, P. M., Diffey, B. L. (1985) The erythematous response of human skin to ultraviolet radiation. *Br.J.Dermatol.* 113, 65-76
- Feingold, K. R. (1991) The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv.Lipid Res.* 24, 57-82
- Fini, A., Bergamante, V., Ceschel, G. C., Ronchi, C., De Moraes, C. A. (2008) Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations. *AAPS.PharmSciTech.* 9, 762-768
- Flarend, R., Bin, T., Elmore, D., Hem, S. L. (2001) A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem.Toxicol.* 39, 163-168
- Fluhr, J. W., Gloor, M., Lehmann, L., Lazzerini, S., Distant, F., Berardesca, E. (1999) Glycerol accelerates recovery of barrier function in vivo. *Acta Derm.Venereol.* 79, 418-421
- Fluhr, J. W., Kao, J., Jain, M., Ahn, S. K., Feingold, K. R., Elias, P. M. (2001) Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J.Invest Dermatol.* 117, 44-51
- Forslind, B., Werner-Linde, Y., Lindberg, M. and Pallon, J. (1999) Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)*, 79, 12-17
- Franz, T. J. (1975) Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J.Invest Dermatol.* 64, 190-195
- Franz, T. J., Lehman, P. A., Raney, S. G. (2009) Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products. *Skin Pharmacol.Physiol* 22, 276-286
- Fredriksson, T., Hansson, C. H., Holmstedt, B. (1960) Effects of sarin in the anaesthetized and unanaesthetized dog following inhalation. percutaneous absorption and intravenous infusion. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 126, 288-302
- Fuchs, E., Weber, K. (1994b) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 345-382
- Fuchs, E., Coulombe, P., Cheng, J., Chan, Y. M., Hutton, E., Syder, A., Degenstein, L., Yu, Q. C., Letai, A., Vassar, R. (1994c) Genetic bases of epidermolysis bullosa simplex and epidermolytic hyperkeratosis. *J.Invest Dermatol.* 103, 25S-30S
- Fuchs, E. (1995) Keratins and the skin. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11, 123-153
- Fuchs, E., Cleveland, D. W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519
- Garson, J. C., Doucet, J., Leveque, J. L., Tsoucaris, G. (1991) Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J.Invest Dermatol.* 96, 43-49
- Ghadially, R., Williams, M. L., Hou, S. Y., Elias, P. M. (1992) Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses. *J.Invest Dermatol.* 99, 755-763

Ghadially, R., Brown, B. E., Sequeira-Martin, S. M., Feingold, K. R., Elias, P. M. (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J.Clin.Invest* 95, 2281-2290

Gontier, E., Ynsa, M.D., Biro, T., Silva, J.N., Filipe, P., Stachura, J., Dabros, W., Reinert, T., Butz, T., Moretto, P., and Surlève-Bazeille, J.E. (2008) Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion study. *Nanotoxicology*.2(4), 218-231

Granum, B., Gaarder, P. I., Lovik, M. (2001) IgE adjuvant effect caused by particles - immediate and delayed effects. *Toxicology* 156, 149-159

Griesemer, R. D., Blank, I. H., Gould, E. (1958) The penetration of an anticholinesterase agent (sarin) into skin. III. A method for studying the rate of penetration into the skin of the living rabbit. *J.Invest Dermatol.* 31, 255-258

Guidance document for the conduct of skin absorption studies. (2004) *OECD environmental health and safety publications series on testing and assessment.* no 28

Guillard, O., Fauconneau, B., Olichon, D., Dedieu, G., Deloncle, R. (2004) Hyperaluminemia in a woman using an aluminum-containing antiperspirant for 4 years. *Am.J.Med.* 117, 956-959

Hamilton, M. G., Hill, I., Conley, J., Sawyer, T. W., Caneva, D. C., Lundy, P. M. (2004) Clinical aspects of percutaneous poisoning by the chemical warfare agent VX: effects of application site and decontamination. *Mil.Med.* 169, 856-862

Haratake, A., Uchida, Y., Schmuth, M., Tanno, O., Yasuda, R., Epstein, J. H., Elias, P. M., Holleran, W. M. (1997) UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J.Invest Dermatol.* 108, 769-775

Harrison, S. M., Barry, B. W., Dugard, P. H. (1984) Effects of freezing on human skin permeability. *J.Pharm.Pharmacol.* 36, 261-262

Helms, C., Cao, L., Krueger, J. G., Wijsman, E. M., Chamian, F., Gordon, D., Heffernan, M., Daw, J. A., Robarge, J., Ott, J., Kwok, P. Y., Menter, A., Bowcock, A. M. (2003) A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat.Genet.* 35, 349-356

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., Yuspa, S. H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245-254

Hennings, H., Holbrook, K. A. (1983) Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp.Cell Res.* 143, 127-142

Hennings, H., Kruszewski, F. H., Yuspa, S. H., Tucker, R. W. (1989) Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. *Carcinogenesis* 10, 777-780

Herrmann, H., Aebi, U. (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12, 79-90

Hervé-Bazin, B. (2007) Les nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail. *Avis d'experts, INRS, EDP Sciences*

Hillion, F., Daigne, B., Girard, F., Slodzian, G., (1993). A new high performance instrument: the Cameca 'NanoSIMS 50', *Proceedings of SIMS IX, Yokohama 1993*

Hitomi K. (2005) Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol.*15, 313–319.

- Holbrook, K. A., Hennings, H. (1983) Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. *J.Invest Dermatol.* 81, 11s-24s
- Holbrook, K. A., Smith, L. T., Elias, S. (1993) Prenatal diagnosis of genetic skin disease using fetal skin biopsy samples. *Arch.Dermatol.* 129, 1437-1454
- Hostynek, J. J., Dreher, F., Pelosi, A., Anigbogu, A., Maibach, H. I. (2001) Human stratum corneum penetration by nickel. In vivo study of depth distribution after occlusive application of the metal as powder. *Acta Derm.Venereol.Suppl (Stockh)* 5-10
- Houben, E., De, P. K., Rogiers, V. (2007) A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol.Physiol* 20, 122-132
- Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., Epstein, E. H., Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat.Genet.* 24, 61-65
- Huong, S. P., Bun, H., Fourneron, J. D., Reynier, J. P., Andrieu, V. (2009) Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. *Skin Res.Technol.* 15, 253-261
- Irvine, A. D., McLean, W. H. (1999) Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br.J.Dermatol.* 140, 815-828
- Jiang, S. J., Chu, A. W., Lu, Z. F., Pan, M. H., Che, D. F., Zhou, X. J. (2007) Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp.Dermatol.* 16, 985-992
- Johansson, T.B., Akselson, R., Johansson, S.A.E. (1970) X-ray analysis elemental trace at the 10^{-12} level. *Nucl. Instrum. Methods.* B84, 141-143
- Johansson, S.A.E. (1988) PIXE: A novel technique for elemental analysis. Hichester, UK, Wiley
- Kanitakis, J. (1995) Structure histologique de la peau humaine. Dans: Biologie de la peau humaine: Schmidt D. Les éditions INSERM 1-20.
- Kay, J., Gawkrödger, D. J., Mortimer, M. J., Jaron, A. G. (1994) The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *J.Am.Acad.Dermatol.* 30, 35-39
- Kiistala, U. (1968) Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. *J.Invest Dermatol.* 50, 129-137
- Knezevic, D. L., Tadic, V., Cetkovic, S., Kicic, Z. (1993) The efficacy of different formulations of protective-decontaminating ointments based on polyethylene glycol in rats percutaneously poisoned with highly toxic organophosphates. *Vet.Hum.Toxicol.* 35, 418-420
- Koeneman, B. A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J. C., Capco, D. G. (2009) Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol.Toxicol*
- Kondo, S., Kono, T., Sauder, D. N., McKenzie, R. C. (1993) IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J.Invest Dermatol.* 101, 690-694
- Kondo, H., Ichikawa, Y., Imokawa, G. (1998) Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur.J.Immunol.* 28, 769-779
- Kondritzer, A. A., Mayer, W. H., Zvirblis, P. (1959) Removal of sarin from skin and eyes. *AMA.Arch.Ind.Health* 20, 50-52
- Kruszewski, F. H., Hennings, H., Tucker, R. W., Yuspa, S. H. (1991) Differences in the regulation of intracellular calcium in normal and neoplastic keratinocytes are not caused by ras gene mutations. *Cancer Res.* 51, 4206-4212

- Le Panse. R., Bouchard, B., Lebreton, C., Coulomb, B. (1996) Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Exp.Dermatol.* 5, 108-114
- Lee, S. H., Elias, P. M., Proksch, E., Menon, G. K., Mao-Quiang, M., Feingold, K. R. (1992) Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J.Clin.Invest* 89, 530-538
- Leung, D. Y., Bieber, T. (2003) Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151-160
- Lindh, U. (1984) Micron and submicron nuclear probes in biomedicine. *Nucl. Instrum.Methods*, B49, 451-464
- LLabador, Y., Bertault, D., Gouillaud, J.C., Moretto, P. (1990) Advantages of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples. *Nucl. Instrum. Methods*. B49, 435-440
- Loden, M. (1985) The in vitro hydrolysis of diisopropyl fluorophosphate during penetration through human full-thickness skin and isolated epidermis. *J.Invest Dermatol.* 85, 335-339
- Luger, T. A., Stadler, B. M., Katz, S. I., Oppenheim, J. J. (1981) Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAF)6. *J.Immunol.* 127, 1493-1498
- Ma, L., Yamada, S., Wirtz, D., Coulombe, P. A. (2001) A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks. *Nat.Cell Biol.* 3, 503-506
- Madison, K. C., Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Downing, D. T. (1987) Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J.Invest Dermatol.* 88, 714-718
- Maibach, H. I., Feldman, R. J., Milby, T. H., Serat, W. F. (1971) Regional variation in percutaneous penetration in man. Pesticides. *Arch.Environ.Health* 23, 208-211
- Maxwell, D. M., Lenz, D. E., Groff, W. A., Kaminskis, A., Froehlich, H. L. (1987) The effects of blood flow and detoxification on in vivo cholinesterase inhibition by soman in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 88, 66-76
- McGrath, K. G. (2003) An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. *Eur.J.Cancer Prev.* 12, 479-485
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di, H. Y., Ting, J. P., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J. M. (2006) The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24, 1246-1253
- Meguro, S., Arai, Y., Masukawa, K., Uie, K., Tokimitsu, I. (1999) Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. *Photochem.Photobiol.* 69, 317-321
- Menon, G. K., Elias, P. M., Lee, S. H., Feingold, K. R. (1992) Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res.* 270, 503-512
- Menon, G., Ghadially, R. (1997) Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review. *Microsc.Res.Tech.* 37, 180-192
- Mirick, D. K., Davis, S., Thomas, D. B. (2002) Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 94, 1578-1580
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24
- Moretto, Ph., Razafindrabe L. (1995). Simulation of RBS spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 104: 171-175.

Moretto Ph. (1996). The Nuclear Microprobe: an analytical technique for biomedical studies. *Cell Mol. Biol.* 42(1): 1-16.

Moretto, P., Beck, L. (2003) Émission X induite par particules chargées (PIXE) : théorie / Particle-induced X-ray emission (PIXE) : theory. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation.* P3, 2557.1-2557.8

Nangia, A., Camel, E., Berner, B., Maibach, H. (1993) Influence of skin irritants on percutaneous absorption. *Pharm.Res.* 10, 1756-1759

Nemes, Z., Marekov, L. N., Steinert, P. M. (1999) Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity. *J.Biol.Chem.* 274, 11013-11021

Nestle, F. O., Kaplan, D. H., Barker, J. (2009) Psoriasis. *N.Engl.J.Med.* 361, 496-509

Norlen, L. (2001) Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J.Invest Dermatol.* 117, 830-836

Ortega, R., Fayard, B., Salome, M., Deves, G., Susini, J. (2005) Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds. *Chem.Res.Toxicol.* 18, 1512-1519

Pallon, J., Knox, J., Forslind, B., Werner-Linde, Y., Pinhero, T. (1992) Applications in medicine using the new Lund microprobe. *Nucl. Instrum. Methods.* B77, 287.

Pallon, J., Malmqvist, K.G., Werner-Linde, Y., Forslind, B. (1996) PIXE analysis of pathological skin with special reference to psoriasis and atopic dry skin. *Cell. Mol. Biol.* 42, 111-118

Pillai, S., Bikle, D. D., Mancianti, M. L., Cline, P., Hincenbergs, M. (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J.Cell Physiol* 143, 294-302

Pinkus, H. (1951) Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observations on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *J.Invest Dermatol.* 16, 383-386

Pluskota, A., Horzowski, E., Bossinger, O., von, M. A. (2009) In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence. *PLoS.One.* 4, e6622

Potts, R. O., Francoeur, M. L. (1991) The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J.Invest Dermatol.* 96, 495-499

Powell, B. C., Rogers, G. E. (1997) The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. *EXS* 78, 59-148

Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D. G., Schiffmann, D. (2002) Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ.Health Perspect.* 110, 797-800

Reifenrath, W. G., Chellquist, E. M., Shipwash, E. A., Jederberg, W. W., Krueger, G. G. (1984) Percutaneous penetration in the hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. *Br.J.Dermatol.* 111 Suppl 27, 123-135

Reifenrath, W. G., Hawkins, G. S., Kurtz, M. S. (1991) Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: an in vitro-in vivo study. *J.Pharm.Sci.* 80, 526-532

- Rheinwald, J. G., Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343
- Roh, J. Y., Sim, S. J., Yi, J., Park, K., Chung, K. H., Ryu, D. Y., Choi, J. (2009) Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environ.Sci.Technol.* 43, 3933-3940
- Rosett, T., Burk, P., Ohkido, M., Smith, J. G., Jr., Yardley, H. J. (1967) Stretch separation of epidermis. *J.Invest Dermatol.* 49, 15-21
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W. (2001) In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ.Health Perspect.* 109, 239-244
- Schulz, J., Hohenberg, H., Pflücker, F., Gärtner E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., Wendel, V., Gers-Barlag, H., Wittern, K.P. (2002) Distributions of sunscreens on skin. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, S157–S163
- Sharpe, G. R., Gillespie, J. I., Greenwell, J. R. (1989) An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* 254, 25-28
- Siddiqui, O. (1989) Physicochemical, physiological, and mathematical considerations in optimizing percutaneous absorption of drugs. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 6, 1-38
- Slodzian, G., Daigne, B., Girard, F., Boust, F., Hillion, F. (1992) Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell.* 74, 43-50
- Steinert, P. M. (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J.Cell Biol.* 151, F5-F8
- Surber, C., Swarb, F.P., Fmith, E.W. Tape stripping technique. In: *Percutaneous Absorption- Drugs- Cosmetics- Mechanisms- Methodology.* (Bronough, H., Maibach, H.I. eds) 3rd edn New York Marcel Dekker 199, 395-409
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Madison, K. C., Downing, D. T. (1987) Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J.Invest Dermatol.* 88, 709-713
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Kitko, D. J., Madison, K. C., Downing, D. T. (1989) Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J.Invest Dermatol.* 92, 251-257
- Takagi, Y., Nakagawa, H., Kondo, H., Takema, Y., Imokawa, G. (2004) Decreased levels of covalently bound ceramide are associated with ultraviolet B-induced perturbation of the skin barrier. *J.Invest Dermatol.* 123, 1102-1109
- Tan, M. H., Commens, C. A., Burnett, L., Snitch, P. J. (1996) A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australas.J.Dermatol.* 37, 185-187
- Taylor, J. S., Jordan, W. P., Maibach, H. I. (1984) Allergic contact dermatitis from stearamidoethyl diethylamine phosphate: a cosmetic emulsifier. *Contact Dermatitis* 10, 74-76
- Tsai, J. C., Guy, R. H., Thornfeldt, C. R., Gao, W. N., Feingold, K. R., Elias, P. M. (1996) Metabolic approaches to enhance transdermal drug delivery. 1. Effect of lipid synthesis inhibitors. *J.Pharm.Sci.* 85, 643-648
- Van der Valk, P. G., Maibach, H. I. (1990) A functional study of the skin barrier to evaporative water loss by means of repeated cellophane-tape stripping. *Clin.Exp.Dermatol.* 15, 180-182
- Van, G. J., Mol, M. A., Wolthuis, O. L. (1985) On the development of skin models for toxicity testing. *Fundam.Appl.Toxicol.* 5, S98-111

Veronesi, A., de, G. C., Magri, M. D., Lombardi, D., Zanetti, M., Scuderi, C., Dolcetti, R., Viel, A., Crivellari, D., Bidoli, E., Boiocchi, M. (2005) Familial breast cancer: characteristics and outcome of BRCA 1-2 positive and negative cases. *BMC.Cancer* 5, 70

Vigilances Bulletin n°5. Le bulletin de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Jan/Fév 2001

Watanabe, R., Fujii, H., Yamamoto, A., Hashimoto, T., Kameda, K., Ito, M., Ono, T. (1997) Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin. *J.Dermatol.Sci.* 16, 17-22

Watt, F. M. (1989) Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1, 1107-1115

Watt, F., Landsberg, J.P. (1993) Nuclear microscopy: biomedical applications. *Nucl. Instrum. Methods B77*, 249-260

Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F. D. (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol.Lett.*

Zamansky, G. B., Nguyen, U., Chou, I. N. (1991) An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* 97, 985-994

Monte-Carlo Dosimetry for targeted irradiation of individual cells using a microprobe facility.

***Radiation Protection Dosimetry* (2009), Vol. 133, No. 1,
pp.2-11**

S. Incerti, H. Seznec, M. Simon, P. Barberet, C. Habchi and P.
Moretto

Article 3

Outre le fait de permettre une analyse à l'échelle micrométrique de la composition chimique élémentaire d'un échantillon biologique, le microfaisceau d'ions du CENBG permet d'irradier des cellules afin d'étudier l'impact de faibles doses de radioactivité sur la santé humaine. Cependant, la définition et la prédiction de la dose à l'échelle de la cellule reste un point crucial qui nécessite des études de simulations.

Aussi, les calculs de dose sont généralement réalisés à l'aide de méthode de calcul analytique ou de codes de simulation Monte Carlo. Classiquement les modèles géométriques de cellules sont obtenus par la combinaison de simples volumes mathématiques comme les sphères, les cylindres ou les ellipses contenant de l'eau, le composant majeur des tissus biologiques. Cependant, ces modèles ne tiennent pas compte des changements dans la morphologie cellulaire, de la composition chimique élémentaire des cellules. Elles sont donc assez éloignées de la réalité.

Ce travail présente le développement d'une méthode de simulation qui permet d'estimer la dose déposée dans une cellule (kératinocyte) après irradiation par microfaisceau d'ions dans un modèle cellulaire réaliste en 3 dimensions.

J'ai ainsi apporté ma contribution à ce travail en réalisant les expériences relatives à l'étude de la composition chimique élémentaire des cellules HaCaT et aux reconstructions 3D par imagerie confocale afin d'obtenir des données représentatives qui ont pu être intégrées dans le code de simulation Monte Carlo Geant 4.

MONTE CARLO DOSIMETRY FOR TARGETED IRRADIATION OF INDIVIDUAL CELLS USING A MICROBEAM FACILITY

S. Incerti^{1,2,*}, H. Seznec^{1,2}, M. Simon^{1,2}, Ph. Barberet^{1,2}, C. Habchi^{1,2} and Ph. Moretto^{1,2}

¹CNRS/IN2P3, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan, UMR 5797, Gradignan F-33175, France

²Université de Bordeaux, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan, UMR 5797, Gradignan F-33175, France

Received October 27 2008, revised December 17 2008, accepted December 27 2008

Microbeam facilities provide a unique opportunity to investigate the effects of ionising radiation on living biological cells with a precise control of the delivered dose. This paper describes dosimetry calculations performed at the single-cell level in the microbeam irradiation facility available at the Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan in France, using the object-oriented Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. The cell geometry model is based on high-resolution three-dimensional voxelised phantoms of a human keratinocyte (HaCaT) cell line. Such phantoms are built from confocal microscopy imaging and from ion beam chemical elemental analysis. Results are presented for single-cell irradiation with 3 MeV incident alpha particles.

INTRODUCTION

Understanding the biological effects of low doses of ionising radiation is one of the challenges of today's radiobiology research. According to a review by Prise⁽¹⁾, new effects of biological responses to radiation have been recently observed, such as genomic instability, adaptative response and bystander effects, which may question the validity of human health risk estimation at low doses of radiation. During the last decade, state-of-the-art experimental irradiation facilities have been developed in order to investigate the effects of ionising radiation exposure on living cells, making use, for example, of radioactive sources, classical beams or microbeams⁽²⁾. Among them, microbeams allow a precise control of the delivered dose on the targeted cell among a cellular population, with a beam resolution on the target of a few microns in air, compatible with cellular dimensions. This work presents the development of computer simulation software allowing the estimation of deposited doses in realistic three-dimensional high-resolution cellular models. The code includes a full model of the microbeam cellular irradiation facility available at the Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG) in France⁽³⁾. This facility is able to deliver single protons and alpha particles in the mega electron volt range to single living cells. Experimental measurements of elementary dose deposits in the cellular volumes are not accessible in this facility since the irradiated cells are maintained in the culture medium during the

irradiation sequence. The incident particles of a few mega electron volts are entirely absorbed by the liquid medium after exiting the targeted cells. Consequently, the estimation of dose deposits in individual cells is usually performed using analytical calculation or Monte Carlo simulation codes. Classically, the cell geometrical models are obtained from the combination of simple mathematical volumes such as spheres, cylinders, ellipsoids^(4,5) containing liquid water, the main component of biological tissue. However, these models do not take into account the changes of cellular morphology, or realistic chemical compositions, which become accessible nowadays using high-resolution techniques at the cellular level, such as confocal microscopy imaging and ion beam analysis at the sub-micrometre scale.

The first section of this paper presents the cellular dosimetry Monte Carlo code, which is implemented by the authors, including the modelling of the CENBG microbeam irradiation beam line as well as the software implementation of cellular three-dimensional geometrical models. The second section explains how confocal microscopy imaging and ion beam analysis techniques can be combined together in order to build such realistic cellular models. Finally, cellular dosimetry estimations obtained with the simulation code for several geometry conformations and chemical compositions are shown and discussed.

THE MONTE CARLO SIMULATION CODE

The Geant4 toolkit

Monte Carlo codes are the powerful tools that are able to mimic the stochastic nature of elementary

*Corresponding author: incerti@cenbg.in2p3.fr

particle interactions with matter. Some of them can reproduce extremely complex experimental setups, such as entire detectors on the large hadron collider at CERN. Such codes are widely accessible today, for example, EGS4⁽⁶⁾, EGS5⁽⁷⁾, EGSnrc⁽⁸⁾ and ETRAN⁽⁹⁾ for the simulation of electron and photon electromagnetic processes, and Fluka⁽¹⁰⁾, Geant4^(11,12), MCNP/MCNPX⁽¹³⁾ and Penelope⁽¹⁴⁾, which include hadronic interaction processes. Among those cited, the Geant4 toolkit uses the object-oriented technology. It is entirely free, open source and in constant improvement, following an iterative-incremental software development process, allowing extension and refinement without affecting the existing user code. Originally developed for applications in high-energy physics, Geant4 is now widely used in various domains, such as medical physics, space applications and radiation protection. The toolkit's ability to simulate classical and microbeam cellular irradiation facilities, as well as precise ray-tracing in focusing magnetic fields at the sub-micrometre scale has been shown previously^(15–20).

Modelling of the CENBG microbeam facility

The CENBG is equipped with a microbeam line irradiation facility allowing single-cell irradiation in air, in single-ion mode, with a targeting accuracy of $<10\ \mu\text{m}$. This facility is installed on a HVEE[®] Singletron low-energy electrostatic accelerator, delivering protons, deuterons and alpha particles up to 3.5 MeV. The full microbeam line has been modelled in the simulation code for typical cellular irradiation conditions with 3 MeV incident alpha particles, taking into account all beam line components, such as a 10° beam switching magnet, a defining circular object collimator of $5\ \mu\text{m}$ in diameter, a set of four focusing quadrupole magnets allowing symmetrical demagnification by a factor of 10 of the incoming beam spot and the full cellular irradiation chamber setup (gas ion counter, extraction window, culture foil and dish with medium). Full details of the beam line elements and magnetic fields modelling may be found in previous publications^(16,18,19).

Architecture of the developed software

The simulation software has been developed as a Geant4 user application following object-oriented code development rules. Apart from the classical Geant4 user classes that are mandatory to build a user application (description of setup geometry and materials, description of physics processes and particle generation), specific classes have been developed in order to model the beam line switching magnet and the four focusing magnetic quadrupoles, as well as the specific geometry classes for realistic modelling of the targeted cells.

Implementing cellular phantoms in Geant4

Geant4-based dosimetry simulations at the individual cell scale for the CENBG microbeam line and for other classical cellular irradiation setups have been previously reported^(2,16). These estimations were obtained using simple cell geometries such as parallelepiped or embedded ellipsoid models representing the cell nucleus and the cell cytoplasm. As more detailed cellular geometries become available, thanks to advanced high-resolution imaging techniques such as confocal microscopy, it is now possible to build realistic three-dimensional geometries with a voxelised architecture. The authors chose to name these geometries as 'cellular phantoms' in reference to human phantoms used in the medical physics community. A single cell can be modelled in the simulation application using a phantom made of parallelepiped voxels. Phantoms containing a large number of voxels (up to $512 \times 512 \times 512$ voxels) have been implemented in the application, depending on the selected microscopy resolution when imaging the cells. Each individual voxel contains information about its absolute position within the whole cellular phantom as well as information about local chemical composition and density. Two geometrical approaches based on specific geometry classes available in the toolkit—the 'pure' parameterised approach and the 'nested' parameterised approach—have been investigated, leading to different computing time performances, especially at higher imaging resolutions.

Pure parameterised geometry

In this classical approach, the cell phantom is made of multiple copies of a parallelepiped voxel, all having the same geometry. The multiple copies contain different materials, corresponding to different cellular regions (cytoplasm or nucleus). The whole cell phantom is implemented using the specific Geant4 *G4PVParameterised* class. Each voxel position and material is parameterised as a function of the voxel copy number. This approach has been implemented in the Geant4 microbeam advanced example developed by the team of this study at CENBG and which is part of the official Geant4 releases. It explains to Geant4 users how to implement a full microbeam irradiation facility and a voxelised phantom at the single-cell scale into a Geant4-based simulation.

Nested parameterised geometry

In this approach, the whole phantom is described by a large parallelepiped volume segmented using replicated volumes. The full parallelepiped is first sliced along the *Y* vertical axis, each horizontal slice

having the same vertical thickness as a single voxel. Each slice is then segmented horizontally into bars along the X horizontal axis, each bar having the same transverse section as individual voxels. Finally, each bar is cut into individual voxels along the beam propagation axis (Z). The first two levels of segmentation make use of the *G4PVReplica* class, whereas the third level is described using the *G4PVParameterised* class. In such a 'nested' parameterisation, the voxels are referenced as 'daughter' volumes of repeated 'parent' (bars) and 'grand-parent' (slices) volumes. As in the previous approach, each voxel's material depends on the copy number of the parents. Voxels that do not belong to the nucleus or to the cytoplasm are filled with cell culture medium, containing mainly liquid water. This alternative geometry implementation is expected to provide faster navigation and much less memory usage when the number of voxels becomes large.

Both geometrical approaches are illustrated in Figure 1.

Physics processes

The simulation software uses the physics processes of the Geant4 low-energy electromagnetic package with associated data G4LOWEM5.1⁽¹⁶⁾. Dominant processes occurring in the experimental irradiation setup in the mega electron volt regime and affecting incident alpha particles are multiple scattering and ionisation. The former is simulated with the *G4hMultipleScattering* class for light ions; the latter is simulated with the *G4LowEnergyIonisation* class for secondary ionisation electrons and with the *G4hLowEnergyIonisation* class for alpha particles. This class uses the electronic stopping power table *ICRU_R49He*. The default cut-off value for the production of secondary particles has been set to 10 nm and a maximum step size limiter of 10 nm is applied in the irradiation chamber setup in order to ensure a reliable tracking⁽¹⁵⁾.

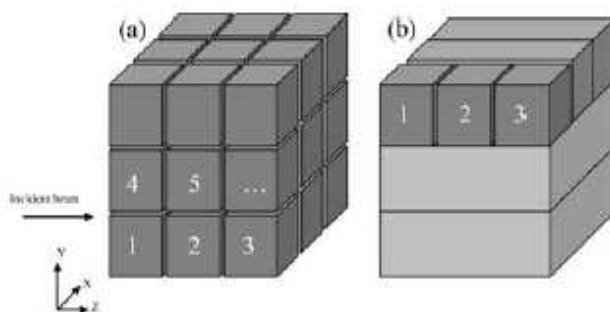


Figure 1. (a) Principle of the 'pure' parameterised phantom geometry and (b) 'nested' parameterised geometry.

SINGLE-CELL GEOMETRY MODELLING

Single-cell targeted irradiation is routinely performed at the CENBG microbeam irradiation facility with 3 MeV incident alpha particles on human keratinocyte cells of the HaCaT line⁽²¹⁾. A specific HaCaT cell line, expressing the chimeric recombinant histone H2B-GFP and identified as 'HaCaT/(GFP-H2B)Tg', has been developed at CENBG for *in vivo* staining of cellular nuclei, allowing automated cell recognition during the irradiation phase of a cell population^(22–24).

Geometry from confocal imaging

Cell phantoms were originally created from actual confocal microscopy images of HaCaT/(H2B-GFP)Tg cells. These cells were grown in a dedicated medium and were fixed after 4 or 24 h of culture under appropriate conditions. Staining of the nucleus DNA was achieved using the fluorescent H2B-GFP protein, and the cytoplasm was marked with propidium iodide, an RNA and DNA marker. The latter was also able to locate nucleoli—a nuclear region highly rich in RNA, protein and heterochromatin—inside the cell's nucleus. Two-dimensional images of the stained cells were acquired at the highest and optimised resolution (around 160 nm) with a Leica[®] DMR TCS SP2 confocal microscope for several two-dimensional resolutions, up to 512×512 pixels. The full sets of images were reconstructed in three dimensions using the Leica Confocal Software[®]. These images were transferred into the Mercury[®] Computer Systems, Inc., Amira[®](25), suite for filtering and geometry reconstruction. Filtering was necessary to eliminate the residual fluorescence generated by the cell glass support used for microscopy. A three-dimensional confocal image and the corresponding reconstructed model obtained from Amira[®] are shown in Figure 2.

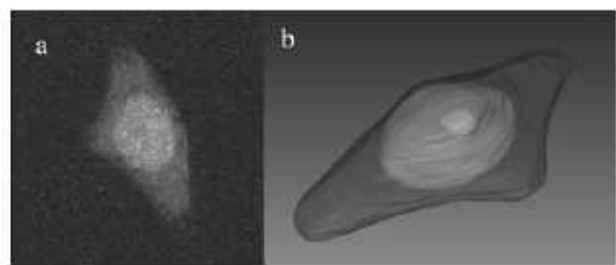


Figure 2. (a) Three-dimensional image of a single 24 h incubated HaCaT/(H2B-GFP)Tg cell obtained after reconstruction with the Leica Confocal Software[®]. The cytoplasm appears in dark gray (stained with propidium iodide), whereas the nucleus is shown in lighter gray (H2B-GFP). The nucleolus is faintly visible inside the nucleus. The corresponding two-dimensional images were acquired with a resolution of 128×128 . (b) Smooth reconstructed model of the cell obtained using Amira[®]. The cytoplasm, nucleus and nucleolus are clearly visible. The longest axis has a length of about 18 μm .

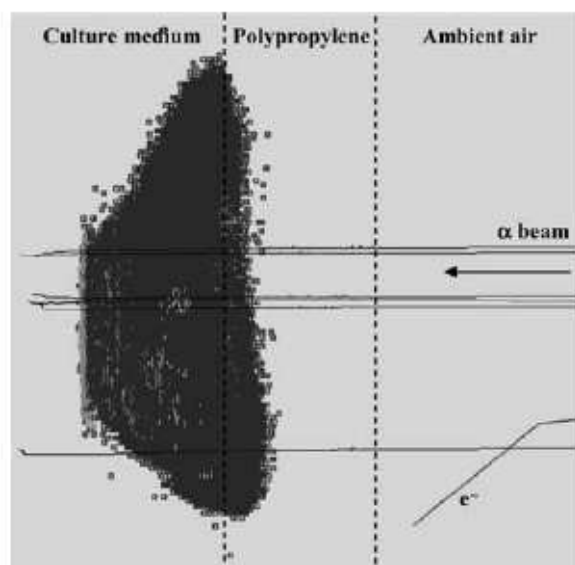


Figure 3. Graphical visualisation of a 24 h HaCaT/(H2B-GFP)Tg phantom obtained from the Geant4 simulation code. For better viewing, the picture has been slightly rotated horizontally and all solids are transparent. The phantom geometry has been implemented following the 'pure' parameterised approach. Six incoming alpha particles are visible and penetrate into the cell phantom from the right-hand side. A large angle scattered secondary electron is also visible in the ambient air region in the right corner. This phantom was built from the two-dimensional images of 256×256 confocal microscopy stacked in 60 layers. A single voxel has a transverse size of about 180 nm (in X and Y) and a longitudinal thickness of about 160 nm (in Z). The cytoplasm voxels are displayed in dark gray, whereas the light gray voxels show the nucleus and nucleolus, which are mainly hidden by the cytoplasm voxels in the picture.

The cell nucleus and cytoplasm could be extracted into individual files that were merged into a single phantom file. This file contains information about the total number of voxels for each cellular region (cytoplasm, nucleus and nucleoli), the voxel size along the three dimensions, a position shift in order to centre the cell in the simulated irradiation dish and the list of each voxel's position and material composition, as well as the intensity fluorescence content of the voxel. The phantom could then be imported directly into the Geant4-based simulation. Figure 3 shows a graphical visualisation of the three-dimensional HaCaT phantom displayed by the Geant4 microbeam simulation code with the OpenGL event display.

Elemental analysis using ion beam techniques

Each voxel of the cellular phantom has to be characterised by a material. A material specifies the local elementary chemical composition of the medium

and the local density. The former can be measured experimentally at the single-cell scale using ion beam analysis techniques available on the CENBG nuclear microprobe^(26,27). These techniques require a dedicated sample preparation in order to preserve the cell structure and the distributions of chemical elements. Living cells cannot be directly mapped in the high-vacuum analysis chamber of the microprobe and must be dehydrated. For this purpose, about 10^4 HaCaT/(H2B-GFP)Tg cells were first cultured as a monolayer on a 2 μm thick polycarbonate foil in 10 μl of culture medium.

Cell coating was achieved with the Cell-TakTM adhesion factor. After 4 or 24 h of culture, cells were cryofixed in liquid nitrogen chilled with isopentane at -160°C and were freeze dried for 24 h at -35°C . Mapping of low- Z elements (C, N and O) was performed using Rutherford back-scattering spectrometry (RBS), in parallel with particle-induced X-ray emission (PIXE) for the quantification of trace elements in the cells. Simultaneous RBS and PIXE analyses give access to the organic mass of the sample and to its chemical elemental content. They were performed with a 2.5 MeV proton beam. The beam was focused on a high flux mode down to a spot of $\sim 2 \mu\text{m}$ in diameter with a high current of a few hundreds of picoamperes. The Si(Li) X-ray fluorescence detector was covered with a 100 μm thick aluminium 'funny' filter with an aperture of 500 μm in diameter in order to reduce the contribution of lighter elements to the full X spectrum. Scanning transmission ion microscopy (STIM) was additionally used for consistency in order to extract the areal mass of the sample. STIM was performed with 2 MeV alphas, providing a better density contrast than protons. An STIM image is shown in Figure 4.

The RBS energy spectra and collected charges were analysed with the RUMPIN[®] software⁽²⁸⁾, and X-ray emission spectra were fitted with the GUPIX[®] software⁽²⁹⁾. STIM data were analysed with the PAPARAMBORDE[®] code⁽²⁷⁾. The areal mass for 4 h incubated cells was $289.1 \pm 10.3 \mu\text{g cm}^{-2}$ from RBS and $297.5 \pm 24.4 \mu\text{g cm}^{-2}$ from STIM, showing a reasonable agreement. For 24 h cells, the areal mass increased up to $310.1 \pm 5.4 \mu\text{g cm}^{-2}$ from RBS and $360.5 \pm 10.7 \mu\text{g cm}^{-2}$ from STIM. The observed mass difference between 4 h incubated cells and 24 h cells could be explained by the use of trypsin/EDTA in the experimental procedure, which mainly breaks down external matrix proteins and chelates ions (such as Ca^{2+}). Consequently, the cells harvested 4 h after plating do not have sufficient time to restore their external matrix by comparison with those harvested 24 h later. The areal masses (ng cm^{-2}) of the minerals were calculated from the X-ray yields extracted using GUPIX[®], and the concentrations were finally normalised to the dry mass of the sample (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass) obtained from RBS.

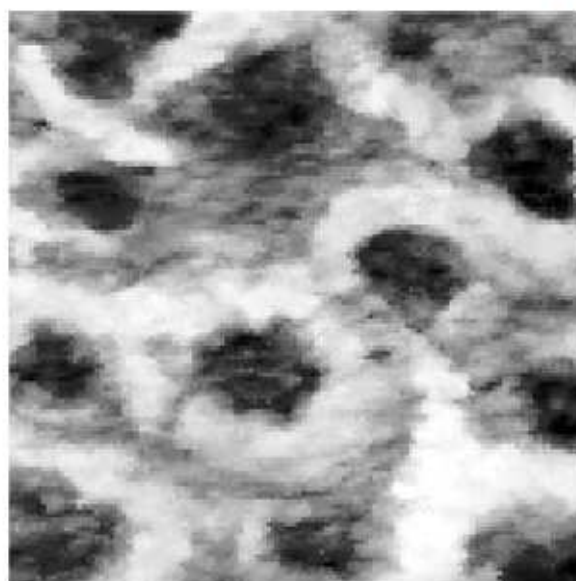


Figure 4. Two-dimensional STIM image of 24 h incubated cells. The nucleus and cytoplasm structures are nicely contrasted, thanks to the technique's better sensitivity with alpha particles than with protons. The beam was swept on a 60 μm side square. This image was produced with the PAPARAMBORDE analysis software⁽²⁷⁾. The local density is increasing from white to dark.

All concentrations were measured for a dry sample. Figure 5 shows four element maps for 24 h incubated cells: carbon (C) from RBS, phosphorus (P), nitrogen (N) and potassium (K) from PIXE. Concentrations for organic elements and minerals were measured from RBS and PIXE at three different locations in the nuclei's area and in the cytoplasm region and they were averaged, as shown in Figure 6.

The wet concentrations were calculated by assuming that a single cell contains on average 70% of liquid water and 30% of dry matter; the latter contains 95% of organic elements (H, C, O and N, from RBS) and 5% of minerals (from PIXE). Results are indicated in Table 1.

Although these results could be improved by increasing the number of biological samples analysed and by refining the selection of analysed nucleus and cytoplasm areas, they are sufficient to demonstrate the possibility of implementing realistic cellular models in a Monte Carlo simulation application.

RESULTS AND DISCUSSION

Software performance

The simulation features presented in this have been obtained with release version 9.1 + patch 01 of the Geant4 toolkit on a Windows-based personal

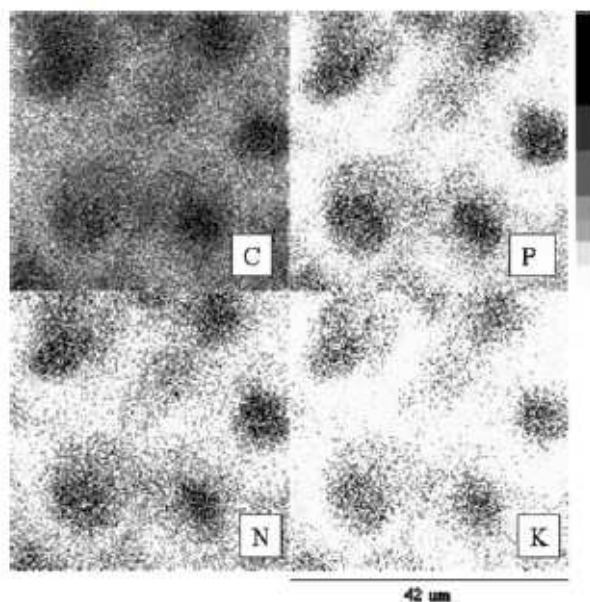


Figure 5. Two-dimensional distribution maps of carbon (C), phosphorus (P), nitrogen (N) and potassium (K) measured from RBS and PIXE for 24 h incubated dehydrated HaCaT/(GFP-H2B)Tg cells. The 2.5 MeV proton beam was swept on a 42 μm side square. The right-hand side scale shows qualitatively the element local concentration (top of right-hand side scale is the highest). The images were extracted from the Supra Visio⁽³⁹⁾ analysis software.

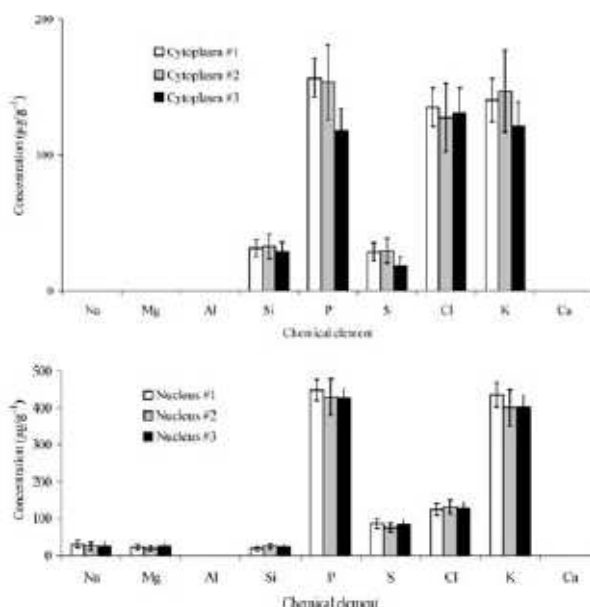


Figure 6. Elemental mineral composition calculated using GUPIX[®] for three nuclear and cytoplasm areas selected in Figure 5. The data present a satisfying reproducibility. Average concentrations over the three areas were considered in the final calculations.

Table 1. Mass fraction percentage of each chemical element present in a hydrated HaCaT/(GFP-H2B)Tg cell cultured during 24 h, from measurements using RBS and PIXE techniques on the CENBG nuclear microprobe.

Element	Mass fraction (%)	
	Cytoplasm	Nucleus
Hydrogen	21.86	21.77
Carbon	13.01	12.25
Nitrogen	1.29	2.13
Oxygen	62.34	62.35
Sodium	—	0.04
Magnesium	—	0.03
Silicon	0.06	0.01
Phosphorous	0.48	0.60
Sulphur	0.11	0.12
Chlorine	0.29	0.10
Potassium	0.57	0.60
Total	100.00	100.00

computer running the VMware^{®(30)} environment, for which a full Geant4 installation and associated data analysis and visualisation tools under Scientific Linux^{®(31)} were provided, free of licensing to users. Full information is available on a dedicated website⁽³²⁾. Running a simulation with such high-resolution phantoms requires high computing performances. The computing time needed for the simulation of single-cell irradiation with 3 MeV alpha particles was estimated for several image resolutions and for both phantom geometry approaches—‘pure’ parameterised and ‘nested’ parameterised. Results are shown in Figure 7. Computing times for the ‘pure’ parameterised geometry may reach prohibitive values at high-resolutions, whereas computing times observed for the ‘nested’ geometry do not change significantly with the resolution and remain at reasonable levels. This ‘nested’ approach should consequently be preferred if the number of voxels in the cellular phantom becomes large.

Dosimetry for 3 MeV alpha irradiation

A specific analysis macro file has been written in order to automatically analyse the simulation results using the ROOT object-oriented data analysis framework⁽³³⁾. In particular, this macro is able to calculate the incident particle linear energy transfer (LET) at the targeted cell phantom entrance, the specific energy in the nucleus and in the cytoplasm, and the particle range inside the cell culture medium. The specific energy, expressed in gray (Gy), represents the stochastic analogue of the absorbed dose adopted by ICRU Report No. 60. Specific energy in a cellular sub-volume of interest is calculated as the ratio of all elementary energy deposits in this specific

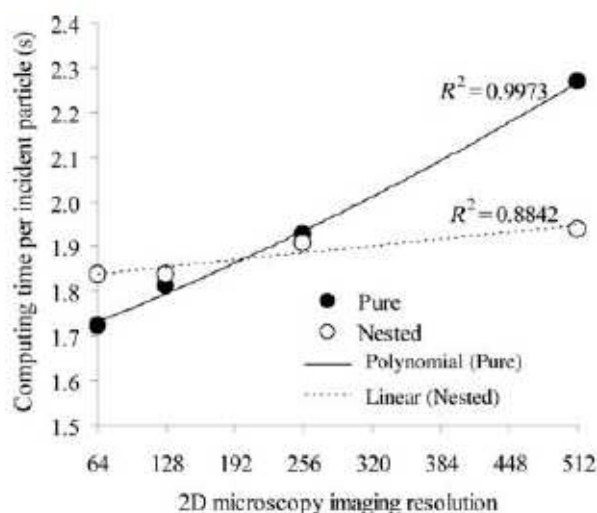


Figure 7. Computing time measured for a single-cell irradiation with 3 MeV incident alpha particles, as a function of the confocal microscopy imaging resolution (512 stands for a planar resolution of 512 × 512 pixels) and as a function of the phantom geometry approach. Linear and second-order polynomial fits to the data and correlation factors are shown.

site to the volume of total mass. Information on the phantom's relative positioning with respect to the beam is also displayed in order to check the alignment of the targeted cell. Three mega electron volt incident particles have a $142 \pm 16 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ LET at the cell entrance, which is in agreement with previous estimations on the CENBG setup⁽¹⁶⁾. The full range in the culture medium is of the order of 10–12 μm (Figure 3).

Besides the built-in Geant4 visualisation capabilities as shown in Figure 3, the authors investigated the possibility of visualising the simulated dose distribution using the gMocren tool developed by Saitoh *et al.*⁽³⁴⁾, in the context of the France–Japan International Associated Laboratory FJPPL⁽³⁵⁾. Figure 8 shows three-dimensional transverse cut and projections of a single HaCaT cell phantom irradiated with 10^4 incident alpha particles delivered by the modelled microbeam line. This tool has been already used for visualisation of dose distributions obtained with Geant4 in human patient volumes for therapeutic irradiation. It is a convenient and promising tool for visualisation at the sub-cellular scale.

Specific energy dependence with cell morphology

The specific energy in the targeted cell's nucleus has been estimated for several cell morphologies, obtained after different incubation durations. The mean value and the associated error are taken as the Gaussian fit mean and root mean square to the

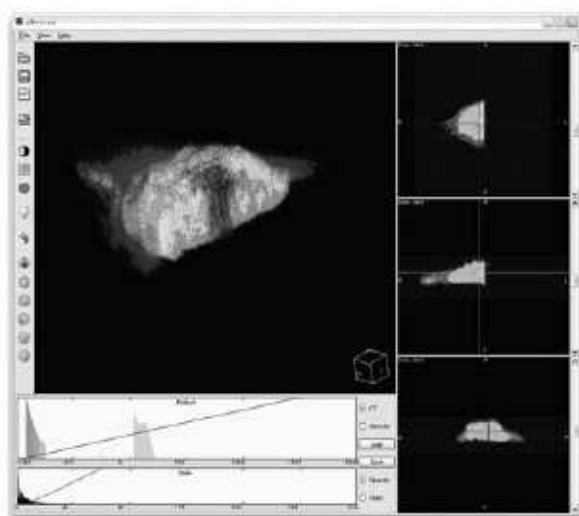


Figure 8. gMocren visualisation of a cell phantom irradiated by incident alpha particles. The main frame shows a transverse cut of the cell phantom simultaneously with the penetrating alpha particle beam (central darker irradiated area). On the right-hand side, corresponding planar projections of the cellular density are shown (the lighter, the denser). Bottom histograms display density distribution for the cytoplasm and for the nucleus (top) and corresponding specific energy distributions (bottom).

Table 2. Cytoplasm, nucleus volumes and specific energy in the nucleus for 3 MeV incident alpha particles for several cell morphologies.

Cell	Incubation duration (h)	Volume (μm^3)		Mean specific energy in nucleus (Gy)
		Cytoplasm	Nucleus	
<i>a</i>	4	158	555	0.34 ± 0.05
<i>b</i>	4	144	469	0.34 ± 0.06
<i>c</i>	24	651	471	0.30 ± 0.02
<i>d</i>	24	1735	1373	0.080 ± 0.003

The corresponding cell phantoms are shown in Figure 9.

nucleus specific energy distribution and are given in Table 2 for four different morphologies shown in Figure 9. Although morphologies *a*, *b* and *c* are characterised with specific energies of the same order of magnitude, morphology *d*, which presents a smaller thickness to the incident beam, shows a much smaller specific energy. At mega electron volt energies with alpha particles, morphology changes can consequently have a non-negligible impact on specific energy distributions among the cells of an irradiation dish and therefore should be minimised as much as possible, for a better control of the uniformity of the delivered dose.

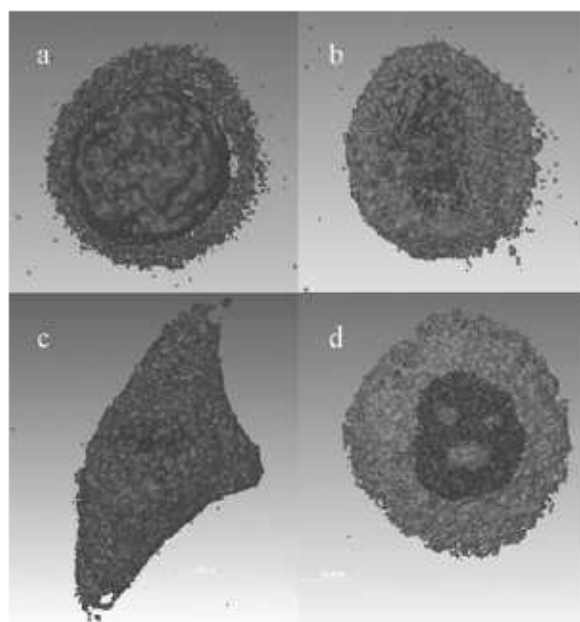


Figure 9. Selection of four cell phantoms reconstructed from 128×128 two-dimensional confocal images. Cells *a* and *b* have been incubated during 4 h, whereas cells *c* and *d* have been incubated for 24 h, the classical incubation duration for cellular irradiation at CENBG. The cytoplasm and nucleoli appear in light gray, whereas the nucleus is shown in dark gray.

Table 3. Calculation of the specific energy for 3 MeV incident alpha particles for three different cell chemical compositions applied to the *c* phantom in the 'pure' parameterised approach: water, standard reference composition and chemical composition measured at CENBG.

Chemical composition	Mean specific energy in nucleus (Gy)
Liquid water	0.30 ± 0.02
Reference ICRU cell ⁽⁵⁾	0.30 ± 0.06
CENBG measurements	0.37 ± 0.06

Specific energy dependence with chemical composition

In Monte Carlo simulations, cells are often modelled by assuming that they contain only liquid water. The impact of a chemical composition change in the voxelised phantom was investigated for three different compositions: liquid–water-only for the nucleus and for the cytoplasm, standard composition of cellular medium as published in ICRU Report No. 44⁽⁵⁾ and HaCaT chemical composition measured at CENBG from RBS and PIXE analysis. Results are given in Table 3 for phantom cell *c*. Specific energy values are close to each other, suggesting that choosing

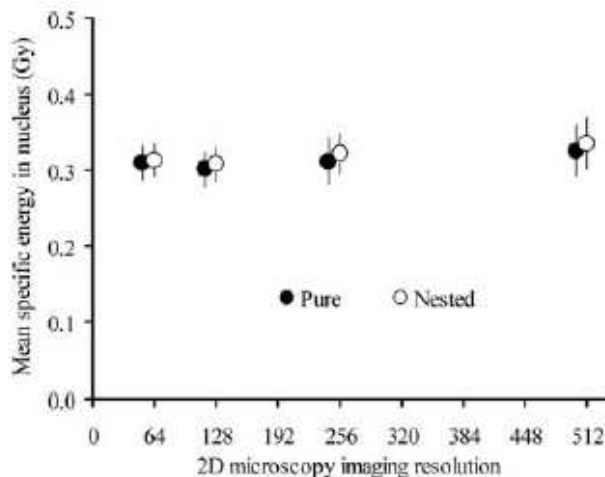


Figure 10. Mean specific energy in the cell nucleus calculated from an irradiation with 10^4 incident 3 MeV alpha particles, as a function of the confocal microscopy image resolution (512 stands for a planar resolution of 512×512 pixels) and as a function of the phantom geometry implementation ('nested' parameterised or 'pure' parameterised). The mean value and the error are taken, respectively, as the mean and root mean square of the Gaussian fit to the specific energy distribution within the nucleus. The data points have been slightly shifted horizontally for better visibility.

liquid water as the main component of cells remains a reasonable approximation for dosimetry in cellular volumes. The slightly higher value obtained with the composition measured at CENBG could be explained by a higher content of hydrogen and minerals than in the reference ICRU cell. Such experimental measurements at the cellular scale remain very delicate to perform and depend strongly on experimental protocols.

Specific energy dependence with imaging resolution

Specific energy dependence as a function of the confocal imaging resolution was investigated for several imaging resolutions, for both phantom geometry approaches ('pure' and 'nested' parameterised) containing liquid water only. As shown in Figure 10, there is no relevant change in the specific energy mean value and error, which remain stable as a function of the imaging resolution. The two approaches give very similar, but not identical, results. The 'nested' approach requires the construction of a full parallelepiped shape phantom containing not only the whole cell but also the culture medium surrounding the cell. Consequently, the culture medium is segmented, limiting the step size of the physics processes occurring during the simulation. Instead, the 'pure' approach is an assembly of voxels describing only the structure of the cell, and it is immersed in the culture medium, which is not segmented.

Although the cell voxels are identical in shape, position and content for both approaches, this step limitation leads to the observed fluctuations between the two geometry approaches.

CONCLUSION

This study demonstrates for the first time the possibilities of the general-purpose Geant4 toolkit for the modelling of realistic high-resolution three-dimensional phantoms at the cellular scale for microbeam irradiation. These phantoms integrate biological data on sub-cellular volumes, masses, composition and morphology. It is shown that the specific energy deposited in such phantoms depends weakly both on the confocal microscopy imaging resolution and on the chemical composition of cell components, well approximated by liquid water. However, cellular morphology changes may have a much stronger impact. Therefore, dosimetry calculations for classical radiobiology irradiation experiments performed on living cell populations will not benefit significantly from the described developments, as long as the cellular samples remain quasi-uniform in morphology. This work is a first step towards the modelling of realistic three-dimensional multi-cellular phantoms such as biological tissues and even organ sub-volumes. New ion beam analysis techniques at the nanometre scale will soon be available at CENBG on a dedicated two-stage high-demagnification 'nanobeam' line^(17–19), giving access to a more precise mapping of cells and their inner constituents, such as mitochondria. Associated with specific marking techniques, cell-based phantoms will become even more realistic and complex. In parallel, it is believed that the extension of the Geant4 toolkit in the framework of the Geant4-DNA project^(36,37) down to very low energy (electron volt scale) at the molecular level will naturally complement these realistic geometrical models. It will be possible to predict biological damage at the DNA molecule scale in the cell-based phantoms, including the production of DNA single- and double-strand breaks, which are induced by direct ionising radiation effects and indirect effects of oxidative radical species on the cell DNA content. Such quantities can be measured experimentally⁽²³⁾ and are of primary importance for radiobiology and radiotherapy applications: double-strand breaks play an important and critical role in the induction of programmed cell death following irradiation.

The code described in this paper is available for download in the Geant4 toolkit as an advanced example that will be regularly updated and improved, following the toolkit bi-annual releases. Although modelling activities have been historically based on the Geant4 toolkit only, the methodology presented in this paper is not limited to this toolkit.

Other general-purpose Monte Carlo codes, e.g. Penelope⁽¹⁴⁾, are able to handle the navigation in complex geometrical phantoms⁽³⁸⁾ simultaneously with physics processes down to very low energies (50 eV), opening exciting modelling perspectives for applications at the cellular scale.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Geant4 collaboration, in particular Dr J. Apostolakis (CERN, Switzerland), Dr M. Asai (SLAC, USA) and Dr G. Cosmo (CERN, Switzerland), for their valuable help regarding voxelised geometry implementation. The authors also express their gratitude to Dr A. Kimura (Ashikaga Institute of Technology, Japan), to Dr A. Saitoh (University of Hyogo, Japan) and to Dr S. Tanaka (Ritsumeikan University, Japan) for providing the gMocren visualisation images of the cell phantoms. The authors would like to acknowledge P. Legros and C. Poujol, from Plateforme Imagerie Cellulaire Institut Neurosciences (PICIN/Bordeaux2), for their helpful and friendly assistance in fluorescence microscopy techniques. This paper is dedicated to the memory of Dr Marc Incerti and Mrs Paule Incerti.

FUNDING

The AIFIRA facility and the technical development of the microbeam line have been financially supported by the Région Aquitaine. This work is partially supported by the International Associated Laboratory CNRS-KEK-CEA France-Japan Particle Physics Laboratory (FJPPL).

REFERENCES

1. Prise, K. *New advances in radiation biology*. Occup. Med. **56**(3), 156–161 (2006).
2. Incerti, S., Gault, N., Habchi, C., Lefaix, J. L., Moretto, Ph., Poncy, J. L., Pouthier, Th. and Seznec, H. *A comparison of cellular irradiation techniques with alpha particles using the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit*. Radiat. Prot. Dosim. **122**(1–4), 327–329 (2006).
3. Barberet, Ph., Balana, A., Incerti, S., Michelet-Habchi, C., Moretto, Ph. and Pouthier, Th. *Development of a focused charged particle microbeam for the irradiation of individual cells*. Rev. Sci. Instrum. **76**, 015101 (2005).
4. Bailly, I., Champion, C., Massiot, P., Savarin, P., Poncy, J. L., Crespin, S., Alloy, G., Jacob, V. and Petibon, E. *Scintillation and solid-track detectors as dose monitors*. Nucl. Instrum. Methods B **187**, 137–148 (2002).
5. Alard, J. P., Bodez, V., Tchirkov, A., Nénot, M. L., Arnold, J., Crespon, S., Rapp, M., Verrelle, P. and Dionet, C. *Simulation of neutron interactions at the single-cell level*. Radiat. Res. **158**, 650–656 (2002).
6. Nelson, W. R., Hirayama, H. and Rogers, D. W. O. *The EGS4 code system*. SLAC-265, Stanford Linear Accelerator Center (1985).

7. Hirayama, H., Namito, Y., Bielajew, A. F., Wilderman, S. J. and Nelson, W. R. *The EGS5 code system*. SLAC-R-730 and KEK Report 2005-8 (2005).
8. Kawrakow, I. *Accurate condensed history Monte Carlo simulation of electron transport. I. EGSnrc, the new EGS4 version*. Med. Phys. **27**, 485–498 (2000).
9. Berger, M. J. and Seltzer, S. M. *ETRAN Monte Carlo code system for electron and photon transport through extended media*. Report CCC-107 (Oak Ridge National Laboratories, Oak Ridge, TN) (1968).
10. Fassò, A., Ferrari, A., Ranft, J. and Sala, P. R. *FLUKA: a multi-particle transport code*. CERN-2005-10, INFN/TC_05/11, SLAC-R-773 (2005).
11. Agostinelli, S. *et al.* *Geant4—a simulation toolkit*. Nucl. Instrum. Methods A **506**, 250–303 (2003).
12. Allison, J. *et al.* *Geant4 developments and applications*. IEEE Trans. Nucl. Sci. **51**, 1395–1401 (2004).
13. Breisemeister, J. F. *MCNP: a general Monte Carlo N-particle transport code*. Version 4C, Manual LA-13709-M (2000).
14. Salvat, F., Fernandez-Varea, J. M., Acosta, E. and Sempaul, J. *PENELOPE: A Code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport*. Rapport NEA/NSC/DOC, ISBN 92-64-18475, Vol. 19 (Issy-les-Moulineaux, France: OECD Nuclear Energy Agency) (2001).
15. Incerti, S., Barberet, Ph., Courtois, B., Michelet-Habchi, C. and Moretto, Ph. *Simulation of ion propagation in the microbeam line of CENBG using Geant4*. Nucl. Instrum. Methods B **210**, 92–97 (2003).
16. Incerti, S., Barberet, Ph., Villeneuve, R., Aguer, P., Gontier, E., Michelet-Habchi, C., Moretto, Ph., Nguyen, D. T., Pouthier, T. and Smith, R. W. *Simulation of cellular irradiation with the CENBG microbeam line using Geant4*. IEEE Trans. Nucl. Sci. **51**, 1395–1401 (2004).
17. Incerti, S. *et al.* *A comparison of ray-tracing software for the design of quadrupole microbeam systems*. Nucl. Instrum. Methods B **231**, 76–85 (2005).
18. Incerti, S., Habchi, C., Moretto, Ph., Olivier, J. and Seznec, H. *Geant4 simulation of the new CENBG micro and nanoprobe facility*. Nucl. Instrum. Methods B **249**, 738–742 (2006).
19. Incerti, S., Zhang, Q., Andersson, F., Moretto, Ph., Grime, G. W., Merchant, M. J., Nguyen, D. T., Habchi, C., Pouthier, T. and Seznec, H. *Monte Carlo simulation of the CENBG microbeam and nanobeam lines with the Geant4 toolkit*. Nucl. Instrum. Methods B **260**, 20–27 (2007).
20. Andersson, F., Barberet, Ph., Incerti, S., Moretto, Ph., Seznec, H. and Simon, M. *A detailed ray-tracing simulation of the high resolution microbeam at the AIFIRA facility*. Nucl. Instrum. Methods B **266**, 1653–1658 (2008).
21. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J. Cell Biol. **106**, 761–771 (1988).
22. Pouthier, T., Seznec, H., Incerti, S., Boissonnade, O. and Moretto, Ph. *Cellular geometry modelling for Monte Carlo microdosimetry*. Radiat. Res. **166**, 676–677 (2006).
23. Seznec, H., Pouthier, T., Incerti, S., Heiss, M., Barberet, Ph. and Moretto, Ph. *Biological validation of*

- the ion-microbeam developed at CENBG to generate localized ionizing radiation induced-damage on keratinocyte cell line expressing GFP-tagged protein. *Radiat. Res.* **166**, 673–674 (2006).
24. Kanda, T., Sullivan, K. F. and Wahl, G. M. *Histone–GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells.* *Curr. Biol.* **8**, 377–385 (1998).
 25. Mercury[®] Computer Systems, Inc. Available on <http://www.tgs.com/>.
 26. Llabador, Y. and Moretto, Ph. *Applications of Nuclear Microprobes in the Life Sciences: An Efficient Analytical Technique for Research in Biology and Medicine* (Singapore: World Scientific Publishing Company) (1998).
 27. Devès, G. and Ortega, R. *Subcellular mass determination by $^4\text{He}^+$ energy-loss micro-spectrometry.* *Anal. Bioanal. Chem.* **374**, 390–394 (2002).
 28. Moretto, Ph. and Razafindrabe, L. *Simulation of RBS spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue.* *Nucl. Instrum. Methods B* **104**, 171–175 (1995).
 29. Maxwell, J. A., Campbell, J. L. and Teesdale, W. J. *The Guelph PIXE software package.* *Nucl. Instrum. Methods B* **43**, 218–230 (1989).
 30. VMware[®]. Available on <http://www.vmware.com/>.
 31. Scientific Linux[®]. Available on <https://www.scientificlinux.org/>.
 32. Geant4 installation files for VMware. Available on <http://geant4.in2p3.fr/cenbg/vmware.html>, courtesy of C. Seznec, CENBG.
 33. The ROOT object-oriented data analysis framework. Available on <http://root.cern.ch/>.
 34. Saitoh, A., Kimura, A., Tanaka, S. and Sasaki, T. *gMocren: high-quality volume visualization tool for Geant4 simulation.* In: Nuclear Science Symposium Conference Record, 2007, Hawaii, USA, NSS '07, 26 October to 3 November, Vol. 1 (Hawaii, USA: IEEE Publication) pp 888–891 (2007).
 35. International Associated Laboratory CNRS-KEK-CEA France-Japan Particle Physics Laboratory (FJPPL). Available on <http://fjppl.in2p3.fr>.
 36. Chauvie, S., Francis, Z., Guatelli, S., Incerti, S., Mascialino, B., Moretto, Ph., Nieminen, P. and Pia, M. G. *Geant4 physics processes for microdosimetry simulation: design foundation and implementation of the first set of models.* *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **54**(2–6), 2619–2628 (2007).
 37. Chauvie, S., Incerti, S., Moretto, Ph., Pia, M. G. and Seznec, H. *Microdosimetry in high-resolution cellular phantoms using the very low energy electromagnetic extension of the Geant4 toolkit.* In: Nuclear Science Symposium Conference Record, 2007, Hawaii, USA, NSS '07, 26 October to 3 November, Vol. 3 (Hawaii, USA: IEEE) pp. 2086–2088 (2007).
 38. Badal, A., Kyprianou, I., Badano, A. and Sempau, J. *Monte Carlo simulation of a realistic anatomical phantom described by triangle meshes: application to prostate brachytherapy imaging.* *Radiother. Oncol.* **86**, 99–103 (2008).
 39. Barbotteau, Y. Available on <http://biopixe.free.fr>.