



HAL
open science

Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique

Sarah Triboulet

► **To cite this version:**

Sarah Triboulet. Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV021 . tel-01124157

HAL Id: tel-01124157

<https://theses.hal.science/tel-01124157>

Submitted on 6 Mar 2015

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Sarah TRIBOULET

Thèse dirigée par le **Dr Thierry RABILLOUD**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
(CEA Grenoble / DSV / iRTSV)

dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique

Thèse soutenue publiquement le **11 Octobre 2013**,
devant le jury composé de :

M. Jean-Jacques DIAZ

DR2 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie Lyon-Est, Rapporteur

M. Aleksander Edelman

PR Université Paris 5 René Descartes, Rapporteur

Mme Sophie Lanone

CR1 INSERM, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, Membre

M. Thierry RABILLOUD

DR CNRS, Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, CEA Grenoble, Membre

M. Michel SEVE

PR Université de Grenoble, Président

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



*A mes amis, Laurent et Gabriel,
et à tous ceux qui, comme eux,
sont partis bien trop tôt.*

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Thierry Rabilloud, pour avoir accepté de m'accueillir dès le stage de Master 2, et m'avoir permis ainsi d'entrer dans le monde de la recherche, et dans celui de la protéomique. Un immense merci pour son encadrement, ses conseils avisés, et sa bonne humeur au cours de ces trois années et demie passées au sein de son équipe. Merci pour tout ce que j'ai appris à ses côtés, mais également pour sa présence et son soutien dans certains moments difficiles, sans lesquels je ne serais peut-être pas allée jusqu'au bout... Enfin, un grand merci pour m'avoir aussi aiguillée pour l'étape suivante de mon parcours. Merci pour tout.

Je remercie également le Dr Jérôme Lemoine et le Dr Jean-Jacques Diaz, membres de mon Comité de Suivi de Thèse, pour leurs conseils, leurs encouragements, et les discussions riches lors de nos rencontres.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, le Dr Jean-Jacques Diaz et le Pr Aleksander Edelman, pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, le Dr Sophie Lanone, pour avoir accepté de venir examiner mes travaux, et le Pr Michel Sève, pour avoir accepté de présider ce jury.

Un grand merci à toute l'équipe du LSMBO à Strasbourg, et en particulier à Hélène Diemer et Jean-Marc Strub, pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse, et leur bon vivant lors de ma formation à la spectrométrie de masse.

Merci également à tous les membres du bâtiment K du CEA de Grenoble, anciens et nouveaux, que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse. En particulier, merci à Anne-Noëlle Petit ainsi qu'à Caroline Pecqueur, pour leur aide sur certaines parties expérimentales et leur sympathie lors de mes longues journées de mesures DLS sur les nanos...

Un grand merci également à Marie Carrière, pour son aide sur la partie « nano », ses conseils pour la suite, sa bonne humeur permanente, et sa gentillesse, ainsi qu'aux membres de son équipe pour m'avoir aidée à réaliser certaines expériences de dernière minute...

Un très grand merci à Claude Senebier pour son efficacité dans les démarches administratives, pas toujours simples, que le CEA et la fac nous imposent... Et surtout merci pour sa gentillesse, ses encouragements, et son sourire à toute épreuve.

Un immense merci à tous les membres de mon équipe, avec qui j'ai passé trois années très riches, sur tous les plans...

Merci à Mireille Chevallet, pour m'avoir encadrée à mes débuts en protéomique, à Véronique Collin-Faure, pour m'avoir décerné mon diplôme officiel d'autonomie au FACS, à Serge Candéias et Isabelle Testard, pour leurs conseils et leur sympathie au quotidien.

Un grand merci à Catherine Aude-Garcia, pour son aide précieuse pour certaines manips, mais surtout pour sa gentillesse et ses encouragements au quotidien, surtout à la fin, mais aussi pour son humour et son petit « côté direct », sans oublier bien sûr nos sorties piscine (il va falloir s'y remettre d'ailleurs !... 😊).

Merci à Cécile Lelong, pour son soutien au moment où je croyais ne pas avoir de financement, puis dans les moments difficiles du début de thèse... Merci pour ses conseils et son soutien tout au long de mon travail, pour son humour et sa bonne humeur. Sans oublier bien sûr, nos fréquentes discussions sur les enfants et les irlandais, les soirées raclettes aux 1000 fromages, et les pauses « chocolat-post-prandial »... 😊!

Un très grand merci à Marie-Pierre Mendez, qui a fait mon tout premier dossier d'entrée au CEA, et à Sylvie Luche, à qui je dois de bons fous-rires dans notre bureau... Que dire, si ce n'est que, quand on dit que les gens avec qui on n'a pas d'affinités au début finissent parfois par devenir de grandes amitiés... Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour les soirées « pataterie, ruby et ouistitis », pour les conseils et les expériences partagées (et pas seulement sur les enfants, heureusement pour moi... !), pour les encouragements et le soutien dans les moments difficiles..., bref, merci d'avoir été là, tout simplement...

Une thèse, ce n'est pas toujours facile, mais ça l'est un peu plus quand on n'est pas toute seule dans la même galère... Alors un immense merci également à tous les jeunes de l'équipe « Pseudo », qui ont partagé cette expérience avec moi. En particulier, un très grand merci à Guille, Mayebine et Caro, toujours là depuis le début, ainsi qu'à Valentina, Carinne (alias « Tweety » pour les intimes 😊), et tous les autres stagiaires, thésards et post-docs de leur groupe que j'ai eu l'occasion de rencontrer. Merci pour toutes les sorties « découverte resto », les « glace party » et sorties ciné décidées sur le tas en fin de journée, les soirées au Loco, et tous les bons moments et les fous-rires qui allaient avec... on sait désormais qu'il ne nous reste plus qu'à aller « toujours devant » (n'est-ce pas Mayebine 😊) !!!

Un grand merci également à tous mes amis, anciens ou moins anciens, pour m'avoir entourée pendant ces trois années, dans les bons et les mauvais moments, et m'avoir permis de tenir jusqu'au bout. Un remerciement particulier à Andrea et Elisa, pour les sorties « Bastille » et pour la découverte inoubliable de la Hongrie, ainsi qu'à Audrey pour toutes nos soirées « potins et repas japonais » 😊.

Enfin, un grand merci à tous les gens que j'ai croisés au cours de cette expérience inoubliable, au CEA, dans les congrès, ou ailleurs, et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ces trois années.

Pour terminer, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille, pour leurs encouragements réguliers, et surtout mes parents, pour leur soutien permanent pendant cette thèse, mais surtout pour m'avoir toujours poussée à aller plus loin, à ne pas me décourager, et à tout faire pour réaliser mes rêves... Cela n'a pas toujours été facile dans les dix années qui viennent de passer, mais sans vous, je n'en serais peut-être pas là aujourd'hui... Alors merci infiniment à tous les deux.

RESUME

Les nanoparticules (NP) métalliques occupent une place de plus en plus importante, tant dans les procédés industriels que dans la recherche biomédicale. Néanmoins, les données sur leur toxicité potentielle pour les organismes vivants restent insuffisantes, notamment à l'échelle moléculaire. Des exemples historiques montrent que certaines pathologies, comme la silicose et l'asbestose, peuvent être engendrées par l'exposition chronique à des particules inorganiques (silice et fibres d'amiante). Dans les deux cas, la réponse des macrophages alvéolaires est en grande partie responsable de la maladie. Les macrophages sont en effet la première ligne de défense (immunité innée) contre toute attaque exogène, pathogène ou non, du fait de leurs fortes capacités phagocytaires et de leurs propriétés inflammatoires. Ainsi, les objectifs de ces travaux étaient d'étudier les effets de deux types de NP métalliques (Cu/CuO et ZnO) sur deux lignées cellulaires de macrophages murins. Cette étude a été réalisée par une approche protéomique basée sur l'électrophorèse 2D et la spectrométrie de masse, permettant d'accéder de façon reproductible à des données mécanistiques. Les données obtenues ont été validées par plusieurs approches ciblées de biologie cellulaire, sur les lignées ainsi que sur des macrophages primaires. Nos résultats montrent que les deux types de NP engendrent des réponses différentes, bien que leur degré élevé de cytotoxicité soit similaire. Les NP de cuivre induisent un stress oxydant et une réponse mitochondriale intenses, associées à de fortes perturbations de la phagocytose et de la production de certains médiateurs de l'inflammation. Cette toxicité semble être essentiellement liée aux propriétés redox du cuivre, et est spécifique de la forme nanoparticulaire. A l'inverse, le zinc induit des réponses modérées sur les mêmes processus, n'affectant pas *a priori* le rôle immunitaire des macrophages. Cette toxicité n'est pas non plus spécifique des NP, les ions ayant des effets très étendus, liés à leurs interactions avec de nombreuses protéines, perturbant leur fonctionnement normal jusqu'à induire la mort cellulaire. L'ensemble de ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires expliquant la toxicité de ces NP.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles (NPs) are more and more widely used, from industrial processes to biomedical research. However, data on their potential toxicity towards organisms are still lacking, especially regarding molecular mechanisms. It has been proven that some inorganic particles can lead to diseases when tissues are chronically exposed. In the case of pulmonary silicosis and asbestosis, induced by silica particles and asbestos fibers, chronic inflammation through alveolar macrophages is responsible for the disease. Indeed, macrophages are the first defense against exogenous attacks, like pathogens or inorganic compounds, which are eliminated through phagocytosis and inflammatory processes that are part of the innate immune response. Thus, this study aimed at analyzing the molecular effects of both copper- and zinc-based NPs (Cu/CuO and ZnO) on murine macrophages cell lines. To this end, a reproducible proteomic-based approach using 2D electrophoresis and mass spectrometry was used. The proteomic data were validated using targeted approaches on both cell lines and primary macrophages. Our results show that both NPs exert similar high cytotoxicity, but the molecular responses are markedly different. Copper-based NPs strongly induce oxidative stress as well as alterations in mitochondrial metabolism, phagocytosis, and inflammatory mediators' production. These effects seem to be mostly related to the redox properties of copper, and are specific to the NP form. Conversely, zinc induced limited effects on the same processes, thus leading to no significant alterations in macrophages' immune functions. These effects are not NP-specific, since Zn²⁺ ions seem to exert most of them, probably due to their ability to interact with numbers of proteins, slightly altering their normal functions, and eventually leading only to cell death without prior functional alterations. This study allowed us to highlight some molecular mechanisms of both NP's toxicity.

COMMUNICATIONS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Communications écrites :

“Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses”.

Triboulet S., C. Aude-Garcia, M. Carrière, H. Diemer, F. Proamer, A. Habert, M. Chevallet, V. Collin-Faure, J.M. Strub, D. Hanau, A. Van Dorsselaer, N. Herlin-Boime, T. Rabilloud (2013).

Publication récemment revue et soumise auprès du journal *Molecular and Cellular Proteomics* (Annexe 1).

Communications affichées :

“Effects of copper nanoparticles on murine macrophages”. (Annexe 2)

S. Triboulet^{1,*}, C. Aude-Garcia¹, V. Collin-Faure¹, D. Diallo¹, H. Diemer², A. Van Dorsselaer², T. Rabilloud¹.

¹CEA/DSV/iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-UJF-CEA 5249, Grenoble, ²IPHC, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR CNRS-Université de Strasbourg 7178, Strasbourg, France.

Affiche présentée lors de deux congrès :

- HUPO 2011, Genève, Suisse, 4-7 Septembre 2011,
- SMAP 2011, Avignon, France, 18-22 Septembre 2011.

“Effects of metal-based nanoparticles on murine macrophages”. (Annexe 3)

S. Triboulet^{1,*}, C. Aude-Garcia¹, V. Collin-Faure¹, D. Diallo¹, H. Diemer², A. Van Dorsselaer², T. Rabilloud¹.

¹CEA/DSV/iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-UJF-CEA 5249, Grenoble, ²IPHC, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR CNRS-Université de Strasbourg 7178, Strasbourg, France.

Affiche présentée à l'Ecole Européenne d'Eté en Protéomique (6th European Summer School in Proteomics), Brixen/Bressanone, Italie, 19-25 Août 2012.

Communications orales :

“Effets des nanoparticules métalliques sur des macrophages murins : analyses protéomiques”.

Présentation lors des 9èmes Journées du Club-Jeunes de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (cjSFEAP), Strasbourg, France, 29-31 Mai 2013.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	13
TABLE DES TABLEAUX	17
TABLE DES ABBREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION GENERALE	23
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES MACROPHAGES	29
1.1. <i>La réponse immunitaire</i>	29
1.2. <i>Le rôle central des macrophages</i>	37
1.3. <i>Macrophages et particules</i>	54
2. LES NANOMATERIAUX : ENJEUX ET PROPRIETES	57
2.1. <i>Les nanotechnologies : contexte économique et juridique</i>	57
2.2. <i>Définitions</i>	61
2.3. <i>Les nanoparticules : propriétés et applications</i>	62
2.4. <i>Les nanoparticules étudiées dans ces travaux</i>	64
3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE « RISQUE NANO ».....	69
3.1. <i>Nanotoxicologie et éconanotoxicologie</i>	69
3.2. <i>Modes et voies d'exposition</i>	70
3.3. <i>Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur toxicité</i>	72
3.4. <i>Caractérisation des paramètres physico-chimiques des NPs</i>	77
3.5. <i>Toxicité des NPs in vivo et in vitro</i>	80
3.6. <i>Toxicité des nanoparticules étudiées</i>	85
4. L'APPROCHE PROTEOMIQUE	91
4.1. <i>Définitions et stratégies</i>	91
4.2. <i>Préparation de l'échantillon protéique</i>	94
4.3. <i>Séparation des protéines ou des peptides</i>	96
4.4. <i>Spectrométrie de masse</i>	100
4.5. <i>Choix d'une approche protéomique en toxicologie des nanoparticules</i>	116
MATERIELS ET METHODES	119
1. LES NANOPARTICULES	121
1.1. <i>Caractéristiques et mise en suspension des NP</i>	121
1.2. <i>Caractérisation par DLS</i>	122
1.3. <i>Microscopie électronique</i>	123
1.4. <i>Mesure de la dissolution des NP dans les milieux de culture</i>	125
2. MODELES CELLULAIRES ET TESTS DE VIABILITE	127
2.1. <i>Culture des lignées RAW 264.7 et J774A.1</i>	127
2.2. <i>Mise en culture primaire de macrophages de souris</i>	128
2.3. <i>Tests de viabilité par exclusion de colorant</i>	129
3. ANALYSE PROTEOMIQUE	131
3.1. <i>Traitement des cellules et préparation des échantillons</i>	131
3.2. <i>Electrophorèse bidimensionnelle</i>	132
3.3. <i>Analyse d'images</i>	134
3.4. <i>Identification des protéines par spectrométrie de masse</i>	135

4.	ANALYSES FONCTIONNELLES COMPLEMENTAIRES	139
4.1.	<i>Cytométrie en flux</i>	139
4.2.	<i>Dosage du NO sécrété par les cellules</i>	144
4.3.	<i>Dosage enzymatique du pyruvate</i>	145
RESULTATS ET DISCUSSION		147
1.	EFFETS DES NANOPARTICULES DE CUIVRE ET D'OXYDE DE CUIVRE.....	149
1.1.	<i>Préparation et caractérisation des nanoparticules de Cu et CuO</i>	149
1.2.	<i>Evaluation de la cytotoxicité sur les lignées RAW264.7 et J774A.1</i>	155
1.3.	<i>Analyse protéomique sur les lignées cellulaires</i>	158
1.4.	<i>Validations fonctionnelles sur les lignées cellulaires</i>	175
1.5.	<i>Validation sur des macrophages primaires murins</i>	189
1.6.	<i>Bilan sur le cuivre et l'oxyde de cuivre</i>	200
2.	EFFETS DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC.....	201
2.1.	<i>Préparation et caractérisation des nanoparticules de ZnO</i>	201
2.2.	<i>Evaluation de la cytotoxicité sur les lignées RAW264.7 et J774A.1</i>	208
2.3.	<i>Analyse protéomique sur la lignée RAW 264.7</i>	212
2.4.	<i>Validations fonctionnelles sur les lignées cellulaires</i>	230
2.5.	<i>Validation sur des macrophages primaires murins</i>	242
2.6.	<i>Bilan sur l'oxyde de zinc</i>	251
DISCUSSION GENERALE.....		253
1.	NANOPARTICULES ET CYTOTOXICITE	255
1.1.	<i>Dispersion et caractérisation</i>	255
1.2.	<i>Cytotoxicité du cuivre et du zinc</i>	257
2.	ANALYSE PROTEOMIQUE : COMPARAISON DES EFFETS DU CUIVRE ET DU ZINC	259
2.1.	<i>Analyse globale</i>	259
2.2.	<i>Réponse générale des cellules au stress</i>	263
2.3.	<i>Réponse au stress oxydant</i>	264
2.4.	<i>Réponse mitochondriale</i>	265
2.5.	<i>Effets sur le cytosquelette et le trafic intracellulaire</i>	266
2.6.	<i>Effets sur les voies de dégradation protéique</i>	267
2.7.	<i>Autres effets observés</i>	268
2.8.	<i>Bilan de l'analyse protéomique comparative</i>	269
3.	VALIDATIONS FONCTIONNELLES : EFFETS COMPARES DU CUIVRE ET DU ZINC	271
3.1.	<i>Effets sur la capacité phagocytaire des macrophages</i>	271
3.2.	<i>Effets sur le métabolisme du glutathion</i>	272
3.3.	<i>Effets sur le potentiel transmembranaire mitochondrial</i>	274
3.4.	<i>Effets sur la capacité de production du NO</i>	275
3.5.	<i>Effets sur la production de pyruvate</i>	276
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....		277
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		283
ANNEXES		301
ANNEXE 1 : MANUSCRIT DE LA PUBLICATION « EFFETS DU CUIVRE SUR LA LIGNEE RAW 264.7 »		303
ANNEXE 2 : POSTER DES CONGRES HUPO ET SMAP 2011.....		337
ANNEXE 3 : POSTER DE L'ECOLE D'ETE EN PROTEOMIQUE 2012		339

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse (adapté de Hayden, M.S., and Ghosh, S., 2011).....	30
Figure 2 : Reconnaissance des signaux de danger par les cellules du système immunitaire inné (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).	31
Figure 3 : Mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection (adapté d'après Mills, K.H.G., 2004)...	34
Figure 4 : Le réarrangement des gènes V-D-J codant pour les chaînes des récepteurs lymphocytaires (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).....	36
Figure 5 : Activation et régulation des cellules T CD4+ naïves (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).....	37
Figure 6 : Ilya Ilyich Mechnikov (gauche) découvre des phagocytes essayant d'englober une épine de rose enfoncée dans une larve d'étoile de mer (droite) (d'après Beck, G., and Habicht, G.S., 1996).....	38
Figure 7 : Phagocytose et destruction de bactéries par l'amibe Dictyostelium (d'après Cosson, P., and Soldati, T., 2008).....	39
Figure 8 : Similitudes des mécanismes de défenses innées des Invertébrés et des Vertébrés (d'après Beck, G., and Habicht, G.S., 1996).....	40
Figure 9 : Les différents types de macrophages tissulaires spécifiques (d'après Murray, P.J., and Wynn, T.A., 2011).....	42
Figure 10 : Les différentes populations de macrophages (d'après Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008) .	43
Figure 11 : Activation de la phagocytose via les récepteurs au fragment Fc des IgG (adapté d'après May, R.C, and Machesky, L.M., 2001).....	46
Figure 12 : Modélisation des étapes de la phagocytose (adapté d'après May, R.C, and Machesky, L.M., 2001).....	48
Figure 13 : Voies de signalisation conduisant au burst oxydant (d'après Vrba, J., and Modriansky, M., 2002).	50
Figure 14 : Mécanismes des réponses oxydante et inflammatoire induits par la phagocytose (adapté d'après Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008).	51
Figure 15 : Production de peroxy-nitrite et d'espèces dérivées par les macrophages alvéolaires (d'après Pacher, P., et al., 2007).....	52
Figure 16 : Schéma des principales réactions enzymatiques impliquées dans les défenses anti-oxydantes de l'organisme.	53
Figure 17 : Modélisation de la réaction des macrophages alvéolaires face aux particules de silice et aux fibres d'amiante (d'après Mossman, B.T., and Churg, A., 1998).....	55
Figure 18 : Estimation du marché global des nanotechnologies en 2010 (adapté d'après des données de National Science Foundation (NSF)).....	58
Figure 19 : Evolution du nombre total de produits répertoriés contenant des nanomatériaux depuis 2005, avec analyse par régression linéaire (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), inventaire de mars 2011).	58
Figure 20 : Nombre de produits répertoriés en mars 2011 en fonction du domaine d'application (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN)).	59
Figure 21 : Nombre de produits répertoriés en mars 2011 en fonction de la région de production (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN)).	60

Figure 22 : Principaux matériaux utilisés et nombre de produits associés (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), inventaire de mars 2011).	60
Figure 23 : Evolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des nanomatériaux sur la santé et l'environnement (b) (d'après Grieneisen, M.L., 2010 (a), et Sauer, U.G., et al., 2011 (b)).	69
Figure 24 : Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009 (d'après Kahru, A., and Dubourguier, H-C., 2010).	70
Figure 25 : Distribution possible des NPs dans l'organisme (d'après Casals, E., et al., 2008).	71
Figure 26 : Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau (d'après Valenzuela, P., and Simon, J.A., 2012).	72
Figure 27 : Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille (d'après Petros, R.A., and DeSimone, J.M., 2010).	73
Figure 28 : Charges de surface et potentiel zeta (d'après Wikipédia, Février 2012).	75
Figure 29 : Agrégation et agglomération. (D'après la Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail (CSST), Service du répertoire toxicologique, Noir de Carbone, mars 2006).	76
Figure 30 : Modélisation des causes et des effets du stress oxydant (d'après Kelly, F.J., 2003).	84
Figure 31 : Comparaison de la cytotoxicité des nano- et microparticules de différents oxydes métalliques (d'après Karlsson, H.L., et al., 2009).	86
Figure 32 : Cytotoxicité des NPs de ZnO et contribution de leur dissolution (d'après Kao, Y.-Y., et al., 2012).	89
Figure 33 : De la chenille au papillon : un génome, deux protéomes (d'après Lottspeich, F., 1999).	91
Figure 34 : L'analyse protéomique selon la stratégie « bottom-up » : approche classique, de type « shotgun », ou intermédiaire par GeLC.	94
Figure 35 : Principe schématique de séparation des protéines par électrophorèse 1D (gauche) ou 2D (droite).	97
Figure 36 : Schéma simplifié des principales parties d'un spectromètre de masse.	101
Figure 37 : Principe de l'ionisation par électrospray (ESI).	102
Figure 38 : Principe de l'ionisation MALDI.	103
Figure 39 : Calcul de la résolution spectrale et du pouvoir résolutif en spectrométrie de masse.	105
Figure 40 : Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripôle.	107
Figure 41 : Principe de l'analyseur temps-de-vol (TOF) en mode linéaire.	108
Figure 42 : Principe de l'analyseur TOF en mode réflectron.	109
Figure 43 : Principe de la trappe ionique (IT).	110
Figure 44 : Exemple de résultats obtenus selon l'approche PMF.	112
Figure 45 : Nomenclature des ions issus de la fragmentation MS/MS. Rx : chaînes latérales.	114
Figure 46 : Exemple d'interprétation d'un spectre MS/MS.	115
Figure 47 : Stratégie globale choisie pour l'étude.	117
Figure 48 : Histogrammes de dispersion de tailles obtenus par DLS pour les suspensions CuO-PVP40 diluées dans les milieux de culture cellulaire.	152
Figure 49 : Caractérisation des NP de Cu (gauche) et CuO (droite) par MEB.	153

Figure 50 : Taux de dissolution des NP de CuO après 24h en milieu RPMI conditionné ou non conditionné.	154
Figure 51 : Taux de mortalité cellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1 en présence de NP et d'ions cuivre.	155
Figure 52 : Gels 2D obtenus pour la lignée J774A.1 traitée au cuivre.	166
Figure 53 : Toxicité de différents agents de désorption sur les lignées de macrophages.	176
Figure 54 : Efficacité de 2 agents de désorption.	176
Figure 55 : Effets du cuivre sur la capacité phagocytaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	177
Figure 56 : Effets du cuivre sur le glutathion réduit intracellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	180
Figure 57 : Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	184
Figure 58 : Effets du cuivre sur la production de NO par les lignées RAW 264.7 et J774A.1.	186
Figure 59 : Typage de macrophages primaires à J-0 et à J-10 par cytométrie en flux.	190
Figure 60 : Cytotoxicité du cuivre (NP et ions) sur les macrophages primaires de souris.	191
Figure 61 : Effets du cuivre sur la capacité phagocytaire des macrophages primaires.	192
Figure 62 : Effets du cuivre sur le glutathion réduit intracellulaire des macrophages primaires.	193
Figure 63 : Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des macrophages primaires.	195
Figure 64 : Effets du cuivre sur la production de NO par les macrophages primaires.	197
Figure 65 : Histogrammes de dispersion de tailles des NP de ZnO obtenus par DLS.	204
Figure 66 : Caractérisation des NP de ZnO cationique (haut) et ZnO/H ₂ O (bas) par MET.	205
Figure 67 : Dosage de la fraction dissoute sous forme ionique à partir des NP de ZnO dans le milieu de culture cellulaire.	206
Figure 68 : Taux de mortalité cellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1 en présence de NP et d'ions zinc.	209
Figure 69 : Gels 2D obtenus pour la lignée RAW 264.7 traitée au zinc.	213
Figure 70 : Agrandissements des gels obtenus pour la lignée RAW 264.7 traitée au zinc.	214
Figure 71 : Effets du zinc sur la capacité phagocytaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	231
Figure 72 : Effets du zinc sur le glutathion réduit intracellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	233
Figure 73 : Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des lignées RAW 264.7 et J774A.1.	236
Figure 74 : Effets du zinc sur la production de NO par les lignées RAW 264.7 et J774A.1.	238
Figure 75 : Effet du zinc sur la production de pyruvate par la lignée RAW 264.7.	240
Figure 76 : Cytotoxicité du zinc (NP et ions) sur les macrophages primaires de souris.	242
Figure 77 : Effets du zinc sur la capacité phagocytaire des macrophages primaires.	244
Figure 78 : Effets du zinc sur le glutathion réduit intracellulaire des macrophages primaires.	245
Figure 79 : Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des macrophages primaires.	246
Figure 80 : Effets du zinc sur la production de NO par les macrophages primaires.	248
Figure 81 : Effet du zinc sur la production de pyruvate par les macrophages primaires.	249

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Nombre de gènes codant pour les chaînes des TCR. (D'après Hodges, E., 2003).	35
Tableau II : Principaux marqueurs des différentes populations de macrophages, leurs fonctions et conditions d'activation (d'après Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008).	44
Tableau III : Principaux nanomatériaux produits et utilisations courantes ou proposées (d'après Shaw, B.J., and Handy, R.D., 2011).	63
Tableau IV : Principales nanoparticules utilisées en tant qu'additifs alimentaires (adapté d'après Casals, E., et al., 2008).	64
Tableau V : Comparaison des performances des analyseurs les plus couramment utilisés.	106
Tableau VI : Principales caractéristiques des NP choisies (obtenues d'après le fournisseur).	121
Tableau VII : Diamètres maximaux obtenus par DLS pour les NP de Cu et CuO en suspension, en présence de différents agents stabilisateurs (AS).	150
Tableau VIII : Analyse par DLS des caractéristiques des NP dispersées dans les milieux de culture.	152
Tableau IX : Identification des protéines de la lignée J774A.1 affectées par les NP ou les ions cuivre.	168
Tableau X : Diamètres maximaux des NP de ZnO mesurés par DLS en eau ou en milieu de culture, en présence de différents agents de dispersion.	202
Tableau XI : Identification des protéines de la lignée RAW 264.7 affectées par les NP ou les ions zinc.	216
Tableau XII : Protéines modifiées de façon commune par le cuivre et le zinc.	262

TABLE DES ABBREVIATIONS

1D/2D: électrophorèse mono-/bidimensionnelle
2D-DIGE : *two dimensional differential gel electrophoresis*
6-PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase
ADF : *actin-depolymerizing family*
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire, de l'Environnement et du Travail
ALDH : aldéhyde déshydrogénase
AP-1 : *activator protein-1*
APS : ammonium persulfate
ARF : *ADP-ribosylation factor*
BEGM : milieu *bronchial epithelial growth medium* (sans sérum)
BM 10/20 : milieu *bone marrow* (DMEM complet contenant 10/20 % de surnageant L929)
BN-PAGE : *blue native polyacrylamide gel electrophoresis*
BSA : *bovine serum albumin*
CAT : catalase
CD : clusters de différenciation
CEDEF : Centre de Documentation Economie-Finances (Ministère de l'Economie et des Finances)
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CMH I/II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CR : *complement receptor*
DAMP : *damage-associated molecular patterns*
DC : *dendritic cell*
DEM : diéthylmaléate
DHAP : dihydroxyacétophénone
DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DLS : *dynamic light scattering*
DMEM (milieu) : milieu *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*
DTT : dithiothréitol
ENO-1 : émolase 1 (α -émolase)
ERK : *extracellular-regulated kinase*
ESI : *electrospray ionization*
FACS : *fluorescence-activated cell sorting*
Fc / Fc x R : fragment constant des Ig / récepteur au fragment Fc des Ig x
FITC : *fluorescein isothiocyanate*
FSC : *Forward Scatter*
FT-ICR : résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (*ion cyclotron resonance*)
FWHM : largeur du pic à mi-hauteur (*full width at half maximum*)
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GCLM : glutamate-cystéine ligase (sous-unité régulatrice)
GM-CSF : *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*
GPx : glutathion peroxydase
GRd : glutathion réductase
GSH/GSSG : glutathion (forme réduite/oxydée)
GST : glutathion S-transférase
HCCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HO : hème oxygénase
HSP : *heat shock protein*
ICP-MS : *inductively coupled plasma mass spectrometry*
IEF : isoélectrofocalisation
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL / IL-1ra : interleukine / *interleukin 1 receptor antagonist*
IRM : imagerie par résonance magnétique
IT : analyseur trappe ionique (*ion trap*)
ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
JNK : *c-jun-NH₂-terminal kinase*
LAL : *Limulus Amebocyte Lysate*
LC : *liquid chromatography*
LDH : lactate déshydrogénase
LPS : lipopolysaccharide
MALDI : *matrix-assisted laser desorption ionization*
MALLS : *multi-angle laser light scattering*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MCB : monochlorobimane
M-CSF : *macrophage colony stimulating factor*
MDH : malate déshydrogénase
MDLC : *multidimensional liquid chromatography*
MEB : microscopie électronique à balayage
MES : acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique
MET : microscopie électronique à transmission
MIP : *macrophage inflammatory protein*
MoFlo : *Modular Flow*
MS (MS/MS) : spectrométrie de masse (en tandem)
NAD(P)⁺/ NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme oxydée/forme réduite)
NCF-4 : *neutrophil cytosol factor 4*
NF κ B : *nuclear factor kappa B*
NK : lymphocyte *natural killer*
NO / NOS : *nitric oxide / nitric oxide synthase*
NP : nanoparticule
PAF : *platelet-activating factor*
PAMP : *pathogen associated molecular pattern*

PBS : *phosphate buffered saline*
Pd : polydispersité
PE : phycoérythrine
PEG : polyethylene glycol
PGK : phosphoglycérate kinase
PI3-K : *phosphatidylinositol 3-kinase*
PKM : pyruvate kinase (isoformes M)
PKC : protéine kinase C
PMF : *peptide mass fingerprint*
PRR : *pattern-recognition receptor*
Prx : peroxyrédoxine
PVP40 : polyvinylpyrrolidone 40
Q ou QUAD : analyseur quadripôle
Rho-GDI : *Rho GDP-dissociation inhibitor*
RNS / ROS : *reactive nitrogen species / reactive oxygen species*
RPE : résonance paramagnétique électronique
RPMI (milieu) : milieu *Roswell Park Memorial Institute medium*
SA : *sinapinic acid*
SAXS : *small-angle X-ray scattering*
SDS : sodium dodecylsulfate
SOD : *superoxide dismutase*
SSC : *Side SCatter*
SVF : sérum de veau fœtal
TCA : *trichloroacetic acid*
TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCR (ou TR) : *T-cell receptor*
TEMED : tétraméthyléthylènediamine
TGF : *tumor growth factor*
TH : lymphocyte T *helper*
TLR : *Toll-like receptor*
TNF : *tumor necrosis factor*
TOF / TOF-SIMS : *time-of-flight* (analyseur temps-de-vol) / *time-of-flight – secondary ion mass spectrometry*
TPI : triosephosphate isomérase
TR : lymphocyte T régulateur
TRAP : analyseur à trappe ionique
USD (eau) : eau ultrapure stérile dégazée
UV : ultra-violet
XPS : *X-ray photoelectron spectroscopy*
XRD : *large-angle X-ray diffraction*
XRF : *X-ray fluorescence*

INTRODUCTION

GENERALE

Le développement des nanomatériaux et leur emploi à l'échelle industrielle sont en plein essor depuis une dizaine d'années. En effet, les propriétés physico-chimiques de ces matériaux permettent leur utilisation pour des applications variées, allant de la fabrication de produits alimentaires ou cosmétiques, au développement d'outils pour l'électronique ou encore les sciences biomédicales. Parmi ces matériaux, les nanoparticules de métaux et d'oxydes métalliques suscitent de plus en plus d'intérêt. Ainsi, les nanoparticules d'argent (Ag), de cuivre (Cu) et d'oxyde de cuivre (CuO) sont fréquemment utilisées pour leur caractère bactéricide, tandis que les propriétés paramagnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3) permettent leur utilisation dans le domaine de l'imagerie médicale. Les particules de dioxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO) trouvent quant à elles une application dans la fabrication d'écrans solaires, du fait notamment de leurs propriétés d'absorption des rayons UV.

Cependant, l'utilisation croissante de ce type de matériaux soulève aujourd'hui des questions de santé publique. En effet, les interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques, et leur toxicité potentielle, sont à l'heure actuelle mal connues. Le risque sanitaire associé reste de ce fait difficile à évaluer. De plus, l'utilisation industrielle de nanoparticules entraîne également la production de déchets dont la libération dans l'environnement pourrait s'avérer difficile à contrôler, et dont les conséquences sont pour l'instant mal connues.

Des études de plus en plus nombreuses sont ainsi réalisées afin de mieux comprendre et mieux maîtriser les propriétés, le comportement et les risques liés aux nanoparticules. Celles-ci visent notamment à évaluer la toxicité de nanoparticules de nature variée sur différents modèles *in vivo* ou *in vitro*. La majorité des études réalisées *in vitro* se limitent cependant à des données qualitatives, démontrant que la plupart des nanoparticules métalliques induisent une augmentation du taux de mortalité cellulaire, associée principalement à des dommages à l'ADN, et à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Mais les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité des nanoparticules métalliques restent à élucider.

Par ailleurs, malgré le nombre grandissant de travaux sur la toxicité des nanoparticules, il reste difficile de statuer de façon définitive sur celle-ci du fait de l'importante diversité non seulement des modèles d'études mais aussi des procédés utilisés pour la production des nanoparticules, des modes d'exposition des cellules ou de l'organisme, ou encore de l'analyse des données. Il apparaît ici important que le choix de ces différents paramètres soit adapté au type de nanoparticules étudié, notamment à leur nature chimique, aux conditions d'exposition possibles et aux cellules cibles envisagées. Par exemple, des nanoparticules susceptibles d'être libérées sous forme de nanopoudres dans l'air ambiant nécessiteront préférentiellement des études toxicologiques sur des modèles cellulaires de l'appareil respiratoire ou de la peau.

Compte tenu de tous ces éléments, les travaux présentés ici ont été réalisés sur un modèle cellulaire de type macrophage, essentiel dans les défenses innées de l'organisme. Ce choix s'explique tout d'abord par la

présence de ce type cellulaire dans de nombreux tissus au sein des organismes vivants, notamment au niveau des systèmes respiratoire et digestif et de la peau, zones privilégiées d'exposition aux nanoparticules métalliques présentes dans les cosmétiques, produits alimentaires, ou encore dans l'air ambiant. Leur localisation et leurs fonctions spécifiques confèrent aux macrophages un rôle clé dans la défense de l'organisme contre toute attaque par un agent pathogène ou un corps étranger. En particulier, leur forte capacité phagocytaire permet l'internalisation puis la dégradation des pathogènes. Dans ce cas, les produits de dégradation, associés aux multiples médiateurs sécrétés par les macrophages constituent par la suite des signaux de communication intercellulaires conduisant au recrutement d'autres effecteurs de l'immunité, avec pour objectif ultime la mise en place de la réponse immunitaire, associée ou non à une réaction inflammatoire.

Au cours des dernières décennies, plusieurs exemples de pathologies résultant de l'exposition des macrophages tissulaires à des éléments particuliers non pathogènes ont été mis en évidence. A titre d'exemple, l'exposition du système respiratoire aux fibres d'amiante induit une activation permanente des macrophages alvéolaires. Il en résulte un état d'inflammation chronique au niveau des poumons, à l'origine de l'asbestose. Celle-ci est aujourd'hui reconnue comme maladie professionnelle, et peut dans certains cas conduire au développement de cancers. De tels exemples amènent de façon légitime à s'interroger sur les effets potentiels des nanoparticules métalliques sur l'organisme à court, moyen et long terme, la problématique de l'inflammation étant prépondérante, qu'elle soit aiguë ou chronique.

Pour tenter de répondre à ces interrogations, et apporter des éléments supplémentaires concernant l'existence et les mécanismes de la toxicité des nanoparticules métalliques, les travaux présentés ici ont pour objectifs d'étudier les effets de nanoparticules de cuivre (Cu), d'oxyde de cuivre (CuO) et d'oxyde de zinc (ZnO) sur des macrophages murins. Pour cette étude, une approche expérimentale de type protéomique a été choisie. En effet, l'essor important des sciences « -omiques », et notamment de la protéomique, au cours des dernières années, a conduit au développement d'outils de plus en plus performants permettant d'accéder à des données mécanistiques précises. Cependant, la combinaison de tels outils avec les techniques classiques d'études toxicologiques dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux nanoparticules reste peu employée à ce jour. Aussi, les études présentées ici mettent en jeu une approche protéomique globale basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse, et combinée à des approches classiques de biologie cellulaire et moléculaire. Les objectifs de l'étude sont, dans un premier temps, l'analyse globale des variations quantitatives d'expression au sein du protéome total de cellules exposées aux nanoparticules d'intérêt, et dans un second temps, la validation et la corrélation des résultats de l'analyse protéomique avec ceux de tests fonctionnels ciblés, réalisés à la fois sur des lignées cellulaires et sur des cultures primaires de macrophages murins, afin de mettre en évidence les principaux processus cellulaires affectés par les nanoparticules métalliques chez les macrophages.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES MACROPHAGES

1.1. La réponse immunitaire

1.1.1. Généralités

Le système immunitaire est constitué d'un réseau complexe de cellules, tissus et organes dont le rôle est d'assurer la protection de l'organisme. Ces différents constituants sont ainsi capables de mettre en place des mécanismes de défense contre tout élément reconnu comme un danger, qui peut être : (a) exogène, faisant donc partie du « non-soi » (généralement un agent pathogène pouvant être infectieux, mais aussi des agents chimiques ou physiques) ; (b) endogène (cellules nécrosées, tumorales, ou encore infectées par un agent pathogène).

Si l'élément cible est présent en faible quantité, il peut être éliminé rapidement par le système immunitaire. Dans le cas contraire, des mécanismes plus complexes sont mis en place, faisant intervenir un nombre plus large d'effecteurs. On distingue ainsi deux types d'immunité : l'immunité innée, capable de reconnaître de façon non-spécifique et d'éliminer des signaux de danger, et l'immunité adaptative, basée sur la reconnaissance spécifique et l'élimination ciblée de l'agent pathogène ou du type cellulaire endommagé. Les cellules de l'immunité innée et adaptative sont soumises à des mécanismes de régulation très précis, et leur efficacité dépend de leur capacité à reconnaître les cellules cibles (répertoire « mémoire ») (O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

Les cellules du système immunitaire sont toutes issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Figure 1). Deux lignées peuvent être distinguées : la lignée lymphoïde d'une part, à l'origine des lymphocytes B, T (CD8+ et CD4+), et des cellules *natural killer* (NK), et d'autre part la lignée myéloïde, qui conduit à la formation des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), monocytes, macrophages et cellules dendritiques (DCs). La différenciation des progéniteurs de ces types cellulaires est régulée par l'action de facteurs de croissance et de différenciation, associée à celle de

nombreuses interleukines. Une fois différenciées, chaque type cellulaire porte des marqueurs de surface qui lui sont spécifiques.

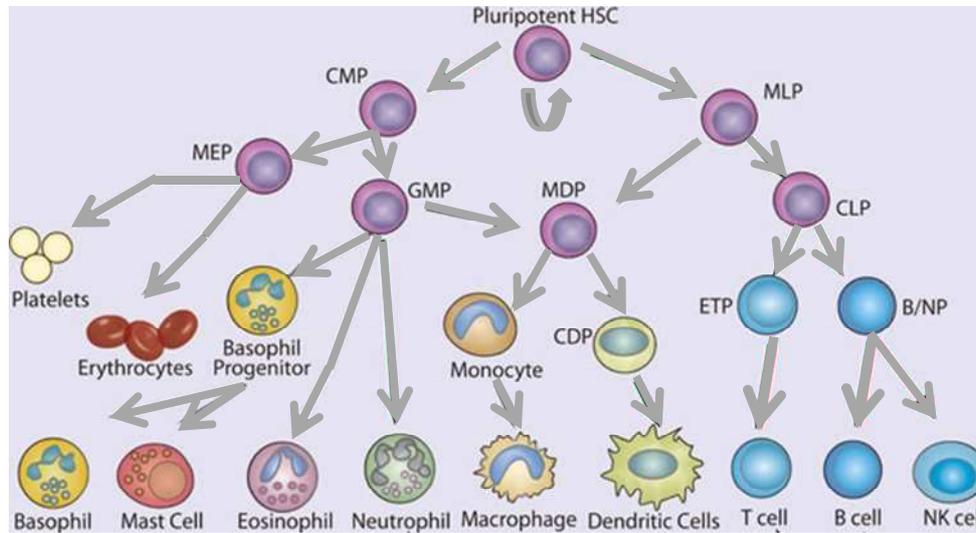


Figure 1 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse (adapté de Hayden, M.S., and Ghosh, S., 2011). HSC, cellule souche hématopoïétique ; CMP, progéniteur myéloïde commun ; MLP, progéniteur myéloïde/lymphoïde ; MEP, progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte ; GMP, progéniteur granulocyte/monocyte ; MDP, progéniteur macrophage/cellule dendritique ; CDP, progéniteur commun des cellules dendritiques ; CLP, progéniteur lymphoïde commun ; ETP, précurseur thymique précoce ; et B/NP, progéniteur cellule B/cellule NK. Les flèches indiquent les voies de différenciation empruntées par les différents progéniteurs. La flèche incurvée symbolise le renouvellement constant des cellules souches hématopoïétiques.

1.1.2. L'immunité innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme, et peut être définie comme étant l'ensemble des dispositifs de défense actifs en permanence et de façon non spécifique. Elle comprend donc tout d'abord les barrières naturelles : ce sont principalement la peau (kératinocytes notamment), les sécrétions, et les muqueuses des appareils respiratoire, digestif et reproducteur (Liaskou, E., *et al.*, 2012). Dès lors que ces premières barrières ont été traversées, les cellules du système immunitaire inné interviennent. Plusieurs types cellulaires sont alors mis en jeu : neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DCs), mastocytes, et lymphocytes « *natural killer* » (NK). Ces cellules portent des récepteurs de surface, appelés *pattern-recognition receptors* (PRRs), dont la diversité leur permet de reconnaître un large panel de motifs associés à des signaux de danger, regroupés sous le nom de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Les PRRs incluent notamment des récepteurs aux sucres

bactériens, et des récepteurs *Toll-like* (TLRs). Les motifs reconnus peuvent être soit des molécules produites et/ou portées par les agents pathogènes, tels que des lipopolysaccharides, lipoprotéines, glycolipides, acides nucléiques viraux ou bactériens... (Figure 2) ; soit des modifications de surface ou des composés produits par des cellules endommagées, tels que les *heat shock* protéines (HSP), le fibrinogène, ou encore des composés portés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) (Lanier, L.L., 2005 ; Akira, S., 2006).

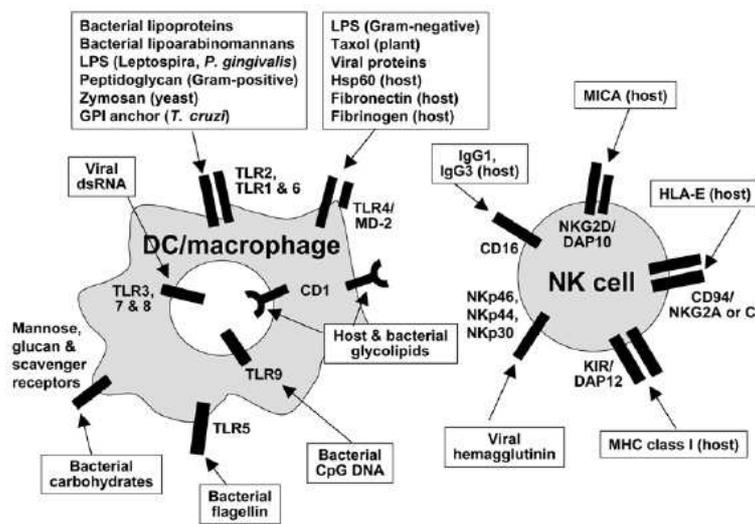


Figure 2 : Reconnaissance des signaux de danger par les cellules du système immunitaire inné (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

L'activation des neutrophiles, macrophages, et DCs conduit à l'élimination ciblée des pathogènes reconnus, par le biais de mécanismes de phagocytose et/ou de la libération de composés cytotoxiques selon le type cellulaire (dégranulation) (Underhill, D.M., 2002 ; Akira, S., 2006). Les cellules NK, quant à elles, sont responsables de la destruction de cellules endogènes nécrosées, infectées ou en cours de transformation tumorale, en induisant notamment l'apoptose. Enfin, l'activation des cellules de l'immunité innée s'accompagne d'un ensemble complexe de réactions intra- et intercellulaires appelé « réponse inflammatoire » ou « réaction inflammatoire ».

1.1.3. La réaction inflammatoire

Il s'agit d'une réponse dynamique au cours de laquelle les cellules acquièrent dans un premier temps un rôle pro-inflammatoire, permettant le recrutement et l'activation d'autres effecteurs et donc l'amplification de la réponse. Puis les cellules évoluent progressivement vers une fonction anti-inflammatoire, assurant alors le contrôle et la résolution de la réaction inflammatoire (O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

La réaction inflammatoire est induite par la production de nombreux messagers chimiques résultant de l'activation des cellules immunitaires ayant reconnu un signal de danger. Leurs interactions permettent dans un premier temps d'amplifier la réponse (action synergique ou additive des médiateurs), puis de la diminuer (action antagoniste). Au cours de la phase d'amplification, les médiateurs produits ont pour rôle majeur de mobiliser d'autres cellules immunitaires, en particulier phagocytaires (neutrophiles, monocytes et macrophages), mais aussi des lymphocytes, et de les amener jusqu'au site de l'infection. Différentes classes de médiateurs interviennent ici :

- des médiateurs produits par les cellules immunitaires activées, et par certains types cellulaires (cellules endothéliales par exemple) : cytokines pro- et anti-inflammatoires, chimiokines, ou autres médiateurs de nature chimique différente (espèces réactives de l'oxygène (ROS), oxyde nitreux (NO)...), dont le rôle est d'induire, amplifier, prolonger puis terminer la réponse (Rogler, G., 1998) ;
- des médiateurs produits par les cellules des tissus lésés : molécules d'adhésion, sérotonine, histamine, médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes), ou encore facteurs d'activation plaquettaire (*platelet-activating factor* PAF), qui stimulent la production en cascade des médiateurs précédents et favorisent les phénomènes de vasodilatation au point d'infection, nécessaires au recrutement croissant des cellules immunitaires (Larsen, G.L., 1983 ; Rogler, G., 1998) ;
- des médiateurs plasmatiques : produits du complément (C3b, C5, opsonines, complexe d'attaque membranaire...) ou facteurs de coagulation, qui contribuent à l'élimination des cellules cibles et à la réparation tissulaire.

La synthèse rapide des cytokines et chimiokines par les cellules stimulées résulte de l'activation de facteurs de transcription spécifiques, tels que le facteur nucléaire NFκB. Les cytokines pro-inflammatoires (*tumor necrosis alpha*, TNF-α ; interleukines IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 ; interférons IFN-α, IFN-β, et IFN-γ...) sont synthétisées dans la phase précoce de l'inflammation, et activent la synthèse et la libération de composés antimicrobiens (ROS, NO...) (Rogler, G., 1998). Elles sont également capables de diffuser à travers les tissus et de passer dans la circulation, et participent ainsi au recrutement, à la différenciation et à l'activation d'autres cellules du système immunitaire inné (production de facteurs tels que le *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*, GM-CSF). Les chimiokines, quant à elles, sont des cytokines chimiotactiques produites essentiellement par les macrophages (*macrophage inflammatory proteins* MIP-1α, MIP-β ; interleukine IL-8...), et dont le rôle essentiel est d'attirer d'autres effecteurs sur le site de l'infection (monocytes, neutrophiles et lymphocytes) (Joyce, S., 2000 ; Mackay, C.R., 2001 ; O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007) (Figure 3). L'amplification de la réponse conduit à l'élimination des cellules cibles par phagocytose ou apoptose (cf. 3.2).

Puis, progressivement, des médiateurs anti-inflammatoires sont sécrétés afin de diminuer l'intensité de la réponse inflammatoire et de favoriser la mise en place des mécanismes de réparation tissulaire (Mills, K.H.G., 2004). Il peut s'agir d'autres cytokines (interleukines IL-4, IL-10, IL-11 ; *transforming growth factor* TGF-β...), d'antagonistes de récepteurs membranaires aux cytokines tels que l'antagoniste au récepteur de l'IL-1 (*interleukin 1 receptor antagonist* IL-1ra), ou encore de formes solubles de récepteurs aux cytokines (Rogler, G., 1998). Ce mécanisme de rétrocontrôle permet notamment de réparer les tissus lésés et d'assurer l'homéostasie tissulaire. L'échec de ce contrôle conduirait en effet à un état d'inflammation chronique, au cours duquel les cytokines pro-inflammatoires seraient sécrétées de façon permanente, provoquant de lourdes altérations des tissus. C'est le cas par exemple dans certaines pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome du colon irritable, ou encore les hépatites chroniques (O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

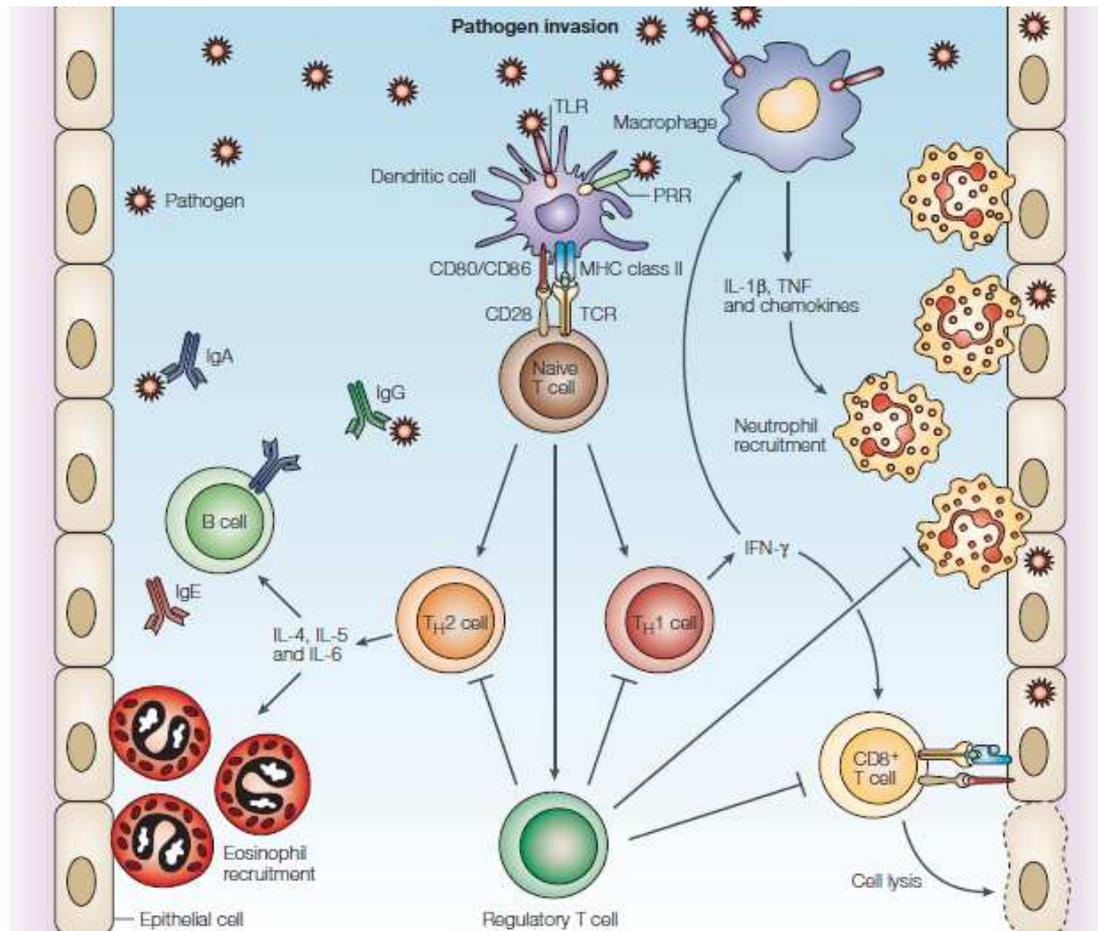


Figure 3 : Mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection (adapté d'après Mills, K.H.G., 2004). La reconnaissance des motifs spécifiques du pathogène par les récepteurs de surface des macrophages et DCs (PRRs, dont les TLRs), active la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, qui recrutent d'autres effecteurs au site de l'infection. Au niveau des organes lymphoïdes périphériques (non représentés ici), les DCs activées présentent des antigènes aux lymphocytes T naïfs, induisant leur différenciation en effecteurs T CD4+, CD8+ ou T régulateurs. Les cellules CD4+ T helper 1 (TH1) sécrètent l'IFN- γ qui stimule l'activité antimicrobienne des macrophages et l'activité cytotoxique des T CD8+ vis-à-vis des cellules infectées ou endommagées, ainsi que la production d'IgG par les lymphocytes B ; les cellules CD4+ TH2 stimulent la production d'IgG, IgA, et IgE et la libération de composés cytotoxiques par les éosinophiles. Les cellules T régulatrices modulent l'action des autres effecteurs, afin d'éviter les dommages tissulaires à l'issue de l'infection.

1.1.4. L'immunité adaptative

L'activation des cellules de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire s'accompagne du recrutement des premiers effecteurs de l'immunité adaptative : les lymphocytes T (Figure 3). Ceux-ci sont naturellement présents sous une forme dite « naïve », c'est-à-dire n'ayant jamais été en présence d'antigènes, et circulent librement entre le sang et les organes lymphoïdes périphériques. Au niveau de ces derniers, ils peuvent être activés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) que sont principalement les DCs, mais aussi les macrophages (Trombetta, E.S., and Mellman, I., 2005). Ces cellules ont en effet la capacité de digérer les protéines de l'agent pathogène reconnu, puis d'en présenter des fragments à leur surface via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le polymorphisme important des molécules du CMH permet ici la présentation d'une grande variété d'antigènes, et donc la reconnaissance spécifique d'un éventail plus large de pathogènes par le système immunitaire (Mills, K.H.G., 2004 ; O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

Les complexes CMH-antigènes sont reconnus par les récepteurs de surface des lymphocytes T (*T-cell receptor* ou TCR), constitués de chaînes polypeptidiques (de type α , β , γ , ou δ) (Hodges, E., 2003). Là encore, l'importante variabilité des gènes codants pour ces chaînes (Tableau I), associée aux multiples réarrangements qui ont lieu au cours de la maturation des chaînes peptidiques (Figure 4), contribuent à augmenter la diversité du répertoire de reconnaissance spécifique des antigènes. Celle-ci pourrait atteindre jusqu'à 10^7 type de récepteurs différents (Nikolich-Zugich, J., et al., 2004).

TCR gene	Chromosome	V segments	D segments	J segments	C segments
α (A)	14q11-12	70	0	61	1
β (B)	7q32-35	67	2	13	2
γ (G)	7p15	14	0	5	2
δ (D)	14q11-12	8	3	4	1

C, constant; D, diversity; J, joining; V, variable.

Tableau I : Nombre de gènes codant pour les chaînes des TCR. (D'après Hodges, E., 2003).

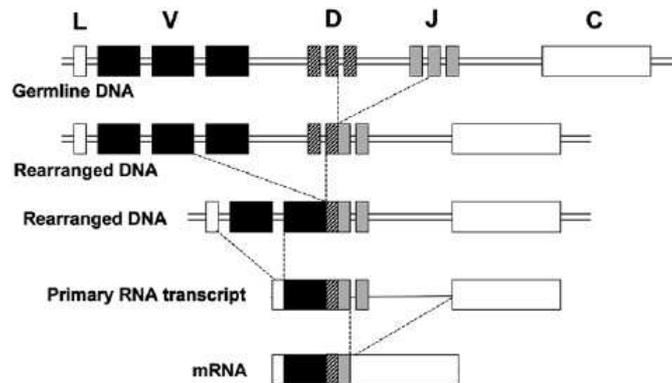


Figure 4 : Le réarrangement des gènes V-D-J codant pour les chaînes des récepteurs lymphocytaires (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007). Le réarrangement concerne tout d'abord les segments D et J, puis les segments V. La transcription de la séquence ADN obtenue conduit à un ARN pré-messager (primaire) qui peut encore être remanié par des mécanismes d'épissage.

La reconnaissance par les TCR induit la maturation des T naïfs en lymphocytes effecteurs, capables de reconnaître différentes catégories de complexes CMH-antigènes selon les marqueurs présents à leur surface (clusters de différenciation, ou CD). Ainsi, des peptides issus de cellules endommagées ou infectées sont le plus souvent présentés par les molécules du CMH de classe I, et reconnus par les lymphocytes T CD8+, ou T cytotoxiques, qui libèrent alors différents composés (interférons, perforines,...), dans le but de promouvoir l'apoptose des cellules cibles (Figure 3). En revanche, les peptides issus d'antigènes exogènes internalisés par les CPA, sont associés préférentiellement au CMH de classe II, reconnu par les lymphocytes T CD4+, ou T *helper* (TH1, TH2, ou TH3), et dont l'activation conduit à : (1) la libération de cytokines afin d'activer d'autres macrophages ou cellules T CD8+ en vue de la destruction des pathogènes ou des cellules altérées (TH1) ; (2) l'activation des lymphocytes B en vue de la production d'immunoglobulines (réponse humorale) (TH2) (Figure 5). Les lymphocytes CD4+ TH3, aussi appelés T régulateurs 1 (TR1), possèdent quant à eux une fonction régulatrice permettant le contrôle de la réponse immunitaire (Mills, K.H.G., 2004 ; O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007).

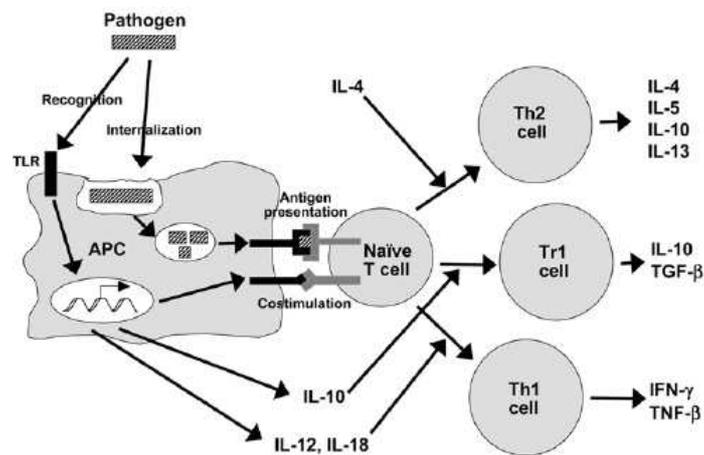


Figure 5 : Activation et régulation des cellules T CD4+ naïves (d'après O'Farrelly, C. and Doherty, D. G., 2007). Les pathogènes sont internalisés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par phagocytose ou endocytose, et dégradés en peptides qui sont associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), puis présentés aux lymphocytes T naïfs. La reconnaissance en parallèle par les TLRs induit la production d'interleukines (IL) et l'expression de molécules de co-stimulation en surface des CPA, qui activent la différenciation des cellules naïves en T helper 1 (TH1) ou T régulateurs 1 (TR1). L'IL-4 produite par d'autres cellules induit leur différenciation en TH2.

L'immunité innée et l'immunité adaptative sont donc en constante interaction, les effecteurs de l'une stimulant ou régulant ceux de l'autre (Trombetta, E.S., and Mellman, I., 2005). Parmi ces effecteurs, les macrophages jouent un rôle crucial lié à la fois à leur localisation disséminée dans l'organisme, et à leurs propriétés physiologiques, notamment la capacité de phagocytose et de production de médiateurs inflammatoires.

1.2. Le rôle central des macrophages

1.2.1. Macrophages et évolution des espèces

L'efficacité des défenses immunitaires des vertébrés supérieurs repose sur une coopération permanente entre l'immunité innée d'une part, qui assure la défense immédiate et non spécifique de l'organisme, et l'immunité adaptative d'autre part, qui permet une protection spécifique et de longue durée grâce au répertoire mémoire. Cependant, l'activation du système immunitaire adaptatif est conditionnée par la présence et l'efficacité en amont du système inné. Ainsi, l'immunité innée est essentielle et indispensable,

et sa conservation au travers de nombreuses classes du règne animal mais aussi du règne végétal, amène à la considérer comme la stratégie de défense la plus ancienne sur le plan de l'évolution des espèces (Kourilsky, P., 2008). En effet, des dispositifs de défense innée sont retrouvés de façon dominante chez de nombreuses espèces d'invertébrés, plantes supérieures, champignons, organismes multicellulaires primitifs..., alors que ces espèces sont souvent dépourvues de systèmes de défense adaptatifs, développés plus tardivement dans l'évolution, avec les vertébrés. Ces mécanismes sont parfois très sophistiqués, et mettent notamment en jeu des systèmes de reconnaissance (via des récepteurs), des molécules antimicrobiennes, ou encore des cascades de signalisation, présentant des homologues avec ceux des vertébrés supérieurs, et dont ils pourraient être les précurseurs (Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M., *et al.*, 2001 ; Kourilsky, P., 2008).

L'intervention d'effecteurs cellulaires est décrite pour la première fois dans les années 1880 par le zoologue et bactériologue russe Ilya Ilyich Mechnikov. Au cours de ses travaux sur les cellules motiles des larves d'étoiles de mer, il met en évidence la présence de cellules tentant d'englober des cellules étrangères, mécanisme nommé « phagocytose » (du grec : « *phagein* », manger, et « *kutos* », cellule) (Figure 6). Bien que le mécanisme en lui-même ait déjà été observé par ailleurs, son implication dans les processus de défense des organismes animaux prend alors toute son importance (Beck, G., *and* Habicht, G.S., 1996).



Figure 6 : Ilya Ilyich Mechnikov (gauche) découvre des phagocytes essayant d'englober une épine de rose enfoncée dans une larve d'étoile de mer (droite) (d'après Beck, G., and Habicht, G.S., 1996).

En 1908, Mechnikov reçoit, avec Paul Ehrlich, le Prix Nobel de Médecine pour la découverte de ces cellules, qu'il nomme « phagocytes », ou encore « macrophages », dont la définition étymologique signifie littéralement « grands mangeurs » (du grec : « *makros* », grand, et « *phagein* », manger). Ses travaux ultérieurs sur les daphnies, puis sur les globules blancs des mammifères, confirment la présence et le rôle majeur des phagocytes dans les défenses immunitaires innées.

Ces découvertes donnent naissance à l'immunologie cellulaire, puis à l'immunologie comparative, discipline qui vise à étudier les systèmes de défenses immunitaires chez différents organismes pour en comprendre les origines et l'évolution (Beck, G., and Habicht, G.S., 1996). Ainsi, l'observation d'organismes eucaryotes primitifs, tels que les amibes, protistes unicellulaires séparés de la branche des métazoaires peu après la division entre règne animal et règne végétal, montre des similitudes avec les phagocytes des vertébrés supérieurs. En particulier, leur comportement suggère qu'elles pourraient être une forme primitive des macrophages « modernes ». Elles sont en effet capables de se déplacer de la même manière vers des organismes étrangers, et de les phagocyter pour en récupérer des éléments nutritifs (Figure 7) (Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M., et al., 2001).

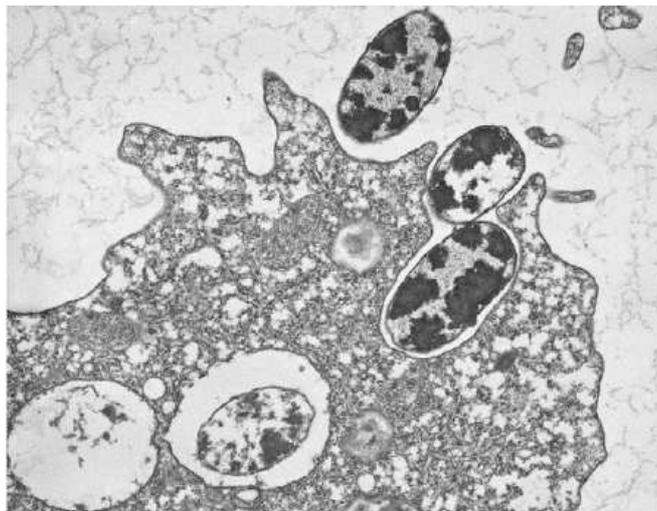


Figure 7 : Phagocytose et destruction de bactéries par l'amibe *Dictyostelium* (d'après Cosson, P., and Soldati, T., 2008).

Ce comportement nécessite cependant la capacité de distinguer les sources de nourriture des autres individus de la population d'amibes, afin de ne pas mettre cette dernière en péril. Ceci fait apparaître les notions de soi et de non-soi, qui sont la base même de l'immunité (Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M., *et al.*, 2001). De plus, les études comparatives montrent une forte conservation des outils et des mécanismes de la phagocytose entre les amibes et les macrophages humains (notamment conservation des protéomes impliqués) (Cosson, P., *and Soldati, T.*, 2008).

Les théories évolutionnistes suggèrent que les amibes auraient pu occuper de façon symbiotique la cavité coelomique d'organismes multicellulaires invertébrés, devenant alors des coelomocytes, et contribuant à leurs défenses immunitaires, grâce à la conservation des mécanismes de phagocytose (Figure 8) (Beck, G., *and Habicht, G.S.*, 1996). La présence des phagocytes a ainsi été démontrée chez de nombreuses espèces du règne animal, y compris des espèces primitives comptant un nombre restreint de types cellulaires différents, ce qui renforce le caractère essentiel des phagocytes.

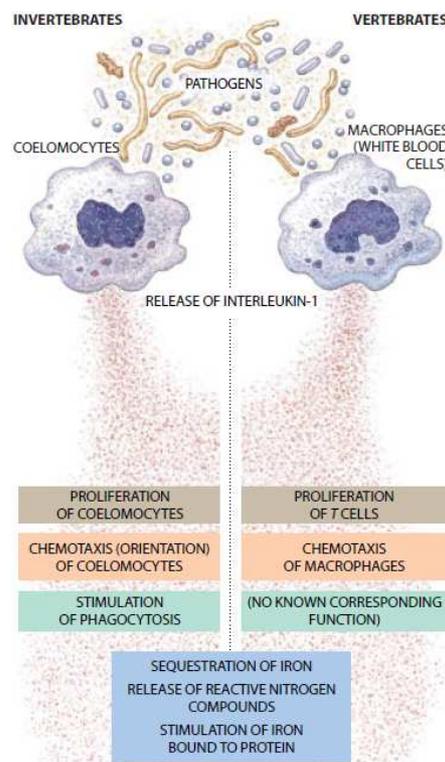


Figure 8 : Similitudes des mécanismes de défenses innées des Invertébrés et des Vertébrés (d'après Beck, G., *and Habicht, G.S.*, 1996).

Le macrophage est donc un type cellulaire parmi les plus anciens et jouant un rôle crucial dans les défenses immunitaires innées grâce à ses fortes capacités de phagocytose extrêmement conservées. L'intégration des phagocytes à des organismes de plus en plus complexes se serait ensuite accompagnée du gain de fonctions supplémentaires à la phagocytose, et notamment de fonctions de communication intercellulaire, mais également de l'apparition ou de la différenciation d'autres types cellulaires capables d'assurer ces fonctions de façon plus ou moins active et efficace, puis plus tard de types cellulaires assurant d'autres fonctions plus spécifiques (immunité adaptative), augmentant ainsi progressivement la complexité du système immunitaire au cours de l'évolution (Beck, G., and Habicht, G.S., 1996).

Ainsi, chez les vertébrés supérieurs, plusieurs types de cellules phagocytaires coexistent. Il convient alors de distinguer les phagocytes professionnels et non professionnels. Les phagocytes professionnels regroupent les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, et dans une moindre mesure les neutrophiles et les mastocytes. Enfin, cette évolution s'est accompagnée d'une spécialisation des phagocytes, à la fois fonctionnelle et tissulaire. Ainsi, les neutrophiles et mastocytes phagocytent peu mais jouent surtout un rôle dans la production de composés cytotoxiques (dégranulation), tandis que les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent tout ce qui est étranger à l'organisme et alertent le système immunitaire. Les monocytes, quant à eux, ont une capacité phagocytaire plus faible, mais circulent dans l'organisme et migrent vers les tissus pour se différencier en macrophages de plusieurs types.

1.2.2. Les macrophages chez les Mammifères

Les macrophages sont présents dans la plupart des tissus de l'organisme. Ils sont issus de la différenciation de monocytes circulants, présents dans le sang périphérique, et eux-mêmes dérivés des précurseurs myéloïdes communs de la moelle osseuse (cf. Figure 1). De façon spontanée ou en réponse à un état d'inflammation, les monocytes migrent depuis la circulation sanguine vers les tissus, où leur différenciation conduit à des formes de macrophages spécifiques (Figure 9). Ainsi, les macrophages sont présents au niveau des os (ostéoclastes), des alvéoles pulmonaires (macrophages alvéolaires), du système nerveux

central (cellules microgliales), des tissus conjonctifs, du tractus gastro-intestinal, du foie (cellules de Kupffer), de la rate, du péritoine (macrophages péritonéaux), de la peau, etc. (Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008 ; Murray, P.J., and Wynn, T.A., 2011).

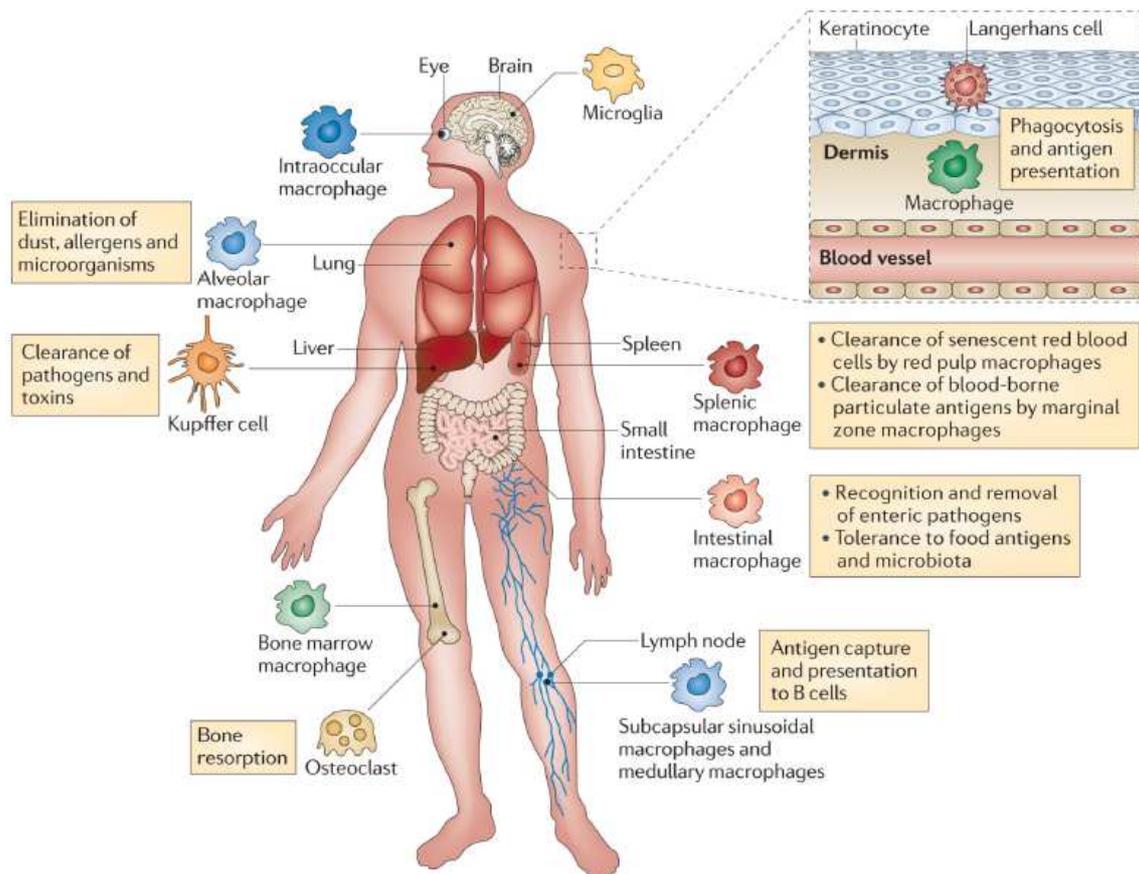


Figure 9 : Les différents types de macrophages tissulaires spécifiques (d'après Murray, P.J., and Wynn, T.A., 2011). Les phagocytes mononucléaires (monocytes) sont issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ils sont libérés dans la circulation et migrent dans la quasi-totalité des tissus, où ils se différencient en macrophages, dont les activités de surveillance immunitaire incluent notamment la phagocytose et la présentation d'antigènes.

En réponse à un stress, une altération tissulaire, ou une infection, les macrophages peuvent être activés par des stimuli endogènes, soit directement (reconnaissance innée de molécules étrangères par exemple), soit indirectement via les signaux produits par d'autres cellules de l'immunité innée (NK, CPA...) ou adaptative (TH1, TH2...), ou encore par d'autres types cellulaires (kératinocytes, cellules endothéliales...) (Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008 ; Murray, P.J., and Wynn, T.A., 2011 ; Liaskou, E., et al., 2012). L'origine et la

nature des signaux sont fonction de l'état d'avancement de la réponse immunitaire (phase d'initiation, d'amplification ou de résolution) (cf. 1.1.), et induisent la maturation des macrophages en différentes sous-populations (Figure 10), caractérisées par des modifications physiologiques et par l'expression de marqueurs spécifiques (Tableau II) :

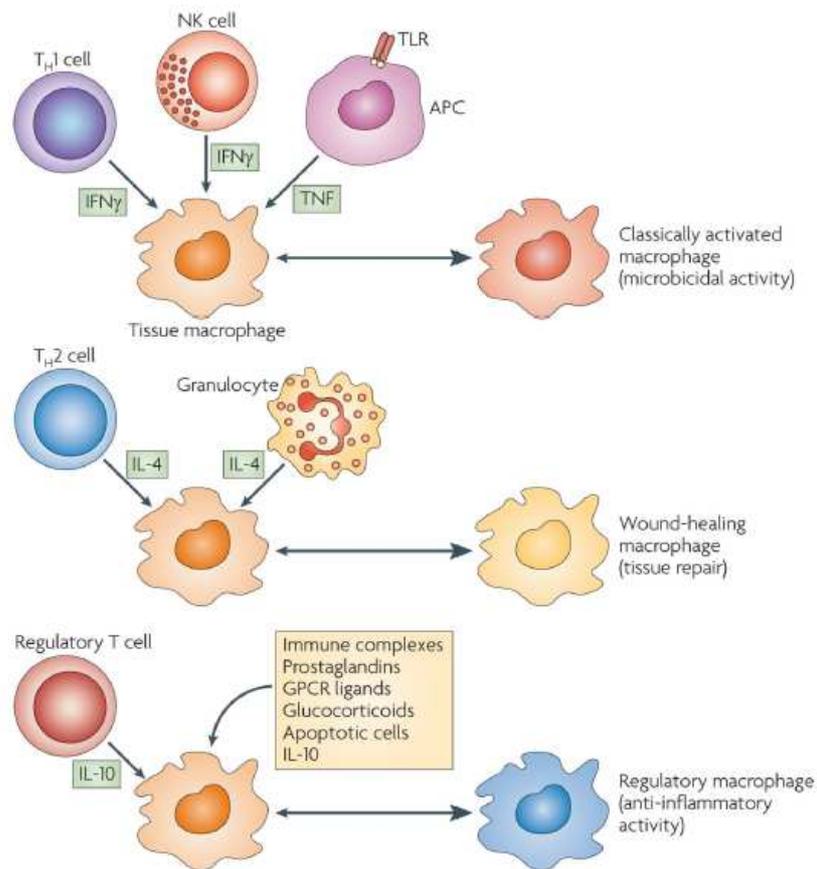


Figure 10 : Les différentes populations de macrophages (d'après Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008). Les macrophages activés par voie dite classique (M1, en haut) présentent une activité antimicrobienne et sont prépondérants lors de l'initiation et de l'amplification de la réponse ; ceux activés par voie dite alternative (M2, au milieu et en bas) participent à la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation. Les macrophages M1 sont donc souvent amenés à évoluer en M2.

- les macrophages activés par voie dite classique ou macrophages M1, dont l'activation est induite par des médiateurs tels que l'IFN- γ , le TNF- α , le LPS..., et stimule leur activité antimicrobienne, traduite par la phagocytose et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires pour entretenir et amplifier la réponse (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α , NO, ROS...);

- les macrophages activés par voie dite alternative, ou macrophages régulateurs, ou encore macrophages M2, activés par des médiateurs tels que l'IL-4 ou l'IL-13, et dont le rôle est de moduler et réduire l'intensité de la réponse grâce à la production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, IL-1ra, fibronectine, TGF- β ...), et de participer à la réparation des tissus lésés (production d'arginase par exemple).

Marker	Function	Expression	Ref.
<i>Classically activated macrophages</i>			
IL-12	Induces T _H 1-cell development	Induced by IFN γ	107
iNOS	Produces NO and citrulline from arginine to kill microorganisms	Depends on IFN γ	108
CCL15	Attracts monocytes, lymphocytes and eosinophils	Upregulated by IFN γ	109
CCL20	Chemoattractant for DC and T cells	Upregulated by IFN γ	109
CXCL9	Involved in T-cell trafficking	Induced by IFN γ	9
CXCL10	Attracts NK and T cells; signals through CXCR3	Induced by IFN γ	9
CXCL11	Attracts NK and T cells; signals through CXCR3	Induced by IFN γ	9
<i>Wound-healing macrophages</i>			
CCL18	Attracts lymphocytes, immature DCs and monocytes	Induced by IL-4	110
YMI	Chitinase-like protein that can bind to extracellular matrix	Strongly induced by IL-4	111
RELM α	Can promote deposition of extracellular matrix	Strongly induced by IL-4	111
CCL17	Attracts T cells and macrophages	Induced by IL-4 and suppressed by IFN γ	112
IL-27R α	Inhibits pro-inflammatory cytokine production	Upregulated by IL-4	113
IGF1	Stimulates fibroblast proliferation and survival	Induced by IL-4	114
CCL22	Attracts T _H 2 cells and other CCR4-expressing cells	Induced by IL-4	115
DCIR	C-type lectin containing an ITIM motif	Induced by IL-4	109
Stabilin 1	Endocytic receptor that may be involved in lysosomal sorting	Induced by IL-4	116
Factor XIII-A	Can bind to extracellular matrix proteins and contribute to wound healing	Induced by IL-4 and suppressed by IFN γ	117
<i>Regulatory macrophages</i>			
IL-10	Potent anti-inflammatory cytokine	Induced by TLRs in combination with other stimuli	61
SPHK1	Catalyses the conversion of sphingosine to sphingosine-1 phosphate	Induced by TLRs and immune complexes	10
LIGHT	Provides co-stimulatory signals for T cells through HVEM	Induced by TLRs and immune complexes	10
CCL1	Attracts eosinophils and T _H 2 cells; binds CCR8	Induced by TLRs in combination with several other stimuli	118

CCL, CC-chemokine ligand; CCR8, CC-chemokine receptor 8; CXCL, CXC-chemokine ligand; CXCR, CXC-chemokine receptor; DC, dendritic cell; DCIR, DC immunoreceptor; HVEM, herpesvirus entry mediator; IFN γ , interferon- γ ; IGF1, insulin-like growth factor 1; IL, interleukin; IL-27R α , IL-27 receptor α -chain; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibiting motif; NK, natural killer; NO, nitric oxide; RELM α , resistin-like molecule- α ; SPHK1, sphingosine kinase 1; T_H, T helper; TLR, Toll-like receptor.

Tableau II : Principaux marqueurs des différentes populations de macrophages, leurs fonctions et conditions d'activation (d'après Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008).

Le rôle des macrophages M2 est essentiel car il permet de contrôler de façon précise l'activation des autres populations de macrophages. Ce contrôle est en effet nécessaire dans la mesure où les médiateurs pro-inflammatoires produits peuvent également endommager les tissus et conduire à des pathologies auto-immunes, des allergies, ou même des cancers (Mosser, D.M., and Edwards, J.P., 2008). Les macrophages M1, quant à eux, sont au cœur de la réponse, via les mécanismes de phagocytose et les réponses oxydantes et inflammatoires qui s'ensuivent.

1.2.3. La phagocytose : fonction principale du macrophage

La phagocytose, définie comme l'ingestion de larges particules, est un ensemble de mécanismes moléculaires conservés au cours de l'évolution. Associée à la recherche de nutriments chez les organismes unicellulaires primitifs, elle est essentielle au maintien de l'homéostasie tissulaire et aux défenses immunitaires des métazoaires (Chavrier, P., 2001). Elle diffère de l'endocytose par plusieurs aspects.

Tout d'abord, il s'agit d'un processus d'internalisation assuré par un nombre restreint de types cellulaires : les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages, ainsi que, dans une moindre mesure, les monocytes et les mastocytes, sont les phagocytes dits professionnels. La phagocytose peut parfois aussi être réalisée par quelques types cellulaires dont elle n'est pas la fonction majeure (par exemple les cellules épithéliales de la vessie, capables de phagocyter des érythrocytes *in vivo*) (Aderem, A., and Underhill, D.M., 1999).

De plus, les mécanismes mis en jeu sont spécifiques, et ne correspondent pas uniquement à une adaptation de ceux de l'endocytose pour répondre à des particules de plus grande taille. En effet, l'endocytose fait intervenir des mécanismes relativement constants, qu'ils soient clathrine- ou cavéole-dépendants ou indépendants, tandis que la phagocytose repose sur des phénomènes physiologiques déclenchés par une particule donnée et adaptés à celle-ci (batteries de récepteurs spécifiques, cascades de signalisation complexes, remaniements du cytosquelette et régulations géniques fines). La phagocytose permet ainsi aux macrophages d'internaliser des particules de taille variable pouvant aller de quelques centaines de nm à une dizaine de μm , alors que l'endocytose est restreinte aux petites particules (cf 2.2.1.) (Grinstein, S., 2012).

Les objectifs de la phagocytose par les macrophages sont multiples : elle doit permettre de reconnaître les corps étrangers, les pathogènes, les cellules infectées ou altérées..., de les internaliser, d'en produire une information transmissible à d'autres cellules en vue de la mise en place de la réponse immunitaire, et de finalement « nettoyer » les débris. La capacité phagocytaire des macrophages et son efficacité pour répondre à ces objectifs, est d'abord permise par la présence de récepteurs membranaires nombreux et

variés, capables de reconnaître une grande diversité de motifs, et d'interagir pour optimiser le processus. Ils peuvent être regroupés en différentes classes :

i. Les récepteurs aux fragments constants Fc des immunoglobulines (Ig) :

Les Ig participent à l'opsonisation du pathogène à éliminer, le rendant ainsi plus susceptible d'être phagocyté. Les IgG sont les principales opsonines, mais les IgA et IgE jouent aussi un rôle ; elles sont reconnues par les récepteurs FcγR, FcαR et FcεR respectivement, qui se déclinent encore en plusieurs sous-groupes (par exemple FcγR I, FcγR II ou FcγR III) en fonction des cascades de signalisation qu'ils déclenchent (Aderem, A., and Underhill, D.M., 1999). La reconnaissance des fragments Fc par les récepteurs correspondants des macrophages s'accompagne d'extensions actine-dépendantes de la membrane plasmique autour de la particule opsonisée, et par la production de cytokines inflammatoires et de superoxydes.

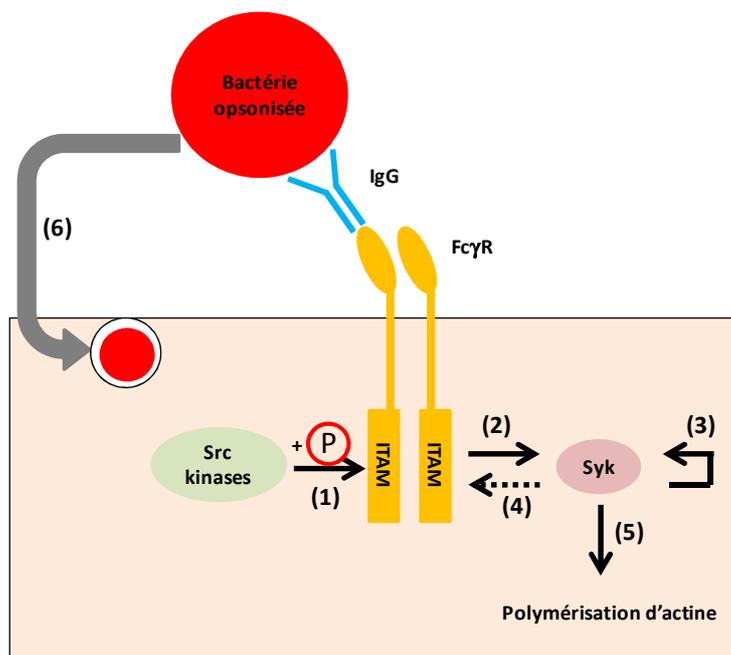


Figure 11 : Activation de la phagocytose via les récepteurs au fragment Fc des IgG (adapté d'après May, R.C, and Machesky, L.M., 2001). La reconnaissance de la bactérie opsonisée par les IgG via les récepteurs FcγR induit le recrutement de kinases de la famille Src et la phosphorylation des tyrosines des domaines ITAMs des récepteurs (1). La tyrosine kinase Syk est recrutée au niveau du domaine ITAM phosphorylé, et activée (2) ; Syk peut aussi s'auto-activer (3), ou phosphoryler elle-même le domaine ITAM dans une moindre mesure (4), amplifiant ainsi les cascades de signalisation. Enfin, Syk transmet un signal intracellulaire (5) conduisant à l'activation de la polymérisation d'actine et à l'internalisation de la particule (6).

Au niveau moléculaire, cette reconnaissance s'accompagne également de la phosphorylation de tyrosines présentes dans des motifs spécifiques des récepteurs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ITAMs), réalisée par plusieurs familles de kinases, en particulier Src (Figure 11). D'autres kinases sont ensuite activées (SYK, caséine kinases...), pour favoriser le recrutement de composés du cytoquelette au niveau de la « coupe » d'actine puis du phagosome naissant (Aderem, A., and Underhill, D.M., 1999 ; May, R.C., and Machesky, L.M., 2001 ; Goodridge, H.S., et al., 2012).

ii. Les récepteurs au complément

Le complément se compose d'une trentaine de protéines, qui peuvent être activées par la présence de macromolécules d'origine microbienne ou par la fixation à des Ig déjà présentes en surface de la particule cible. Parmi ces protéines, C3b activée peut être reconnue par les récepteurs transmembranaires CR1, CR3 ou CR4 des macrophages, ce qui déclenche des phosphorylations en cascades de ces récepteurs, et l'association de la région cytoplasmique des récepteurs à des protéines du cytosquelette, telles que l' α -actinine. L'inflammation peut aussi être activée et accompagnée ou non d'un « burst oxydatif » (Aderem, A., and Underhill, D.M., 1999 ; May, R.C., and Machesky, L.M., 2001 ; Goodridge, H.S., et al., 2012).

iii. Les autres types de récepteurs membranaires de la phagocytose

Ces récepteurs incluent les intégrines (telles que le récepteur à la fibronectine), les lectines (par exemple le récepteur au mannose), les récepteurs au LPS (CD14/TLR4), et tous les récepteurs dits « éboueurs » (« *scavenger* »), qui reconnaissent de nombreuses classes de molécules. L'activation de ces récepteurs conduit aussi à la formation d'extensions membranaires dus à des remodelages d'actine cytoplasmique. Cependant, les mécanismes et la signalisation exacts sont moins bien connus que ceux impliquant les récepteurs FcR (May, R.C., and Machesky, L.M., 2001 ; Karavitis, J., and Kovacs, E., 2011).

L'activation des récepteurs conduit à plusieurs événements. Tout d'abord, elle est associée à une augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire, nécessaire à la polymérisation de l'actine lors de la formation du phagosome, ainsi qu'à sa dépolymérisation lors de la fusion de cette vésicule avec les lysosomes via l'activation d'une autre protéine, la gelsoline. Le Ca^{2+} contribue également à l'activation de

plusieurs familles de protéines, en particulier la famille des kinases PKC, qui activent à leur tour des protéines impliquées dans la liaison entre les filaments d'actine et la membrane cellulaire.

L'activation des GTPases Rho et ARF (ADP-ribosylation factor) contrôle l'assemblage de l'actine et à sa fixation aux composés d'ancrage cellulaire et à l'actinomyosine, fournissant la force nécessaire à l'internalisation. Les GTPases participent également à l'activation de l'expression de certains gènes et à la production de superoxydes. Le complexe Arp2/3, quant à lui, intervient dans le phénomène de nucléation, qui consiste en la formation de nouveaux filaments d'actine. Ceci conduit à la formation des extensions membranaires à partir des filaments d'actine, pour finalement former la « coupe » qui va englober entièrement la particule. Le remaniement du cytosquelette d'actine fait enfin intervenir la phosphoinositide kinase (PI3-K), qui favorise la fusion des membranes et la fermeture du phagosome (Figure 12). La dépolymérisation de l'actine est ensuite l'action de protéines de la famille ADF (actin-depolymerizing family) et des cofilines (May, R.C, and Machesky, L.M., 2001 ; Karavitis, J., and Kovacs, E., 2011 ; Goodridge, H.S., et al., 2012).

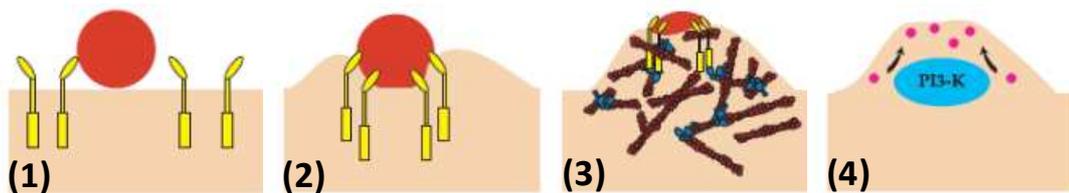


Figure 12 : Modélisation des étapes de la phagocytose (adapté d'après May, R.C, and Machesky, L.M., 2001). (1) Fixation du ligand. (2) Extension de pseudopodes membranaires indépendamment de l'actine pour former une coupe. (3) Polymérisation d'actine pour englober la particule. (4) Dépolymérisation d'actine et fermeture du phagosome grâce à la signalisation PI3-K.

Une fois le phagosome formé, sa maturation se poursuit, et est associée à un enrichissement en certaines protéines, notamment annexines et α -actinine, qui continuent d'interagir avec l'actine afin de permettre le déplacement intracellulaire de la vésicule, mais aussi protéines de fusion, hydrolases, ATPases.... Des isoformes de myosines sont aussi recrutées pour fournir au phagosome des forces contractiles nécessaires

à son mouvement, puis à sa fusion avec d'autres vésicules, telles que les lysosomes, en vue de la destruction de la bactérie phagocytée puis de la présentation des antigènes qui en sont issus à d'autres types cellulaires (Aderem, A., and Underhill, D.M., 1999 ; May, R.C., and Machesky, L.M., 2001 ; Garin, J., et al., 2001).

1.2.4. Réponse oxydante et inflammation : conséquences de la phagocytose

La phagocytose d'un pathogène par le macrophage active deux processus : (1) le *burst* oxydant (ou poussée oxydante), qui consiste en une activation rapide du métabolisme respiratoire, accompagnée de la production d'espèces oxydantes toxiques ; (2) la dégranulation, qui correspond à la libération du contenu toxique de granules cytoplasmiques dans le phagosome, en vue de la destruction de la bactérie phagocytée. La combinaison de ces mécanismes induit en parallèle la production de médiateurs de l'inflammation (Morel, F., et al., 1991).

L'activation du métabolisme respiratoire est liée à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et à l'activation des cascades de signalisation résultant de la phagocytose (cf. 3.2.2. *iii*). Elle est marquée par une augmentation brutale de la consommation d'oxygène, et par l'activation des complexes respiratoires membranaires via les protéines kinases C (PKC). Ceci conduit tout d'abord à la production via le complexe NADPH oxydase d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 13).

Les premières espèces produites sont les ions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et des espèces oxydantes dérivées telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut à son tour réagir avec des ions intracellulaires pour produire des composés antimicrobiens (par exemple HOCl par réaction avec Cl^-). Des réactions secondaires conduisent aussi à la production d'espèces radicalaires (HO^{\cdot}) également toxiques (Morel, F., et al., 1991 ; Forman, H.J., and Torres, M., 2002). Chez certaines espèces, les macrophages produisent aussi des espèces réactives de l'azote (RNS) en plus des ROS (par exemple NO^{\cdot}), qui peuvent aussi réagir avec les ROS, et conduisent également à la production d'oxyde nitreux (NO) (Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008). Ces mécanismes de *burst* respiratoire ne sont cependant pas spécifiques des macrophages, et peuvent aussi

avoir lieu dans d'autres types cellulaires, mais dans une moindre mesure (Forman, H.J., and Torres, M., 2002).

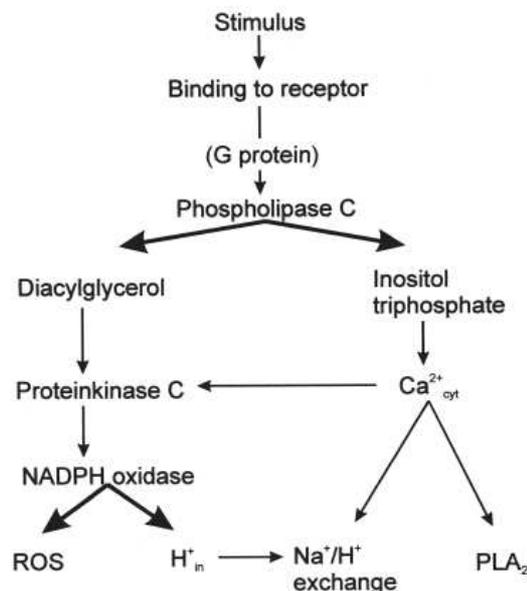


Figure 13 : Voies de signalisation conduisant au burst oxydant (d'après Vrba, J., and Modriansky, M., 2002). Les flèches fines représentent des actions de stimulation ; les flèches épaisses symbolisent les réactions enzymatiques. Ca^{2+}_{cyt} : calcium cytoplasmique ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; H^+_{in} : protons intracellulaires ; PLA_2 : phospholipase A_2 .

Les ROS sont capables d'endommager différents types de macromolécules (péroxydation des lipides, oxydation d'acides aminés ou de liaisons peptidiques, pontages entre protéines, lésions de bases et cassures de brins d'ADN...), entraînant leur fragmentation (Vrba, J., and Modriansky, M., 2002). Outre une action directe sur les pathogènes phagocytés, les ROS et RNS activent certains facteurs de transcription et voies de signalisation (Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008). Ainsi, une des cibles privilégiées de ces espèces est le facteur de transcription NFκB, responsable de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF-α, les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, l'IFN-γ, le GM-CSF, les protéines MIP.... De plus, l'activation de nombreuses kinases MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), parmi lesquelles les protéines des familles JNK, ERK1/2, p38-MAPK..., induit d'autres facteurs de transcription (par exemple la protéine activatrice 1 (AP-1)), et conduit donc à un ensemble complexe de réactions physiologiques des macrophages constituant leur réponse au stress (Figure 14) (Forman, H.J., and Torres, M., 2002 ; Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008).

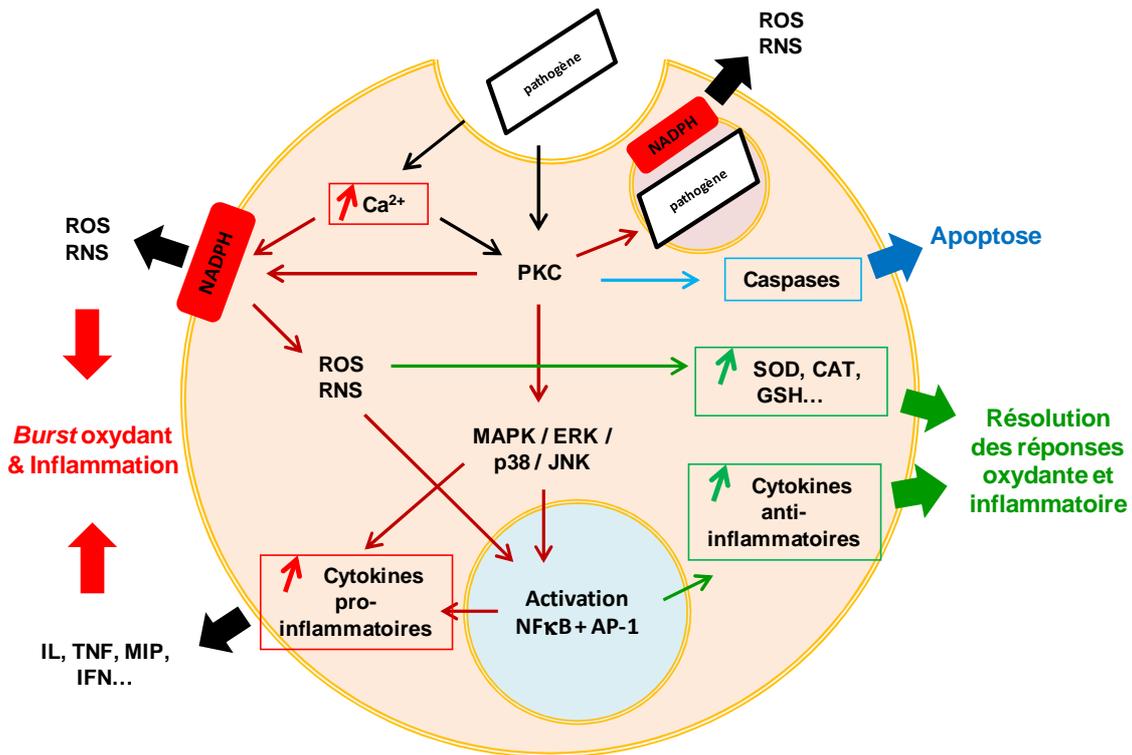


Figure 14 : Mécanismes des réponses oxydante et inflammatoire induits par la phagocytose (adapté d'après Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008). Les flèches noires représentent les conséquences directes de la phagocytose ; les flèches rouges et vertes correspondent respectivement aux phases précoces et tardives de la réponse qui s'ensuit ; parfois, l'apoptose peut aussi être activée (flèches bleues).

En parallèle, les cytokines produites stimulent l'activation de nombreux gènes, parmi lesquels ceux codant pour l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitreux (NOS2 ou iNOS). L'expression de ces gènes est aussi Ca²⁺-dépendante, et fait intervenir le NADPH en tant que cofacteur. Sécrété par les macrophages, le NO a essentiellement un rôle de signalisation, qui permet d'amplifier la réponse. Il possède aussi, dans une moindre mesure, une activité cytotoxique à l'encontre de pathogènes ou de cellules endommagées en dehors de la cellule (par inhibition d'enzymes de respiration ou de réparation de l'ADN par exemple), qui renforce celle des espèces oxydantes (MacMicking, J., et al., 1997 ; Pacher, P., et al., 2007).

Enfin, le NO peut réagir directement avec l'oxygène (O₂) pour former l'oxyde nitrique (NO₂), mais aussi avec ses espèces dérivées pour former d'autres composés oxydants. Ainsi, la présence simultanée de NO et de superoxydes O₂⁻ conduit à la formation de peroxydite NO₃⁻, beaucoup plus toxique que le NO ou les superoxydes seuls (Figure 15). Cette espèce peut en effet induire la peroxydation des lipides, l'oxydation

des acides nucléiques (formation de 8-oxo-guanine par exemple), ainsi que la dégradation des protéines par oxydation des cystéines, nitration des tyrosines, ou par interaction avec des groupements réactifs tels que les thiols, les centres fer-soufre, ou encore les doigts de zinc. Il en résulte des dommages cellulaires importants.

Le peroxy-nitrite peut à son tour former des composés oxydants supplémentaires, tels que NO_2^\cdot ou HO^\cdot , qui participent également à la cytotoxicité. Enfin, il peut aussi activer certaines voies de signalisation, notamment celles impliquant les kinases PI3-K, PKC et Src et intervenant dans la phagocytose, mais aussi NF κ B, ERK, JNK, ou p38-MAPK qui amplifient et régulent la réponse. Ce stress, également appelé « stress nitrant » ou « nitrosant », renforce et amplifie le stress oxydant (Pacher, P., *et al.*, 2007 ; Liaudet, L., *et al.*, 2009).

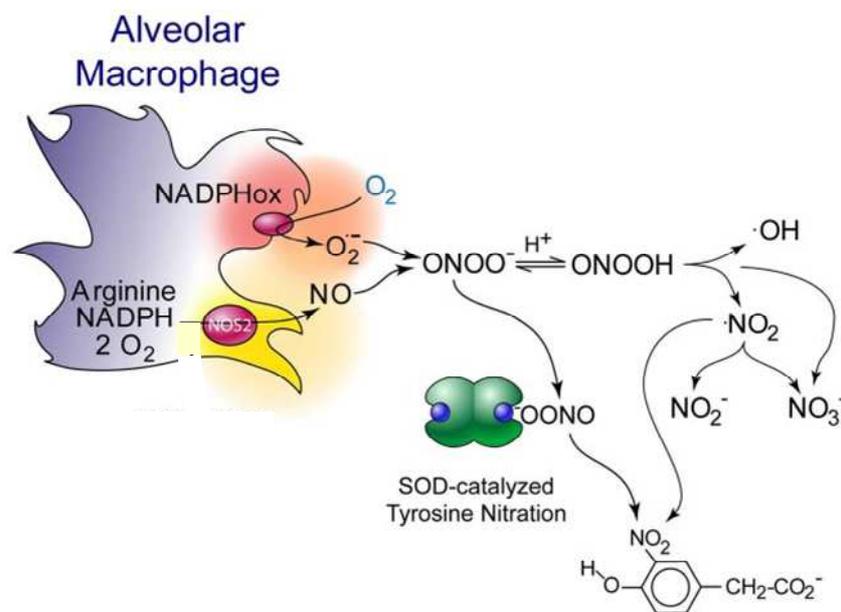


Figure 15 : Production de peroxy-nitrite et d'espèces dérivées par les macrophages alvéolaires (d'après Pacher, P., *et al.*, 2007).

Cependant, les espèces oxydantes produites au cours de cette réponse peuvent aussi être toxiques pour l'organisme lui-même (en particulier les peroxydes et les espèces radicalaires). C'est pourquoi des mécanismes de contrôle du *burst* oxydant sont ensuite rapidement établis par les cellules. L'efficacité et le niveau de la réponse sont ainsi le résultat d'un équilibre permanent entre les espèces pro-oxydantes d'une

part, et des espèces anti-oxydantes d'autre part, dont la production s'accroît dans les phases plus tardives de la réponse du macrophage.

Il s'agit d'espèces portant généralement des groupements réactifs tels que les groupements thiols (par exemple le glutathion GSH/GSSG), mais aussi d'espèces redox jouant le rôle de cofacteur, telles que le NADH ou le NADPH. Les réactions mettent en jeu des enzymes spécifiques dites de détoxification, telles que la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion S-transférase (GST) et la glutathion réductase (GRd), qui éliminent les espèces toxiques via l'équilibre GSH/GSSG, ou encore la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD), qui éliminent notamment l' H_2O_2 (Figure 16) (Vrba, J., and Modriansky, M., 2002 ; Forman, H.J., and Torres, M., 2002 ; Hamilton, R.F. Jr., et al., 2008).

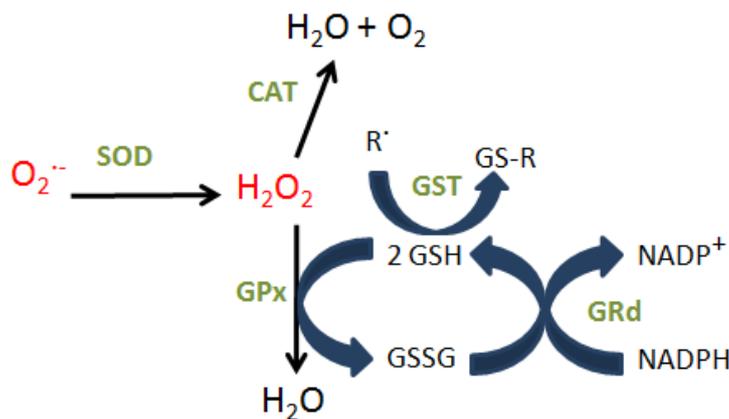


Figure 16 : Schéma des principales réactions enzymatiques impliquées dans les défenses anti-oxydantes de l'organisme.

Les espèces dérivées de l'azote, qui peuvent diffuser facilement dans les tissus et la circulation, sont également éliminées. Le NO peut être complexé par l'oxyhémoglobine pour former du nitrate. Le peroxy-nitrite peut quant à lui réagir avec le CO_2 , ou être éliminé par la SOD (Pacher, P., et al., 2007). Les métallothionéines, petites protéines riches en cystéines, interviennent également dans ces processus de détoxification, par la chélation de métaux en excès et la régulation de l'homéostasie de métaux essentiels, tels que le cuivre ou le zinc, diminuant ainsi l'état d'oxydation des cellules (Gruber, C., et al., 2000). Enfin, un deuxième niveau de contrôle est assuré par les médiateurs anti-inflammatoires produits en fin de

réponse (cf. 3.1.3.). L'ensemble des événements mis en jeu permet ainsi aux cellules de revenir à l'équilibre dès lors que l'infection est éradiquée, et de réparer les dommages tissulaires subis par l'hôte.

L'ensemble des mécanismes présentés ici constituent donc non seulement la première ligne de défense de l'organisme contre toute attaque extérieure, mais aussi les moyens nécessaires à l'activation, au déroulement et à la résolution d'une réponse immunitaire contrôlée et adaptée à la nature de l'attaque. Il est alors légitime de s'intéresser aux effets d'une attaque non pathogénique, telle que peut l'être l'exposition des macrophages à des particules inorganiques.

1.3. Macrophages et particules

La plupart des mécanismes observés en réponse à une attaque pathogène, et en particulier l'inflammation, peuvent également être induits par un traumatisme ou par la présence de particules organiques ou inorganiques, d'origine biologique ou non. Ce type de situation se produisant en l'absence de pathogène, aujourd'hui appelé « inflammation stérile », met en jeu des processus similaires à ceux décrits précédemment (Chen, G.Y., and Nuñez, G., 2010). Ainsi, l'inflammation stérile est marquée par le recrutement de cellules immunitaires au site endommagé, la reconnaissance par ces cellules de stimuli stériles (*damage-associated molecular patterns*, ou DAMPs) par les mêmes récepteurs membranaires que ceux décrits précédemment (TLRs, autres PRRs...), l'activation des mécanismes de défense liés à la phagocytose des particules stériles, et la production accrue d'espèces oxydantes et de médiateurs inflammatoires.

Comme dans le cas d'une infection, le risque de l'inflammation stérile réside dans le fait que l'exposition répétée, prolongée et/ou non contrôlée au composé qui en est à l'origine peut établir un état d'inflammation chronique pouvant lui-même conduire à de lourdes altérations tissulaires. Ainsi, plusieurs exemples d'inflammation stérile associée à des pathologies sont aujourd'hui documentés. On peut par exemple citer : le dépôt des cristaux d'urate dans le cas de la goutte, qui induit une inflammation chronique au niveau des cartilages, conduisant à leur destruction ; les cristaux de cholestérol, dont la phagocytose par

les macrophages entraîne des dysfonctionnements des cellules endothéliales ; la formation des plaques d'athérosclérose, provoquant des inflammations importantes ; ou encore les plaques β -amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, qui activent les cellules microgliales et induisent l'inflammation, contribuant ainsi à la neuro-dégénérescence (Chen, G.Y., and Nuñez, G., 2010).

Les effets de l'inflammation chronique suite à une exposition particulaire ont quant à eux été largement démontrés dans le cas de l'inhalation répétée de particules de silice ou de fibres d'amiante, responsables de fibroses pulmonaires, et à l'origine respectivement de la silicose et de l'asbestose (Mossman, B.T., and Churg, A., 1998). Dans ces deux pathologies, la phagocytose partielle ou totale des particules ou des fibres par les macrophages alvéolaires conduit à une surproduction non contrôlée de ROS/RNS et de cytokines, qui induisent des modifications physiologiques des cellules environnantes (fibroblastes interstitiels et cellules épithéliales), et déclenchent la pathologie associée (Figure 17).

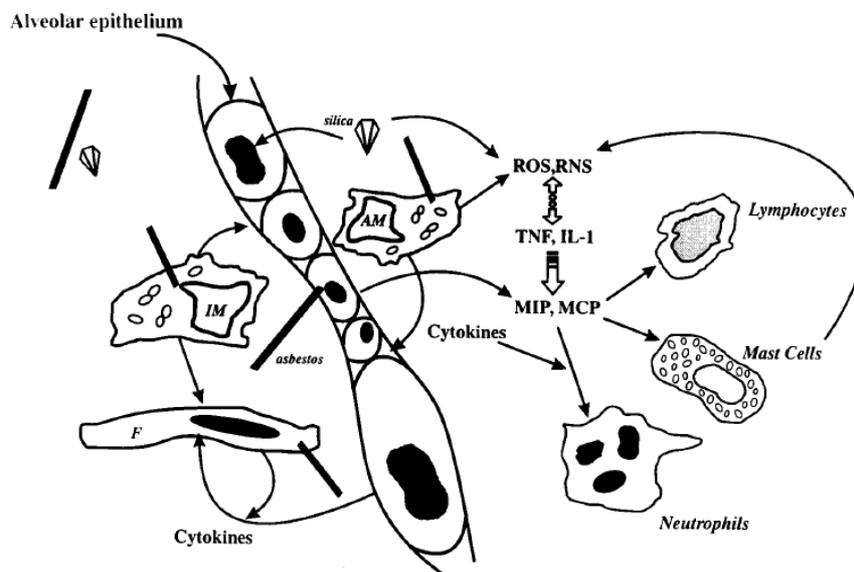


Figure 17 : Modélisation de la réaction des macrophages alvéolaires face aux particules de silice et aux fibres d'amiante (d'après Mossman, B.T., and Churg, A., 1998). AM : macrophages alvéolaires ; IM : macrophages interstitiels ; F : fibroblastes ; MCP : protéines chimiotactiques des macrophages.

De plus, il a aussi été démontré que ces pathologies chroniques, qui dérèglent souvent les mécanismes classiques de l'immunité, favorisent également le développement de certaines tumeurs (granulomes, carcinomes...) (Mossman, B.T., *and* Churg, A., 1998 ; Chen, G.Y., *and* Nuñez, G., 2010).

Compte tenu de ces exemples, du rôle important des macrophages dans la mise en place et la modulation des mécanismes de défense, et des conséquences potentielles de leur exposition à divers types de particules, ce type cellulaire constitue un modèle de choix pour l'étude de la toxicité des nanoparticules. Des études de plus en plus nombreuses sont ainsi menées sur ce modèle, afin d'élucider les mécanismes de toxicité des NPs, et de prévenir les risques associés. C'est dans ce contexte qu'ont été réalisés les travaux présentés ici.

2. LES NANOMATERIAUX : ENJEUX ET PROPRIETES

2.1. Les nanotechnologies : contexte économique et juridique

2.1.1. Un marché en plein essor

A l'échelle nanométrique, les matériaux peuvent acquérir des propriétés (physiques, chimiques, mécaniques...) différentes de celles observées pour les mêmes matériaux à des échelles supérieures, et pouvant présenter un intérêt particulier notamment d'un point de vue industriel. L'avènement des nanotechnologies est lié à l'exploitation de ces propriétés nouvelles afin de répondre à certains enjeux majeurs du XXIème siècle, tels que le stockage de l'énergie, la lutte contre la pollution de l'eau et du sol, la prévention des maladies infectieuses, ou encore la diminution de consommation de matière première (développement durable).

Considéré comme une véritable révolution industrielle, le développement des nanotechnologies a aujourd'hui un impact considérable sur l'économie mondiale actuelle, notamment du fait du nombre et de la diversité des secteurs industriels concernés. Estimé à 40 milliards d'euros en 2001 par la Commission Européenne, le marché mondial des nanotechnologies pourrait représenter entre 450 et 1850 milliards d'euros d'ici 2015 (Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie, 2011), et concerner 15 % de l'activité manufacturière mondiale, ayant ainsi un impact important sur le marché de l'emploi (CEDEF, Ministère de l'Economie et des Finances, article du 21 mai 2012). Les principaux secteurs concernés sont la santé, les technologies de l'information et de la communication (en particulier l'électronique), et le développement et la production de nouveaux nanomatériaux, représentant à eux seuls plus de 30 % du marché (Figure 18).

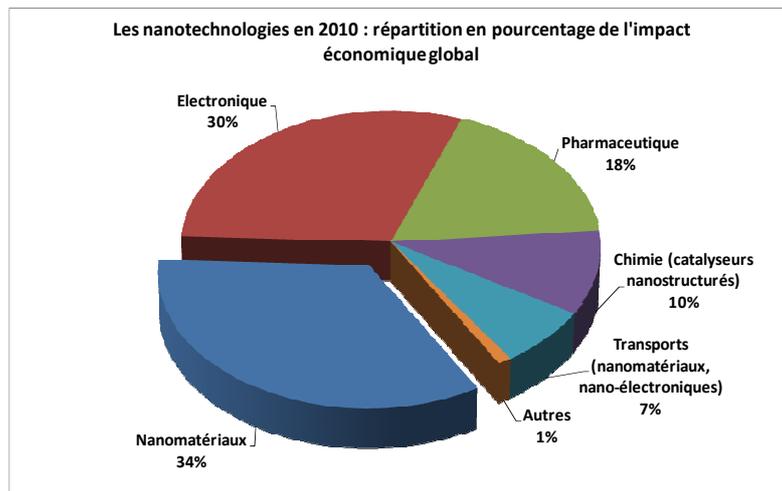


Figure 18 : Estimation du marché global des nanotechnologies en 2010 (adapté d'après des données de National Science Foundation (NSF)).

L'utilisation des nanomatériaux dans les produits de consommation courante est elle aussi en plein essor. Ainsi, 212 produits contenant des nanomatériaux étaient répertoriés en mars 2006, contre 1317 en mars 2011 (The Project on Emerging Nanotechnologies). Si la tendance actuelle se poursuit, ce nombre pourrait s'élever à plus de 3800 produits d'ici 2020 (Figure 19).

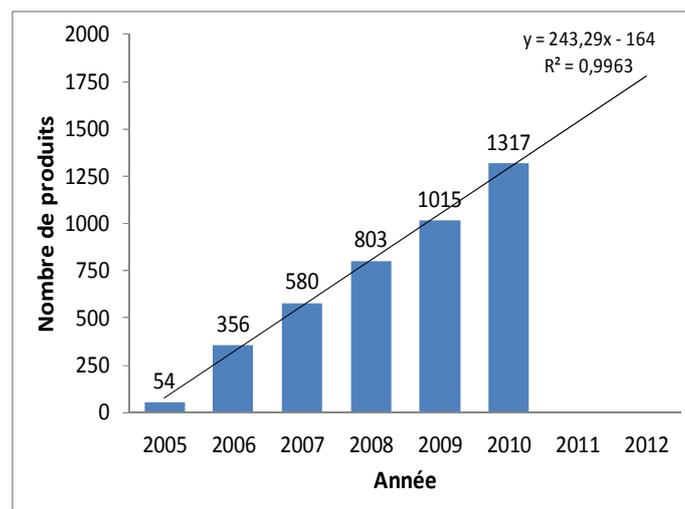


Figure 19 : Evolution du nombre total de produits répertoriés contenant des nanomatériaux depuis 2005, avec analyse par régression linéaire (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), inventaire de mars 2011).

La majorité des produits manufacturés concernent le domaine de la santé et du bien-être, incluant notamment les produits cosmétiques et les écrans solaires, mais l'utilisation des nanomatériaux augmente également dans la production de certains types de vêtements et d'accessoires sportifs, ou encore dans l'alimentation (conservateurs, colorants...) (Figure 20).

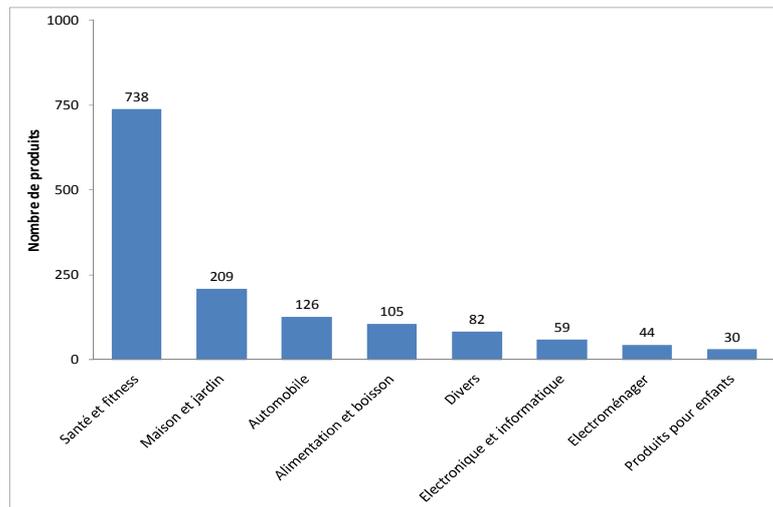


Figure 20 : Nombre de produits répertoriés en mars 2011 en fonction du domaine d'application (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN)).

Actuellement, une trentaine de pays commercialisent des produits contenant des nanomatériaux, les acteurs majeurs étant les Etats-Unis et certains pays d'Europe occidentale (principalement Royaume-Uni, France, Allemagne, pays Scandinaves, Italie) (Figure 21). Le développement des nanotechnologies en Asie concerne essentiellement la Chine, le Japon, Taïwan et la Corée. Par ailleurs, pour certains produits, l'origine géographique précise n'a pas pu être répertoriée à ce jour.

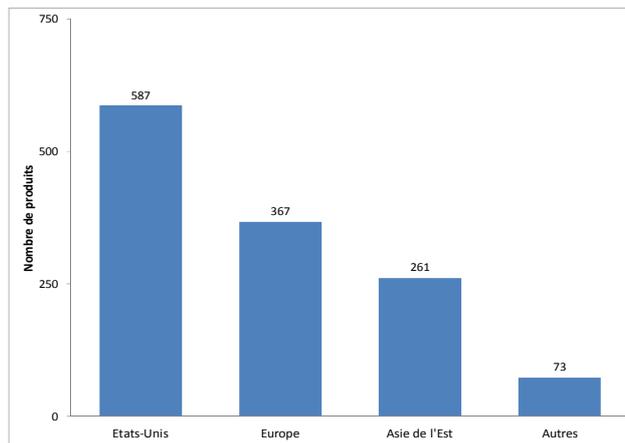


Figure 21 : Nombre de produits répertoriés en mars 2011 en fonction de la région de production (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN)).

Les matériaux les plus utilisés, en termes de nombre de produits différents les contenant, sont principalement l'argent, suivi du carbone (incluant les fullerènes), et du titane (le plus souvent sous forme de dioxyde de titane TiO_2) (Figure 22). Le TiO_2 est quant à lui le plus largement produit en termes de quantités annuelles. Cependant, du fait de la réglementation encore limitée, la nature des nanomatériaux employés n'est pas connue pour tous les produits présents actuellement sur le marché.

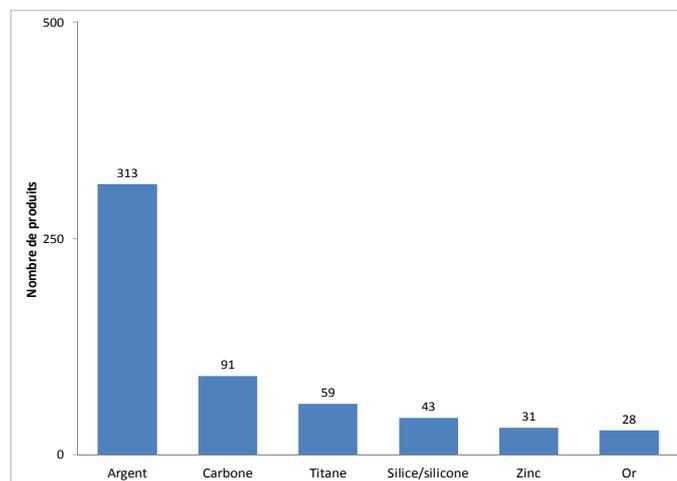


Figure 22 : Principaux matériaux utilisés et nombre de produits associés (adapté d'après The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), inventaire de mars 2011).

2.1.2. La réglementation

La législation concernant les nanoparticules n'est pas encore adaptée au développement rapide et à l'utilisation croissante des nanotechnologies. En France, la Loi Grenelle I du 3 août 2009 demande la déclaration obligatoire pour la fabrication, l'importation ou la mise sur le marché de substances à l'échelle nanométrique ou de matériaux pouvant rejeter de telles substances, en vue d'une meilleure information du public, des consommateurs et des travailleurs. De plus, l'article 185 de la Loi Grenelle II du 12 juillet 2010 impose la connaissance des nanomatériaux produits, importés ou mis sur le marché (identité, quantités, usages), la traçabilité (fabricant, distributeur, importateur et utilisateur professionnel), et la mise à disposition des connaissances sur les nanomatériaux en vue de l'évaluation des risques et de l'information du public (Légifrance, consulté le 16 octobre 2012).

En Europe, la directive REACH (enRegistration, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques) prévoit l'enregistrement de chaque substance produite ou importée à raison d'une tonne ou plus par an. Un rapport de sécurité chimique supplémentaire doit également être fourni lorsque les quantités sont supérieures ou égales à 10 tonnes par an. A l'heure actuelle, les nanoparticules échappent encore à ces dispositions, puisque les seuils de tonnages annuels qu'elles prévoient ne sont généralement pas atteints par les laboratoires et industries produisant des nanomatériaux.

2.2. Définitions

Les nanosciences et les nanotechnologies recouvrent l'étude, la fabrication et la manipulation de structures, dispositifs et systèmes matériels de dimensions nanométriques, également appelés nanostructures. Ces dernières regroupent d'une part les nano-objets, structures élémentaires de taille et de forme plus ou moins définies, pouvant être d'origine naturelle (formées spontanément), d'origine humaine non intentionnelle, ou manufacturées (produites par l'industrie), et d'autre part les nanomatériaux, comprenant eux-mêmes des nano-objets.

Les nano-objets sont généralement définis comme des objets dont au moins une dimension est inférieure ou égale à 100 nanomètres. Ils comprennent donc les nano-feuillets (une seule dimension nanométrique), les nano-fils et nanotubes (deux dimensions nanométriques), et les nanoparticules (NPs), dont les trois dimensions doivent théoriquement être nanométriques. Cependant, il n'existe pas, à ce jour, de définition unique pour les NPs, que ce soit au niveau national ou international (Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie, 2011). La plus couramment retenue accepte des structures n'ayant qu'une ou deux dimensions nanométriques (Borm, P.J., *et al.*, 2006 ; Jones, C.F. and Grainger D.W., 2009). D'autres définitions ont été proposées dans la littérature, également basées sur la taille et/ou les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Certaines considèrent ainsi non seulement des structures solides ou dispersées répondant à la définition précédente, mais également des agrégats dont la taille peut aller jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres (Shaw, B.J., and Handy, R.D., 2011).

Par ailleurs, l'absence d'une définition standard contribue aux difficultés à mettre en place une réglementation quant à la production et à l'utilisation des NPs. Or, le développement croissant de l'emploi de ce type de matériaux nécessite l'établissement d'une législation plus précise, prenant en compte non seulement la taille et les propriétés physico-chimiques des NPs, mais aussi la réactivité des différents nanomatériaux et l'éventuelle toxicité qui pourrait en découler et sur laquelle persistent de nombreuses interrogations.

2.3. Les nanoparticules : propriétés et applications

Les principales nanoparticules utilisées à ce jour ainsi que leurs applications majeures sont présentées dans le Tableau III. Les nanoparticules métalliques représentent l'essentiel des nanomatériaux utilisés (cf. Figure 22). Celles-ci présentent en effet des propriétés uniques et avantageuses par rapport aux matériaux macroscopiques de même nature. Ainsi, leur taille leur confère tout d'abord une réactivité supérieure (Poole, C.P., and Owens, F.J., 2003). Les propriétés mécaniques de certaines NPs permettent également

d'améliorer la résistance des matériaux, tandis que d'autres possèdent des propriétés électriques permettant de modifier la conductivité de matériaux isolants (cas des nanotubes de carbone).

Nanoparticle or nanomaterial	Application
Aluminium oxide	Optical polishing, cosmetics, and clothing
C ₆₀ fullerenes	Hydrogen storage, drug delivery, therapeutics, coatings and pigments, lubrication, and cosmetics
Carbon nanotubes (single or multi walled)	Hydrogen storage, drug delivery, textiles, electronics, water purification, and sporting equipment
Ceramics	Electronics, anti-oxidants, and car polish
Copper or copper oxide	Lubrication oil additive, electronics and computer processors, conductive coatings, printer inks, sintering additives, 'anti-ageing' cream and skin conditioner, and mineral supplements
Gold	Drug delivery, labels for immunocytochemistry, and biological hazard detection e.g., ricin, <i>E. coli</i> , and mineral supplements
Iron oxide	Ultrafiltration and oxidation reduction catalyst
Iron sulphide	Removal of organochlorine pesticides from drinking water
Nanocrystals	Insulators and drug delivery
Nano-rods	Electronics, sensors and sensing devices
Polymers	Therapeutics, coatings and pigments, lubrication, absorbents
Quantum dots	Medical imaging, photonics
Silica	Photovoltaics, optics and optical devices, anti-graffiti paint, and cosmetics
Silver	Antibacterial uses in water treatment, fabric softener, clothing, soft toys, wound dressing, kitchen utensils and appliances, computer keyboards, food storage containers, and baby products (e.g. cups) and uses in contraception and toothpaste
Titanium dioxide	Paint, sunscreen, cosmetics, capacitors, building materials, catalyst, air clearance, anti-bacterial, viral, algal, fungus and mould coating for domestic baths, and sporting equipment
Nano-vitamins (some vitamins encapsulated in nano-delivery vehicles)	Vitamin E; food, beverages and cosmetics, vitamins B12 and E; cosmetics
Zinc oxide	Sunscreen, cosmetics, cosmetic remover, foot deodorant, and car polish

Tableau III : Principaux nanomatériaux produits et utilisations courantes ou proposées (d'après Shaw, B.J., and Handy, R.D., 2011).

Les propriétés optiques de particules de TiO₂ ou ZnO, dont les dimensions sont inférieures aux longueurs d'ondes du visible (transparence) mais qui absorbent dans les UV, sont largement employées dans la fabrication de verres, produits cosmétiques, crèmes solaires, ou en tant que colorants pour les dentifrices ou les peintures. Plusieurs nanoparticules métalliques sont également utilisées en tant que colorants, additifs ou conservateurs dans les produits alimentaires (Tableau IV). Enfin, certaines nanoparticules présentent aussi des propriétés magnétiques (oxydes de fer), catalytiques, ou d'inflammabilité qui trouvent également des applications variées (AFSSET, 2010).

	Substance	Food Additives
E-171	Ultrafine Titanium Dioxide Power	<ul style="list-style-type: none"> • Tables and Capsules • Cottage and Mozzarella cheses • horseradish cream • sauces, lemon curt and sweets
E-172	Iron oxides and Dioxides	<ul style="list-style-type: none"> • Cake, dessert mixes • Meat paste, salmon and shrimp paste
E-173	Aluminium	<ul style="list-style-type: none"> • External decoration in cakes • Antacid treatments • Tap watter drinking supply
E-174	Silver	<ul style="list-style-type: none"> • External Decoration
E-175	Gold	<ul style="list-style-type: none"> • External Decoration

Tableau IV : Principales nanoparticules utilisées en tant qu'additifs alimentaires (adapté d'après Casals, E., et al., 2008).

2.4. Les nanoparticules étudiées dans ces travaux

2.4.1. Cuivre et oxyde de cuivre

Le cuivre (Cu) est un métal de transition bien connu. A l'échelle nanométrique, il se caractérise par une surface spécifique importante et une conductivité élevée. Ces propriétés en font tout d'abord un matériau intéressant pour des applications électriques, telles que les films, pâtes, encres ou enduits conducteurs utilisés notamment en micro-électronique, mais aussi dans l'industrie automobile (The Project on Emerging

Nanotechnologies, 2012 ; Midander, K., *et al.*, 2009). Il permet alors de remplacer des métaux plus précieux, notamment l'argent. Il est également utilisé dans ces mêmes domaines en tant qu'additif dans des lubrifiants, afin d'améliorer leurs propriétés. Le cuivre est aussi utilisé comme matériau de construction, soit en tant que tel, soit sous la forme d'alliages (avec le zinc, l'étain...). Il peut ainsi entrer dans la composition de certains goudrons. Sa résistance à la corrosion permet également son utilisation pour la plomberie, les pièces de monnaie, certains bijoux. Enfin, il peut aussi être utilisé pour la fabrication de polymères plastiques (caoutchouc des pneumatiques par exemple), de textiles, ou encore de certains produits cosmétiques (Midander, K., *et al.*, 2009 ; Manna, P., *et al.*, 2011). Les propriétés de réactivité chimique sont aussi exploitées en industrie métallurgique et pétrochimique, où le cuivre nanométrique est utilisé en tant que catalyseur pour la production de composés tels que le méthanol ou le glycol (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2012 ; Sites de fournisseurs American Elements et EmFutur).

Sur le plan biochimique, le cuivre est également un élément essentiel, puisqu'il intervient en tant que cofacteur ou catalyseur dans un grand nombre de réactions biologiques et chimiques (transfert d'électrons) (Manna, P., *et al.*, 2011). Il peut de ce fait être intégré à certains compléments de régime alimentaire. En revanche, s'il est présent en trop grande quantité, il peut causer des dommages cellulaires importants, ce qui lui confère notamment des propriétés antimicrobiennes et antifongiques, les microorganismes étant plus sensibles aux changements d'homéostasie des métaux (Manna, P., *et al.*, 2011). De même, des applications biotechnologiques et biomédicales peuvent être envisagées dans le cadre de traitements ciblés (tumeurs, ostéoporose...), ou pour le développement de biosenseurs et biomarqueurs pour le diagnostic (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2012 ; Sites de fournisseurs American Elements et EmFutur).

L'oxyde de cuivre (CuO) présente des propriétés en partie similaires à celles du cuivre. Ainsi, ses propriétés de conductivité sont différentes, et leur utilisation concerne essentiellement la catalyse industrielle et l'électrochimie (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2012 ; Site du fournisseur American Elements ; Hanagata, N., *et al.*, 2011). De plus, le CuO est un semi-conducteur qui exprime des propriétés particulières à haute température. Les NPs de CuO sont ainsi utilisées dans les batteries ou les convertisseurs d'énergie solaire, mais dans la composition de certains fluides pour en améliorer la conductivité thermique et

permettre une économie énergétique (Ren, G., *et al.*, 2009). La stabilité du CuO et son insolubilité en solution aqueuse permettent également son utilisation dans les verres et dans les céramiques, pouvant elles-mêmes être utilisées en micro-électronique. De plus, il possède les mêmes propriétés antimicrobiennes que le Cu, et est donc aussi de plus en plus utilisé pour la fabrication de textiles, de contenants alimentaires, ou même de systèmes de contraception intra-utérins (Piret, J.-P., *et al.*, 2012 ; Fahmy, B., *and* Cormier, S.A., 2009 ; Grillo, C.A., *et al.*, 2010). Ses propriétés de réactivité sont également exploitées pour des processus de dépollution. Enfin, la structure cristalline du CuO lui confère des propriétés optiques, photocatalytiques et photovoltaïques (Ren, G., *et al.*, 2009).

Les NPs de cuivre sont généralement commercialisées sous forme de nanopoudres de particules à géométrie sphérique, mais il est aussi possible de les trouver auprès de certains fournisseurs sous la forme de suspensions, en présence ou non d'agents de dispersion. Les NPs de CuO sont essentiellement commercialisées sous forme de nanopoudres.

2.4.2. Oxyde de zinc

Le zinc est un autre métal de transition, qui possède aussi des propriétés électriques, thermiques, et optiques intéressantes. Sous la forme d'oxyde de zinc (ZnO), certaines de ces propriétés sont augmentées, et des propriétés nouvelles sont acquises (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2012 ; Site du fournisseur American Elements).

Ainsi, les propriétés antibactériennes et antifongiques des NPs de ZnO sont utilisées pour la fabrication de textiles, de matériel médical (Hackenberg, S., *et al.*, 2011), d'additifs ou d'emballages alimentaires (Song, W., *et al.*, 2010 ; Sharma, V., *et al.*, 2011), tandis que les propriétés électromagnétiques (semi-conducteur) sont utilisées pour le développement de nano-générateurs piézoélectriques ou de composants pour l'optoélectronique (Premanathan, M., *et al.*, 2010). Leurs propriétés photo-catalytiques et photo-oxydantes sont largement exploitées dans la dégradation et la minéralisation de polluants environnementaux (ou remédiation) (Manzo, S., *et al.*, 2010 ; Hackenberg, S., *et al.*, 2011). Couplées aux propriétés anticorrosives, elles sont également mises en jeu dans des colorants ou des peintures. Le ZnO est également utilisé pour la

fabrication de polymères (plastiques, caoutchouc), mais aussi de céramiques et de ciments, auxquels il confère leur stabilité et leur résistance (Jeng, H.A., *and* Swanson, J., 2006 ; Heng, B.C., *et al.*, 2010).

Cependant, les propriétés les plus exploitées du ZnO nanométrique (50-500 nm) restent ses propriétés optiques. En effet, de même que les particules de dioxyde de titane (TiO₂), le ZnO présente des propriétés intrinsèques d'opacité et d'absorption dans l'ultra-violet (UV), qui lui permettent notamment de réfléchir et de diffuser la lumière, et d'agir comme un filtre vis-à-vis des rayons UV de la lumière solaire. Pour cette raison, il entre largement dans la composition d'écrans solaires (environ 5 % des produits), qui apparaissent ainsi blancs, mais aussi dans celle de produits cosmétiques et autres produits de soin (peau et cheveux). La taille nanométrique, quant à elle, améliore les propriétés rhéologiques des crèmes solaires et des cosmétiques, et permet d'obtenir des produits plus homogènes, plus fluides et plus transparents après application sur la peau (Jeng, H.A., *and* Swanson, J., 2006 ; Osman, I.F., *et al.*, 2010 ; Osmond, M.J., *and* McCall, M.J., 2010).

Sur le plan biologique, le zinc est également un élément essentiel, impliqué dans de nombreux processus biologiques, tels que le métabolisme, la prolifération cellulaire, le contrôle de l'expression génique.... Il entre dans la composition de nombreuses enzymes, où il joue un rôle catalytique, régulateur ou structural. Un déficit en zinc peut conduire à des pathologies ou dysfonctionnements, qui nécessitent souvent la prise de compléments alimentaires. Mais d'autres pathologies peuvent survenir de même en cas d'excès de zinc, qui perturberait l'homéostasie cellulaire (Müller, K.H., *et al.*, 2010). Malgré les données de plus en plus nombreuses sur la toxicité potentielle des NPs de ZnO, cet oxyde métallique reste l'un des composés reconnus comme étant sans danger par l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA) (Premanathan, M., *et al.*, 2010).

Enfin, de même que pour le cuivre, les NPs de ZnO sont commercialisées sous forme de nanopoudres ou de suspensions, en présence ou non d'agents de dispersion, en fonction des applications envisagées.

Quelle que soit la nature des NPs, leur emploi croissant, en particulier dans les produits de consommation courante, nécessite un approfondissement des connaissances quant à leur toxicité potentielle.

3. TOXICITE DES NANOPARTICULES : LE « RISQUE NANO »

3.1. Nanotoxicologie et éconanotoxicologie

Afin de mieux répondre aux interrogations soulevées par l'utilisation croissante des nanomatériaux, la nanotoxicologie se développe parallèlement aux nanotechnologies, et vise à en étudier les risques éventuels sur l'environnement et la santé. Ainsi, dans le domaine de la recherche, l'évolution croissante des nanotechnologies est associée à la fois à une augmentation du nombre de journaux spécialisés sur le « nano-monde » (Figure 23 a), et à une augmentation du nombre de publications de nanotoxicologie, domaine qui n'existait pas il y a encore dix ans (Figure 23 b). Ainsi, les données sur la toxicité potentielle des NPs vis-à-vis des systèmes biologiques ne cessent de s'accroître.

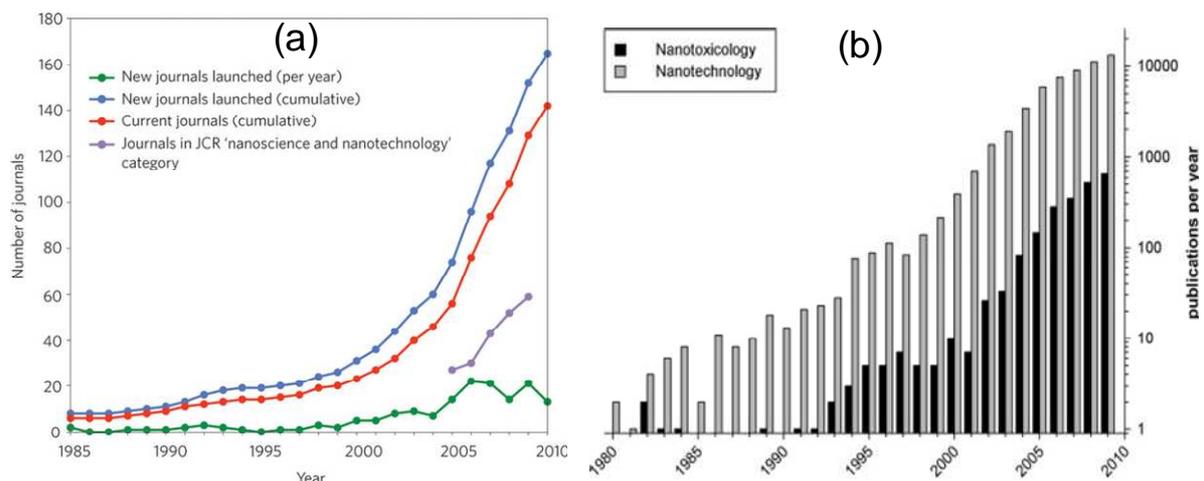


Figure 23 : Evolution du nombre de journaux sur les nanotechnologies et leurs applications (a) et du nombre de publications relatives à la toxicité des nanomatériaux sur la santé et l'environnement (b) (d'après Grieneisen, M.L., 2010 (a), et Sauer, U.G., et al., 2011 (b)).

Cependant, si la nanotoxicologie générale prend de plus en plus d'ampleur, la nanoécotoxicologie se développe beaucoup moins rapidement, et peu de données concernent encore l'impact des NPs manufacturées sur l'environnement et les écosystèmes (Kahru, A., and Savolainen, K., 2010). De plus, la majorité des études ne concernent que certains types de nanomatériaux, notamment les nanotubes de carbone, les fullerènes, l'argent, et le dioxyde de titane (Mueller, N. C., and Nowack, B., 2008 ; Kahru, A.,

and Dubourguier, H-C., 2010), et plus récemment et dans une moindre mesure les NPs à base de cuivre ou de zinc (Kahru, A., and Ivask, A., 2012) (Figure 24).

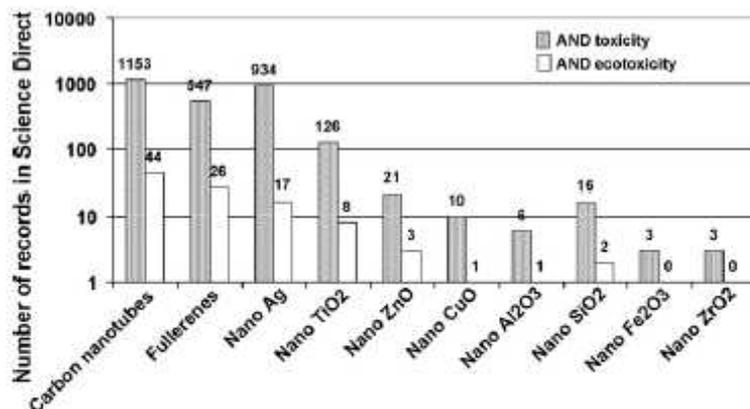


Figure 24 : Données disponibles sur les effets toxiques et écotoxiques de plusieurs types de NPs en Avril 2009 (d'après Kahru, A., and Dubourguier, H-C., 2010).

Pourtant, le relargage non contrôlé et non intentionnel de nanomatériaux manufacturés dans l'environnement est désormais un fait établi. En effet, celui-ci peut se produire aussi bien lors de l'utilisation par les consommateurs de produits contenant des NPs (par exemple vêtements, produits cosmétiques...), qu'au cours du cycle de vie des NPs ou des produits les contenant, depuis leur production jusqu'au traitement des déchets correspondants. Les nanomatériaux peuvent ainsi contaminer les efflux industriels et les eaux de traitement des déchets, l'atmosphère via les gaz d'incinération, et les sols, à l'issue du dépôt des éléments contenus dans ces gaz ou au contact des eaux contaminées (Gottschalk, F., and Nowack, B., 2011).

3.2. Modes et voies d'exposition

Le comportement et les effets des nanoparticules dans l'organisme dépendent de la forme à laquelle celui-ci est exposé d'une part, et d'autre part de la voie de pénétration des NPs, ces deux aspects étant étroitement liés. En effet, les NPs peuvent se présenter sous la forme de particules libres dans l'air, susceptibles de pénétrer préférentiellement les voies respiratoires. En revanche, intégrées à la composition

de produits manufacturés (cosmétiques, produits de santé ou d'alimentation...), ou employées à des fins biomédicales (imagerie, vectorisation de médicaments...), elles se présentent sous forme solide, gélifiée ou liquide, impactant alors directement la peau ou les voies digestives (Casals, E., *et al.*, 2008 ; Li, J.J., *et al.*, 2010 ; Crosera, M., *et al.*, 2009 ; Fröhlich, E., *and* Roblegg, E., 2012) (Figure 25).

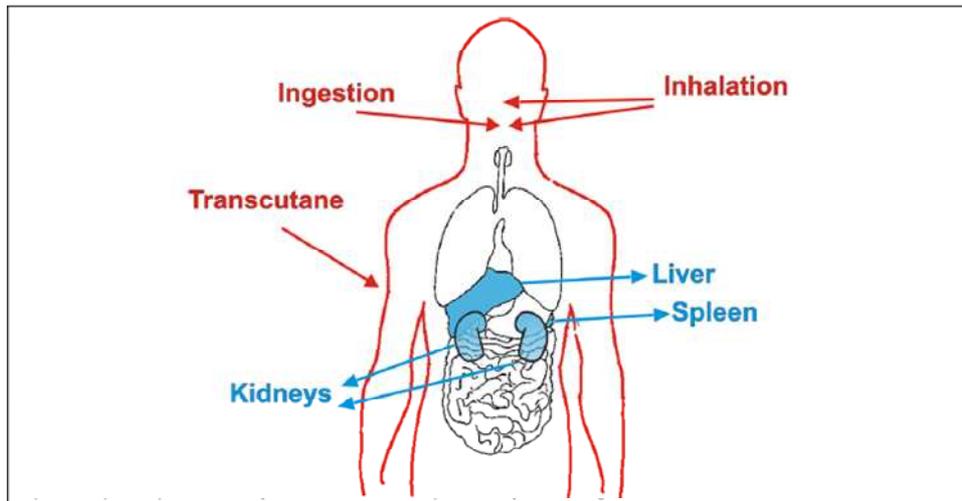


Figure 25 : Distribution possible des NPs dans l'organisme (d'après Casals, E., *et al.*, 2008). Les voies d'entrée sont principalement le derme, le tractus respiratoire et le tractus digestif. Des études montrent aussi l'accumulation des NPs dans des organes à forte capacité phagocytaire, notamment le foie (jusqu'à 90 %), les reins et la rate.

De plus, certains produits manufacturés, tels que les vêtements, pourraient libérer des NPs dans l'environnement, susceptibles de contaminer les sols et l'eau (Gottschalk, F., *and* Nowack, B., 2011). Ceci soulève des questions supplémentaires quant à l'ingestion par l'Homme d'espèces animales ou végétales issues des environnements contaminés, qui pourraient constituer une source d'exposition indirecte (Gaiser, B.K., *et al.*, 2009).

Par ailleurs, si les tissus atteints sont vascularisés ou proches des systèmes vasculaire ou lymphatique, la dissémination systémique des NPs et l'atteinte de nombreux autres organes et tissus ne sont pas à exclure (Li, J.J., *et al.*, 2010). En particulier, de nombreuses recherches s'intéressent à la toxicité des NPs sur le système nerveux central ainsi qu'à leur rôle potentiel dans les pathologies neurologiques (Yang, Z., 2010 ;

Simko, M., and Mattsson, M-O., 2010 ; Bondy, S.C., 2011). D'autres études démontrent également que certaines NPs sont capables de traverser la barrière placentaire, induisant ainsi un risque d'altération du développement foetal (Kulvietis, V., et al., 2011). Quelle que soit la voie d'exposition, il convient également de distinguer les expositions dites aiguës de celles dites chroniques.

3.3. Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur toxicité

3.3.1. Taille, forme et composition chimique

La taille régit tout d'abord la profondeur d'atteinte des NPs dans l'organisme. Lors d'une exposition par voie aérienne, plus les particules sont de petite taille, plus leur progression dans les voies bronchiques est facilitée, leur permettant ainsi d'atteindre les alvéoles pulmonaires. De même, dans le cas d'une exposition par voie cutanée, la faible taille des particules pourrait favoriser leur passage à travers la couche cornée, soit par voie inter- ou intracellulaire, soit via les pores dans glandes cutanées et follicules pileux. Leur progression dans l'épiderme puis le derme serait ainsi facilitée, et ce jusqu'à atteindre la circulation sanguine (Figure 26).

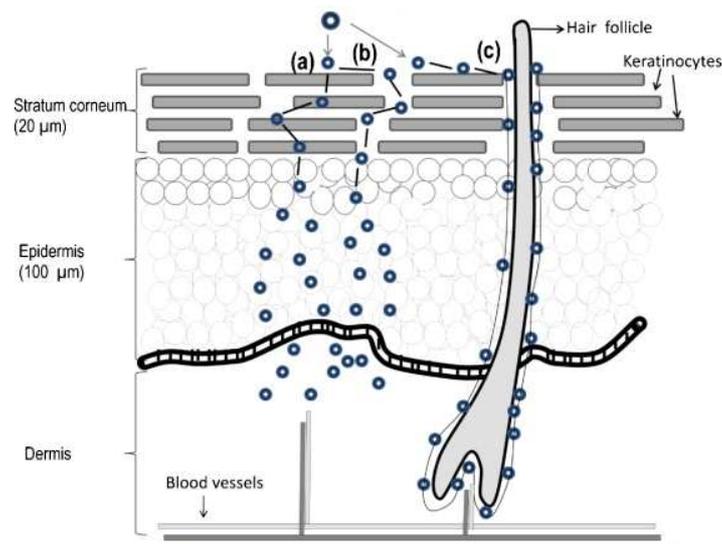


Figure 26 : Voies d'entrée hypothétiques des NPs à travers la peau (d'après Valenzuela, P., and Simon, J.A., 2012). Les NPs peuvent traverser la couche cornée (a) par voie intracellulaire, (b) par voie transcellulaire, ou (c) via les pores situés à proximité des follicules pileux (voie transappendagéale), pour atteindre l'épiderme, le derme et les vaisseaux sanguins.

Au niveau cellulaire, la taille détermine également l'efficacité et la cinétique d'internalisation des NPs par les cellules. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu : (1) la phagocytose, qui concerne les très grosses particules de un à plusieurs micromètres ou dizaines de micromètres de diamètre ; (2) la pinocytose et la macropinocytose, correspondant à l'internalisation non spécifique de fluides extracellulaires, mais aussi parfois de particules de l'ordre de quelques centaines de nanomètres à quelques μm de diamètre, respectivement ; (3) des processus d'endocytose, plus fréquents pour des NPs de taille inférieure à 200 nm, et dont la nature et l'efficacité dépendent aussi du type cellulaire et de la chimie de surface des NPs (Figure 27) (Petros, R.A., and DeSimone, J.M., 2010 ; Jiang, W., et al., 2008). De plus, il semblerait qu'il existe une taille optimale d'internalisation lors des mécanismes d'endocytose (Chithrani, B.D., et al., 2006).

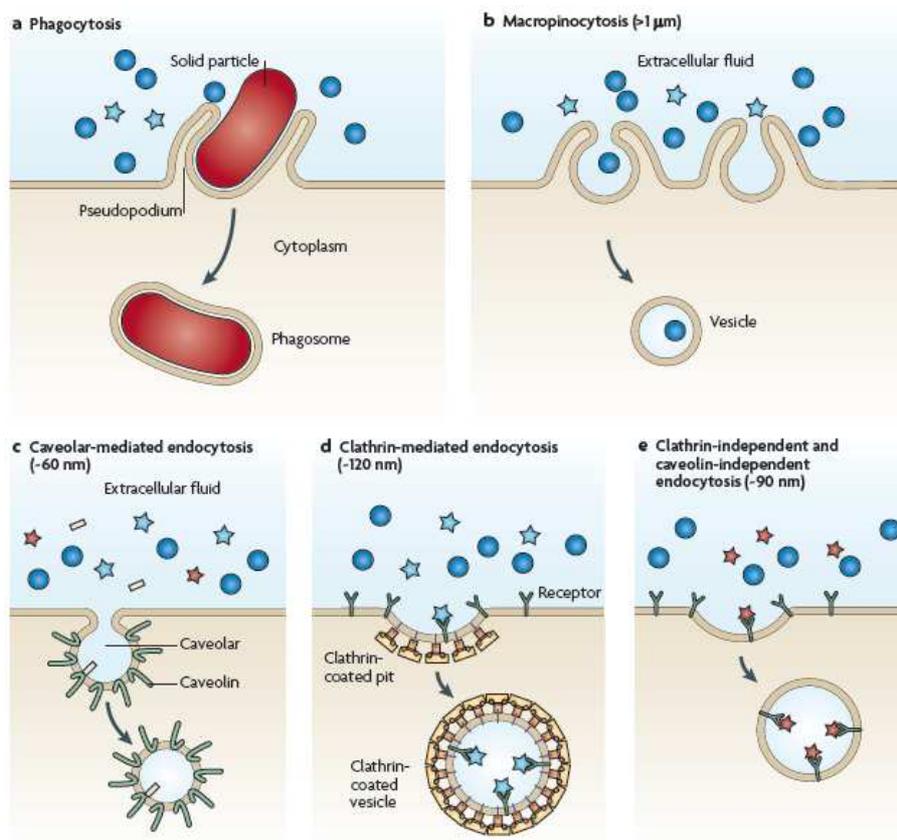


Figure 27 : Modes d'internalisation cellulaire des NPs en fonction de leur taille (d'après Petros, R.A., and DeSimone, J.M., 2010). (a) Internalisation des particules les plus grosses par phagocytose (jusqu'à $10\ \mu\text{m}$) ; (b) Internalisation non-spécifique de particules plus petites (mais $\approx 1\ \mu\text{m}$) par macropinocytose ; Internalisation des particules plus petites par endocytose cavéole-dépendante (c), clathrine-dépendante (d), ou indépendante (e), chacune ayant des contraintes de taille spécifiques.

La taille des NPs joue également un rôle important dans leurs interactions avec les protéines du milieu, qu'il s'agisse de protéines libres ou de récepteurs membranaires cellulaires. En effet, plus la taille des particules est importante, plus les protéines sont susceptibles de trouver des points d'ancrage à leur surface. L'interaction avec des récepteurs module notamment le type d'internalisation (par exemple l'endocytose clathrine-dépendante), et peut aussi déclencher l'activation en cascades de signalisations cellulaires ou de synthèses protéiques. Par ailleurs, les modifications des propriétés chimiques de surface des NPs induites par ces interactions peuvent avoir une incidence sur leur toxicité (Jiang, W., *et al.*, 2008).

La taille en elle-même n'est cependant pas le seul paramètre à considérer quant à la toxicité des NPs. Leur surface active spécifique joue en effet un rôle tout aussi important. Exprimée en m^2/g , elle est déterminée en fonction de la forme des particules, et de leur nombre par unité de masse. Ainsi, pour une masse donnée, une diminution de la taille, un degré de porosité important ou encore une forme complexe, augmentent la surface spécifique, et donc la réactivité des NPs vis-à-vis des systèmes biologiques (Fubini, B., *et al.*, 2010).

Enfin, la forme des NPs, qui peut être très variable, est aussi à prendre en compte. Il semblerait en effet que celle-ci joue également un rôle sur la cinétique d'internalisation des NPs par les cellules. Par exemple, des NPs de forme sphérique sont internalisées plus rapidement et en plus grande quantité que des particules sous forme de nanotubes de diamètre équivalent (Chithrani, B.D., *et al.*, 2007). Des études réalisées sur différentes formes de NPs de TiO_2 et de ZnO montrent que les nano-sphères sont cependant moins toxiques et plus facilement éliminées que des nanotubes de diamètre équivalent, qui s'accumulent au niveau des tissus et causent des inflammations et des fibroses (Hsiao, I.-L., *and* Huang, Y.-J., 2011 ; Porter, D.W., *et al.*, 2012).

La composition chimique des NPs est elle aussi très variable étant donné que tous les groupes de matériaux ou presque sont concernés, bien que les NPs métalliques soient les plus représentées. Ceci contribue à rendre les études toxicologiques difficiles, puisque chaque groupe est associé à une chimie de surface particulière capable d'influencer la toxicité des NPs de façon spécifique. Cependant, certaines NPs à base

de métaux s'avèrent plus toxiques que d'autres types de particules, en particulier les NPs comprenant du cuivre et du zinc (Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Lanone, S, *et al.*, 2009).

3.3.2. L'état de charge et le degré hydrophile

Les charges superficielles portées par les NPs, en particulier métalliques, ont un fort impact sur leur interaction avec les cellules. En effet, un état de charge élevé favorise l'adsorption des protéines membranaires. Les interactions les plus fortes sont cependant observées avec les NPs chargées positivement, qui peuvent se lier aux résidus négatifs présents à la surface des cellules, tels que des acides sialiques. L'internalisation de ce type de particules est donc favorisée (Fubini, B., *et al.*, 2010 ; Fröhlich, E., 2012). De plus, les NPs fortement hydrophiles semblent être les plus toxiques vis-à-vis de différents types cellulaires. En particulier, elles pourraient induire une réaction inflammatoire et réduire les capacités d'internalisation des cellules, notamment la phagocytose (Fubini, B., *et al.*, 2010).

L'état de charge est également étroitement lié au potentiel redox des NPs, en particulier métalliques, ainsi qu'à leur capacité de dissolution sous une forme ionique du métal correspondant. Il peut être déterminé par la mesure du potentiel *zeta* (mV), qui correspond à la différence de potentiel existante entre la surface de la particule et les couches stationnaires du milieu dans lequel elle est dispersée. Il est fonction de la distance entre la surface des particules et les points du milieu considérés (Figure 28). La charge et le potentiel *zeta* jouent également sur l'état de dispersion ou d'agrégation des NPs.

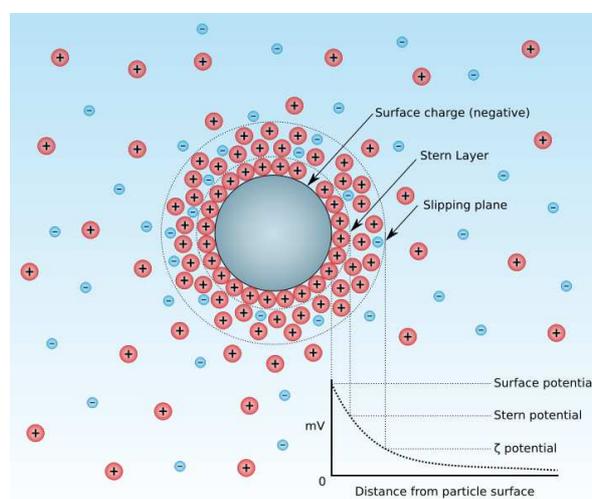


Figure 28 : Charges de surface et potentiel zeta (d'après Wikipédia, Février 2012).

3.3.3. Stabilité, agrégation et agglomération

Les NPs sont capables de former des agrégats, amas de petite taille (< 500 nm) dont la cohésion est essentiellement due à des liaisons faibles (électrostatiques, forces de Van der Waals, tensions de surface...). Ils peuvent être rompus assez facilement, notamment par sonication (Cronholm, P., *et al.*, 2011). La surface spécifique totale d'un agrégat étant la somme des surfaces des NPs qui le composent, sa réactivité biologique est susceptible d'être augmentée par rapport aux NPs isolées de même nature. En conséquence, la toxicité des agrégats de NPs doit aussi être prise en compte (Witschger, O., *and* Fabriès, J-F., 2005).

Des liaisons covalentes peuvent aussi s'établir entre des NPs libres ou entre des agrégats, pour former des agglomérats de plus grande taille (> 1 µm) et plus difficiles à disperser. Contrairement aux agrégats, la surface spécifique d'un agglomérat n'est pas forcément supérieure à celle des NPs isolées (Witschger, O., *and* Fabriès, J-F., 2005). En effet, la taille plus importante des agglomérats peut conduire à des phénomènes de sédimentation, qui diminuent leur surface active globale et peuvent engendrer la disparition de certains groupements fonctionnels de surface (Oberdörster, G., 2001). De plus, elle tend à rendre plus difficile leur internalisation par les cellules, modifiant ainsi leur toxicité (Figure 29).

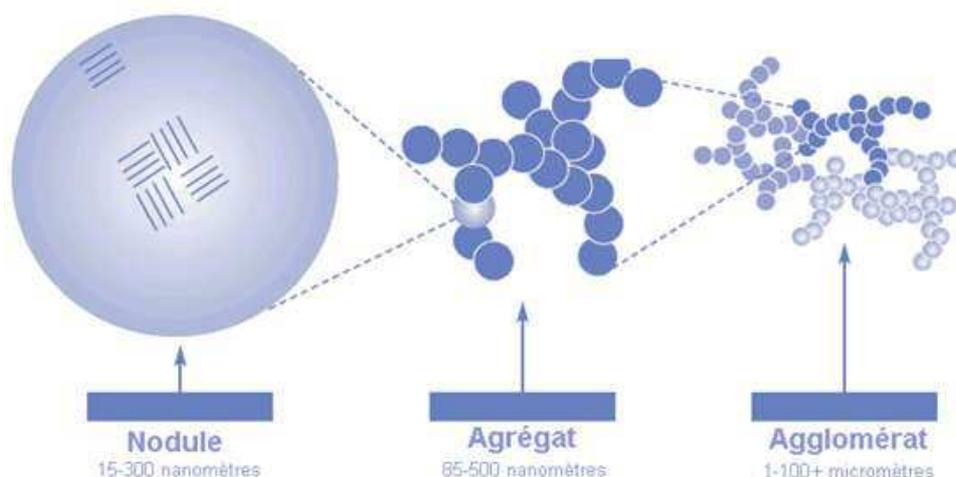


Figure 29 : Agrégation et agglomération. (D'après la Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail (CSST), Service du répertoire toxicologique, Noir de Carbone, mars 2006).

A cette première cause d'instabilité, se rajoute l'éventuelle capacité des NPs à se dissoudre. C'est en particulier le cas des NPs d'oxydes métalliques, susceptibles de libérer une certaine fraction ionique du métal correspondant, qui peut également s'avérer toxique (Midander, K, *et al.*, 2009 ; Song, W., *et al.*, 2010 ; Müller, K.H., *et al.*, 2010 ; Fröhlich, E., 2012). Cependant, les quantités d'ions libérés et leur contribution à la toxicité des NPs restent difficiles à estimer.

L'inclusion dans une matrice ou un liquide, ou encore l'utilisation d'agents d'enrobage (tensio-actifs par exemple), peuvent permettre de stabiliser les NPs (Witschger, O., *and* Fabriès, J-F., 2005). Dans les milieux biologiques naturels ou synthétiques, celles-ci peuvent aussi être stabilisées par la présence de protéines, telles que les protéines du sérum dans les milieux de culture cellulaire (Porter, D., *et al.*, 2008 ; MacCuspie, R.I., *et al.*, 2010 ; Ji, Z., *et al.*, 2010 ; Cronholm, P., *et al.*, 2011), ou par d'autres biomolécules d'origine bactérienne (Jiang, W., *et al.*, 2010).

3.4. Caractérisation des paramètres physico-chimiques des NPs

La détermination des propriétés physico-chimiques des NPs est nécessaire avant toute utilisation pour des études toxicologiques. Elle doit être la plus large et la plus précise possible, et concerne aussi bien les propriétés intrinsèques des NPs (cf. 2.2), que leur mode de préparation, de purification, de dispersion, etc. Le degré d'importance de chaque paramètre dépend ensuite de l'utilisation envisagée des NPs. Cependant, quelle que soit cette utilisation, deux groupes de paramètres apparaissent comme essentiels : la taille et les propriétés d'agrégation d'une part, et la chimie de surface et les éventuelles contaminations d'autre part (Jones, C., *and* Grainger, D.W., 2009).

3.4.1. Mesure de la taille et du degré d'agrégation

Si la définition des NPs inclut des éléments de l'ordre de la centaine de nanomètres ou moins, de nombreuses études rapportent des phénomènes plus ou moins importants d'agrégation, en particulier dans les milieux biologiques. Il existe différentes méthodes de détermination de la taille et du degré d'agrégation des NPs (Jones, C., *and* Grainger, D.W., 2009). Les principales sont les suivantes :

-
- la microscopie électronique à transmission ou à balayage : ces techniques bien établies permettent une visualisation des NPs isolées ou agrégées, fournissant ainsi des données sur leur taille, leur forme et leur structure cristalline ; elles sont surtout utilisées pour caractériser des particules métalliques. Cependant, elles impliquent des équipements onéreux, et ne sont donc pas les plus fréquemment employées. De plus, la préparation des échantillons nécessite des procédés de dessiccation pouvant induire des modifications des tensions de surface, conduisant ainsi à des artéfacts d'agrégation. Leur utilisation doit donc le plus souvent être complétée par d'autres techniques de mesure ;

 - la spectroscopie optique UV-visible : elle est basée sur les propriétés d'absorption ou de diffusion de la lumière des métaux, suite à l'excitation des électrons de surface par les photons d'une longueur d'onde particulière (excitation plasmonique) ; à une dimension donnée correspond un pic d'absorbance plasmonique spécifique. Elle est couramment employée pour les métaux purs (or, argent, cadmium, étain, indium, plomb, mercure), mais beaucoup plus difficile à mettre en place pour les oxydes métalliques, dont les propriétés plasmoniques variables modifient les énergies d'absorption du métal seul. Cette technique est également sensible aux modifications de surface liées à l'absorption non spécifique de contaminants, notamment issus des milieux biologiques.

 - la diffusion dynamique de lumière (*dynamic light scattering*, ou DLS) : c'est l'une des techniques les plus employées pour déterminer la taille des particules, aussi bien à l'échelle micrométrique que nanométrique. Elle est également basée sur les propriétés de diffusion de la lumière par les particules, mais présente l'avantage de pouvoir être appliquée à tous les types de nanomatériaux, organiques (protéines par exemple) ou inorganiques (NPs métalliques). Cependant, elle est aussi plus sensible à la présence dans le milieu de contaminants (protéines non souhaitées, sels, surfactants...), qui peuvent également influencer la stabilité des NPs. Elle nécessite donc de travailler avec des solutions les plus pures possibles, et de réaliser de nombreux tests de calibration.

D'autres techniques sont aussi disponibles, bien que moins couramment utilisées. On peut citer par exemple :

- la polarisation par fluorescence, plus largement utilisée dans le domaine biomédical (*drug discovery*) pour analyser les interactions entre NPs et ligands (récepteurs, membranes, protéines...);
- la diffraction aux rayons X (« *X-ray diffraction* », XRD), qui permet d'estimer la taille de la fraction cristalline des particules, et la diffusion aux rayons X à petit angle (« *small angle X-ray scattering* », SAXS), qui permet d'accéder à la taille globale des particules qu'elles soient cristallines ou non. Ces deux techniques sont applicables à des particules de l'ordre de 1 à 100 nm, complémentaires l'une de l'autre et sont donc souvent utilisées en parallèle pour une meilleure précision des résultats. Ceci permet par exemple de déterminer si une particule donnée ne contient qu'une phase (amorphe ou cristalline) ou plusieurs phases (cas des oxydes);
- la diffusion de lumière laser multi-angle (« *multi-angle light laser scattering* », MALLS), dont le principe est similaire à celui du DLS, mais qui est plus adapté pour les agrégats de grande taille;
- ou encore la spectrométrie de masse (« *inductively coupled plasma mass spectrometry* », ICP-MS), utilisée en particulier pour les particules contenant des métaux, et qui permet d'accéder notamment à des données quantitatives sur les particules (concentration, quantité de métal associée...), mais ne fournit pas d'informations sur leur taille. L'ICP-MS est donc à utiliser en complément d'autres méthodes telles que le DLS ou la spectroscopie optique.

3.4.2. Détermination de la chimie et des contaminations de surface

La contamination de surface des NPs peut être soit intentionnelle, en vue de la stabilisation des particules (enrobage par des polymères, des agents surfactants ou électrostatiquement chargés) ou de leur fonctionnalisation (vectorisation de médicaments), soit spontanée (adsorption passive de composés présents dans l'environnement ou les milieux biologiques, tels que des endotoxines, des lipopolysaccharides bactériens, d'autres éléments chimiques, ou encore des hydrocarbures polyaromatiques ou des phtalates) (Jones, C., and Grainger, D.W., 2009). Ces contaminations peuvent avoir

une toxicité qui leur est propre, et/ou modifier celle des nanomatériaux, comme cela a été montré par exemple dans le cas de l'arsenic (As(V)), qui semble présenter des effets toxiques synergiques avec ceux de nanoparticules de TiO₂, alors que la toxicité des deux types de composés étudiés séparément est plus faible, voire inexistante dans le cas du TiO₂ (Fröhlich, E., 2012 ; Wang, D., *et al.*, 2011).

Des tests biochimiques existent pour déterminer la présence de toxines, tels que le test colorimétrique LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) qui permet de mesurer l'activité des endotoxines présentes dans une solution. Mais la plupart des contaminants sont analysés par des mesures physiques, telles que la spectrométrie de masse d'ions secondaires (TOF-SIMS), la spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS) ou la fluorescence par rayons X (XRF), basées sur des changements énergétiques de surface des NPs contaminées.

La détermination de l'état de charge et du potentiel *zeta* vient compléter les données physico-chimiques à prendre en compte ici (cf. 2.2.2.). La charge peut parfois être évaluée par des techniques de résonance paramagnétique électronique (RPE), qui permet d'accéder au degré d'oxydation des éléments présents dans une solution. Le potentiel *zeta* quant à lui, peut être évalué par des techniques impliquant des champs électriques, telles que l'électrophorèse (mesures de mobilité électrophorétique), ou par des méthodes mettant en jeu des ondes vibratoires (méthodes électroacoustiques) (Dukhin, A.S., *and* Goetz, P.J., 2002).

3.5. Toxicité des NPs *in vivo* et *in vitro*

3.5.1. Les modèles d'étude

Les études de toxicité *in vivo* se scindent en deux groupes. Le premier concerne des NPs utilisées en ingénierie biomédicale ou thérapeutique, pour la vectorisation de médicaments, l'imagerie médicale, et le diagnostic essentiellement. Pour ces applications, les matériaux les plus fréquemment utilisés sont des polymères (vectorisation via des dendrimères, des liposomes, ou encore des NPs à base de copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique, ou PLGA), mais aussi des nanotubes de carbone, quantum dots, NPs d'or et oxydes de fer paramagnétiques (utilisés en imagerie par résonance magnétique, ou IRM). Les effets

étudiés, le plus souvent sur des rongeurs, sont généralement des effets localisés liés aux voies d'exposition principales (peau, appareils respiratoire et digestif), mais peu d'études s'intéressent à des effets au niveau systémique (Aillon, K.L., *et al.*, 2009).

Le deuxième groupe d'études concerne les effets des nanoparticules métalliques, plus fréquemment employées dans la composition des produits de consommation courante (cf. partie 1). Les modèles sélectionnés ont deux finalités : la toxicologie environnementale (éconanotoxicologie), et la toxicologie humaine (nanotoxicologie).

Les études de nanoécotoxicologie disponibles à ce jour étudient le comportement et les effets de NPs sur des organismes considérés comme modèles pour la classification des composés chimiques, notamment du point de vue du dispositif de sécurité européen REACH. Il s'agit d'organismes situés à différentes échelles de la chaîne alimentaire : bactéries des sols ou des eaux (*Escherichia*, *Bacillus*, *Vibrio*...), levures (*Saccharomyces*), algues, protozoaires ciliés, mollusques, crustacées (*Daphnia*), poissons, nématodes (*Caenorhabditis*), mais aussi insectes et plantes. Les stratégies d'études doivent par ailleurs inclure des tests de caractérisation des NPs étudiées, des essais *in vivo*, et des essais *in vitro* (cellulaires et acellulaires) (Kahru, A., *and* Dubourguier, H-C., 2010 ; Peralta-Video, J.R., *et al.*, 2011 ; Kahru, A., *and* Ivask, A., 2012).

Les modèles animaux à visée toxicologique chez l'Homme, quant à eux, sont essentiellement des rongeurs, bien que la pertinence de ce type de modèles ait été remise en cause pour les études de toxicité de NPs administrées par voie digestive, notamment du fait des différences morphologiques et fonctionnelles importantes avec l'Homme (Fröhlich, E., *and* Roblegg, E., 2012).

Les études réalisées rapportent notamment une augmentation de la mortalité, une perte de poids chez certaines espèces, et une accumulation importante des métaux dans l'organisme, sous forme particulaire ou ionique, en particulier au niveau du foie, du pancréas, de la rate, des reins, ou parfois du cerveau, suggérant des difficultés d'élimination de ces matériaux (Aillon, K.L., *et al.*, 2009 ; Shaw, B.J., *and* Handy, R.D., 2011 ; Fröhlich, E., *and* Roblegg, E., 2012). Au niveau tissulaire et cellulaire, une déstabilisation

des membranes, ainsi que des phénomènes de stress oxydant et d'inflammation sont également rapportés (Valant, J., *et al.*, 2009).

Les modèles cellulaires utilisés *in vitro* pour des études de nanotoxicologie sont constitués par une grande variété de lignées continues diploïdes ou de cellules primaires, parmi lesquelles des cellules nerveuses, pulmonaires, hépatiques, sanguines, épithéliales ou endothéliales, phagocytaires, ou encore cancéreuses. Certaines études sont aussi menées sur des microorganismes (*E.coli...*), ou des levures (*S.cerevisiae*). Le choix du type cellulaire est souvent orienté à partir de données ou d'observations *in vivo*. Il peut aussi être fonction du type de NPs et des applications envisagées. Les conditions de culture (contenants, milieux, présence ou non de sérum...) et d'exposition aux NPs (forme, dose, durée) sont aussi très variables (Jones, C.F. *and* Grainger D.W., 2009).

La présence des macrophages dans de nombreux tissus et organes, et leur rôle majeur dans la défense innée de l'organisme, en particulier leur forte capacité phagocytaire, en font un modèle de choix pour de nombreuses études *in vitro*, la toxicité des NPs étant souvent liée à leur internalisation par les cellules (Oberdörster, G., *et al.*, 2005 ; Lanone, S., *et al.*, 2009). Les principales lignées de monocytes /macrophages utilisées sont RAW264.7, J774A.1, IC-21, THP-1, Jurkat, Mono Mac-6, U937 et NR8383 (Jones, C.F. *and* Grainger D.W., 2009).

Cette diversité de modèles et de conditions d'études permet d'élargir les données sur la toxicité des NPs. Cependant, elle contribue également à compliquer leur exploitation, notamment dans un cadre réglementaire. En effet, les résultats observés peuvent différer fortement d'une lignée cellulaire à une autre. De plus, les lignées immortalisées sont généralement dérivées d'un type cellulaire, et les différences avec le type d'origine peuvent rendre contestable l'application *in vivo* de certains résultats obtenus *in vitro* (Hughes, P., *et al.*, 2007). Les cultures primaires peuvent ici constituer une alternative à l'utilisation des lignées, mais l'isolation du type cellulaire souhaité et son maintien dans des conditions de culture *in vitro* peuvent s'avérer difficiles et requièrent souvent l'utilisation de milieux complexes. Il apparaît donc ici que les deux types de modèles devraient être utilisés de façon complémentaire, pour une meilleure estimation des effets cytotoxiques des nanomatériaux (Jones, C.F. *and* Grainger D.W., 2009).

3.5.2. Cytotoxicité et génotoxicité

En toxicologie, on s'intéresse notamment à la détermination de la dose létale 50 (DL50), définie comme étant la dose à partir de laquelle le taux de mortalité concerne la moitié de la population étudiée. La détermination de la DL50 est cruciale dans le cas des NPs, afin de définir un cadre réglementaire quant aux doses de matériaux utilisés en industrie, en particulier pour les produits de consommation. Dans certains cas, il est également possible de rechercher la DL20 ou la DL30. Cependant, il est à noter que la diversité des modèles cellulaires et des modes d'exposition aux NPs donne lieu dans la littérature à des données pouvant être d'ordres de grandeur différents.

Le degré de cytotoxicité peut être évalué *in vitro* par différentes méthodes, les plus utilisées étant le test d'exclusion de colorant (le plus souvent Bleu de Trypan), qui permet d'estimer la perméabilité des membranes ; le test au Rouge Neutre, marqueur de l'intégrité des lysosomes ; ou encore le test MTT (*dimethyl-thiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromide*), qui permet d'estimer les dommages mitochondriaux (Seth, R., *et al.*, 2004). Le test « comet » est également employé pour détecter les cassures des brins d'ADN (Hackenberg, S., *et al.*, 2011). Ces méthodes sont couramment utilisées pour évaluer la toxicité des NPs, en particulier métalliques. Ainsi, les effets cytotoxiques de ces NPs se traduisent principalement par une augmentation dose-dépendante du taux de mortalité cellulaire, et des dommages au niveau des membranes, des organelles (en particulier mitochondries), et de l'ADN (Peralta-Videa, J.R., *et al.*, 2011).

L'augmentation dose-dépendante du taux de mortalité cellulaire a par exemple été observée sur des macrophages de la lignée RAW264.7 exposée à des NPs de cobalt (Kwon, Y.-M., *et al.*, 2009), mais aussi sur des cellules A549 (lignée épithéliale pulmonaire) pour différents types de NPs incluant des nanotubes de carbone et plusieurs NPs d'oxydes métalliques (TiO₂, ZnO, CuO, Fe₃O₄, ou encore Fe₂O₃) (Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Simon-Deckers, A., *et al.*, 2008 ; Jugan, M.L., *et al.*, 2011), ou encore sur des cellules dendritiques avec des NPs de TiO₂ et ZnO (Palomäki, J., *et al.*, 2010). De nombreux autres exemples relatifs à l'augmentation de la mortalité cellulaire sont présents dans la littérature. Des dommages aux membranes ont été rapportés pour des NPs d'oxyde de cérium (CeO₂) sur les lignées de cellules pulmonaires A549 et L-132 (Kim, I.-S., *et al.*, 2010), ainsi que sur des cellules Neuro-2A (neuroblastome de souris) pour différentes

NPs métalliques (ZnO, TiO₂, Al₂O₃, Fe₃O₄ et CrO₃) (Jeng, H.A., and Swanson, J., 2006). Ces dommages peuvent aussi avoir des effets néfastes sur l'adhésion cellulaire. Enfin, des dommages à l'ADN ont été observés pour des particules de TiO₂ sur des cellules A549 (Jugan, M.L., et al., 2012) et Hep-2 (dérivée de cellules HeLa) (Osman, I.F., et al., 2010), ainsi qu'avec des nanotubes de carbone sur des cellules A549 (Karlsson, H.L., et al., 2008), ou encore pour des NPs de nickel sur des cellules de la lignée tumorale K562 (Muñoz, A., and Costa, M., 2012).

3.5.3. Induction d'un stress oxydant

Le stress oxydant est un concept relativement récent. Il a été introduit au début des années 1990, et est défini comme un ensemble de perturbations de l'équilibre naturel existant entre les espèces pro- et anti-oxydantes, le déséquilibre se faisant en faveur des composés pro-oxydants, et pouvant conduire à des dommages cellulaires (Figure 30) (Kelly, F.J., 2003). Le stress oxydant est le plus souvent évalué par la mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites dans des conditions données.

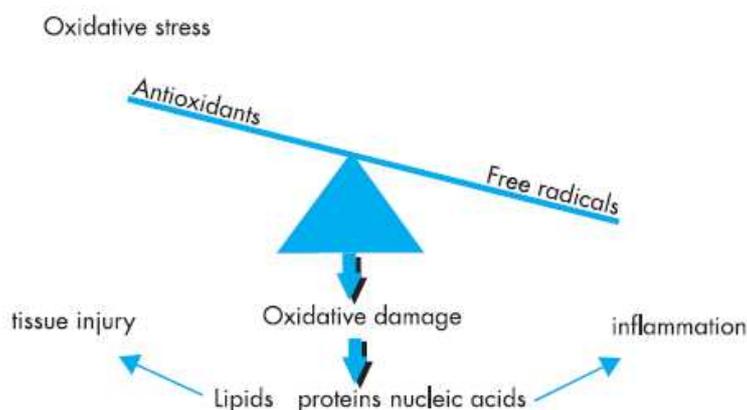


Figure 30 : Modélisation des causes et des effets du stress oxydant (d'après Kelly, F.J., 2003).

Le stress oxydant peut être dû à des facteurs exogènes, tels que l'exposition à des radiations ou des agents cancérogènes, le tabagisme, la prise de certains médicaments ou d'alcool, la présence d'agents infectieux, mais aussi de polluants atmosphériques, ou de particules (Forman, H.J., and Torres, M., 2002). En effet, la plupart des études de toxicité des NPs mettent en évidence l'association entre l'exposition aux nanomatériaux et la production de ROS, en particulier dans le cas des NPs métalliques, notamment du fait

de leur nature chimique (Park, E.-J., *et al.*, 2008 ; Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Sharma, V., *et al.*, 2011). Les métaux qui les composent peuvent en effet interférer avec les métaux intracellulaires et perturber leur homéostasie (Kao, Y.-Y., *et al.*, 2012). Certaines études suggèrent de plus que ces perturbations seraient en partie causées par la dissolution partielle des NPs en ions métalliques (Song, W., *et al.*, 2010 ; Xia, T., *et al.*, 2008). Cependant, si les ions présentent une toxicité qui leur est propre et sont en effet capables de générer des ROS au niveau cellulaire, ils n'expliquent par toujours la toxicité des NPs (Midander, K., *et al.*, 2009 ; Shaw, B.J., *and* Handy, R.D., 2011).

3.5.4. Inflammation et atteintes du système immunitaire

Dans le cas des modèles cellulaires immunitaires, la génération de ROS suite à l'exposition à des NPs, en particulier métalliques, s'accompagne souvent de la mise en place d'une réaction inflammatoire, à laquelle les ROS contribuent fortement.

Ainsi, plusieurs études rapportent l'activation de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) associée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-13, IL-17, IL-25, MIP-1, IFN- γ , TNF- α ...) et de composés chimio-attracteurs (Kang, C.-M., *et al.*, 2005 ; Palomäki, J., *et al.*, 2010 ; Roy, R., *et al.*, 2011).

L'inflammation a aussi été observée sur d'autres types cellulaires, tels que des kératinocytes ou des cellules épithéliales pulmonaires (cellules non phagocytaires), résultant également en la production d'interleukines et de TNF- α (Rothen-Rutishauser, B., *et al.*, 2007 ; Yazdi, A.S., *et al.*, 2010).

3.6. Toxicité des nanoparticules étudiées

3.6.1. Le cuivre et l'oxyde de cuivre

La toxicité des NPs de cuivre (Cu) et d'oxyde de cuivre (CuO) a déjà été évaluée sur de nombreux modèles cellulaires et par des approches variées, globales ou ciblées, comprenant des analyses de viabilité et des mesures de paramètres traduisant des dommages intracellulaires (dommages structuraux, stress oxydant,

inflammation...). Par ailleurs, malgré les nombreuses applications du cuivre, les études s'intéressant au CuO sont plus nombreuses.

Il apparaît tout d'abord que la taille nanométrique est un élément essentiel dans la toxicité des NPs à base de cuivre, qui induisent ainsi un taux de mortalité cellulaire supérieur à celui causé par des particules de même nature à l'échelle micrométrique (Figure 31). Les dommages intracellulaires causés par les deux types de NPs sont également plus marqués. Ceci n'est cependant pas forcément le cas pour d'autres types de NPs métalliques : par exemple la forme micrométrique de particules de TiO₂ cause plus de dommages que la forme nanométrique, et les oxydes de fer présentent une toxicité faible quelle que soit leur taille (Karlsson, H.L., *et al.*, 2009 ; Midander, K., *et al.*, 2009).

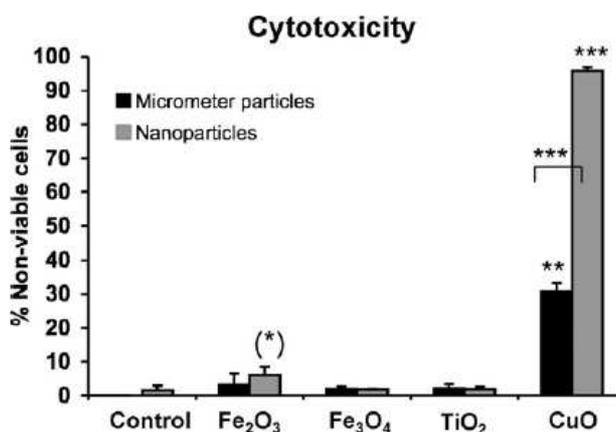


Figure 31 : Comparaison de la cytotoxicité des nano- et microparticules de différents oxydes métalliques (d'après Karlsson, H.L., *et al.*, 2009).

La toxicité des NPs de Cu et CuO est par ailleurs associée à des dommages à l'ADN, particulièrement importants avec le Cu (Midander, K., *et al.*, 2009). Le Cu induit également un stress oxydant et l'activation de certaines voies impliquées dans l'apoptose (protéines Bcl-2) et la signalisation de l'inflammation (p38-MAPK, NFκB, ERK1/2) sur des modèles cellulaires hépatiques (Manna, P., *et al.*, 2011).

Le CuO se montre quant à lui plus toxique que d'autres NPs métalliques sur des cellules épithéliales pulmonaires A549, induisant notamment des dommages importants au niveau des mitochondries, ainsi que la production accrue de ROS intracellulaires (Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Karlsson, H.L., *et al.*, 2009). Des

études réalisées sur la lignée épithéliale HEP-2 montrent que les ROS produits sont aussi associés à une augmentation de glutathion oxydé (GSSG), suggérant l'induction d'un stress oxydant, dont les conséquences peuvent être limitées par un co-traitement avec des composés antioxydants (Fahmy, B., *and* Cormier, S.A., 2009).

Des analyses d'expression génomique sur les cellules A549 exposée au CuO rapportent également la sous-expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire, et l'induction de gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et la mort cellulaire (Hanagata, N., *et al.*, 2011). D'autres travaux réalisés sur la lignée d'hépatocarcinome HepG2 suggèrent que les NPs de CuO, comme le Cu, induisent à la fois un stress oxydant (production accrue de ROS) et une réponse inflammatoire, caractérisée par une surexpression de gènes d'interleukines et chimiokines pro-inflammatoires et de gènes de facteurs de transcription régulant ces mêmes cytokines (notamment NFκB et AP-1). De plus, les voies de signalisation MAPK, ERKs et JNK accompagnant généralement l'inflammation sont aussi activées par les NPs de CuO (Piret, J.-P., *et al.*, 2012).

Enfin, la dissolution des NPs de Cu et CuO et la contribution des ions cuivre libérés à la toxicité des NPs ne sont pas vraiment élucidés à ce jour. En effet, certaines études démontrent que les deux types de NPs peuvent libérer dans le milieu des quantités considérables d'ions par comparaison aux microparticules de même nature, pouvant avoir un impact sur les effets cytotoxiques observés (Hanagata, N., *et al.*, 2011). En revanche, d'autres mettent en évidence une contribution mineure des ions (Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Midander, K., *et al.*, 2009 ; Piret, J.-P., *et al.*, 2012).

Cette différence peut s'expliquer notamment par le fait que la dissolution des NPs métalliques est un paramètre difficile à mesurer. En effet, le degré de dissolution des NPs dans un milieu donné peut varier en fonction de sa composition et des propriétés des cellules (protéines, agents oxydants, composés chélateurs...). De plus, selon le type cellulaire, une certaine fraction des NPs peut avoir été internalisée, dont les quantités ne peuvent pas toujours être connues, diminuant ainsi la fraction extracellulaire des NPs, mais donnant peut-être lieu à des mécanismes de dissolution intracellulaire auxquels il est également difficile d'accéder. Enfin, la mesure en elle-même peut être impactée par la présence de NPs si elles n'ont

pas été éliminées en totalité, mais aussi par d'autres ions pouvant interférer avec les dosages, ou encore par des protéines capables de complexer les ions métalliques. Compte-tenu de tous ces éléments, il reste difficile de conclure quant à la contribution des ions à la toxicité des NPs à base de cuivre.

3.6.2. L'oxyde de zinc

Les NPs de ZnO sont largement étudiées compte tenu de leur utilisation dans des produits de consommation courante tels que les écrans solaires. Les paramètres analysés sont généralement les mêmes que ceux étudiés pour les NPs de Cu et CuO.

Des études montrent que le ZnO peut tout d'abord affecter la forme et la structure des cellules, et causer notamment des dommages membranaires de façon plus marquée que d'autres NPs d'oxydes métalliques telles que TiO₂, Al₂O₃ ou Fe₃O₄ (Jeng, H.A., *and* Swanson, J., 2006). La viabilité cellulaire est également affectée, et ce sur différents types cellulaires, tels que des cellules pulmonaires A549 et BEAS-2B, des cellules primaires de la muqueuse nasale, des cellules hépatiques HepG2, ou encore des cellules de la lignée de macrophages RAW264.7 et des macrophages primaires péritonéaux (Karlsson, H.L., *et al.*, 2008 ; Hackenberg, S., *et al.*, 2011 ; Sharma, V., *et al.*, 2011 ; Xia, T., *et al.*, 2008 ; Palomäki, J., *et al.*, 2010 ; Roy, R., *et al.*, 2011). Des mécanismes d'apoptose ont également été mis en évidence sur d'autres lignées cellulaires (Wahab, R., *et al.*, 2010).

Ces études montrent également que, comme précédemment pour le cuivre, la toxicité du ZnO est associée à des dommages à l'ADN et aux mitochondries, ainsi qu'à un état de stress oxydant accompagné de la production accrue de ROS par les cellules (Hackenberg, S., *et al.*, 2011 ; Sharma, V., *et al.*, 2011). De même que pour le cuivre, des études tendent à mettre en évidence que le stress oxydant et la génération des ROS pourraient être en partie liés à la dissolution partielle des NPs sous forme ionique, dont l'entrée dans les cellules serait facilitée par rapport aux particules, et qui perturberaient l'homéostasie des métaux contribuant ainsi fortement à la cytotoxicité (Figure 32) (Xia, T., *et al.*, 2008 ; Song, W., *et al.*, 2010 ; Kao, Y.-Y., *et al.*, 2012).

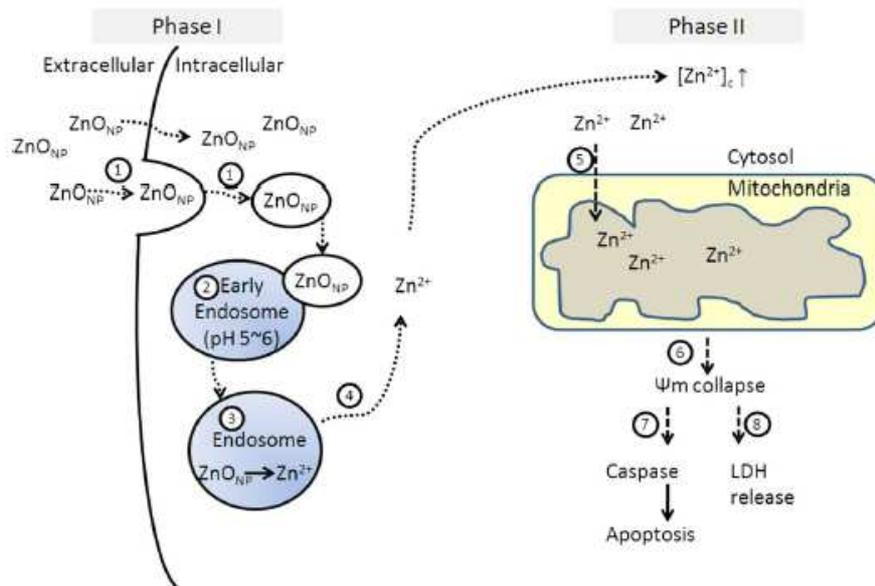


Figure 32 : Cytotoxicité des NPs de ZnO et contribution de leur dissolution (d'après Kao, Y.-Y., et al., 2012).

Phase I : L'entrée des NPs et leur dissolution induisent une élévation de la concentration en Zn^{2+} cytoplasmique ($[Zn^{2+}]_c$). (1) Internalisation des ZnO-NPs par endocytose. (2) Fusion des vésicules d'endocytose avec des endosomes précoces. (3) Les NPs se dissolvent à pH acide dans les endosomes. (4) Les ions diffusent dans le cytosol et augmentent $[Zn^{2+}]_c$. Phase II : (5) les ions sont séquestrés dans les mitochondries, élevant la concentration $[Zn^{2+}]_m$. (6) Cette élévation induit une brusque variation du potentiel transmembranaire mitochondrial, qui active les voies de l'apoptose via les caspases (7) et la libération de lactate déshydrogénase (LDH) (8).

L'inflammation a également été associée à l'exposition de certains types cellulaires aux NPs de ZnO. Ainsi, des cellules primaires de la muqueuse nasale exposées à des NPs de l'ordre de 100 nm, à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 24 heures (correspondant à la DL20 sur ces cellules) sécrètent de l'IL-8, cytokine connue pour intervenir dans le recrutement de cellules immunitaires et le développement de l'inflammation. De plus, la réponse observée est de même amplitude que celle résultant de l'action du LPS sur les mêmes cellules (Hackenberg, S., et al., 2011). Cependant, l'activation de l'inflammation par le ZnO sur des modèles immunitaires est quant à elle controversée. En effet, certaines études rapportent la production de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-1 β , IL-6, TNF- α , et MIP-1 α) par des macrophages de la lignée RAW264.7, et concluent que les NPs de ZnO activent les mécanismes de l'inflammation de ces cellules (Palomäki, J., et al., 2010). En revanche, d'autres études réalisées sur la lignée de macrophages THP1 mettent en évidence l'absence de production d'IL-1 β avec des NPs de ZnO, alors que cette réponse est observée avec des NPs de TiO₂ et SiO₂ (Yazdi, A.S., et al., 2010). Cette étude rapporte

également la production d'IL-1 α par des kératinocytes en co-culture avec des cellules dendritiques en présence de TiO₂ et de SiO₂, mais pas en présence de ZnO. Les auteurs concluent que la toxicité des NPs de ZnO ne passe pas par une activation de l'inflammation sur les THP1.

Les différences observées entre ces deux études ne proviennent pas de différences structurales entre les NPs utilisées, puisqu'elles sont de tailles équivalentes (15 et 20 nm). Elles peuvent néanmoins s'expliquer tout d'abord par des différences physiologiques entre les deux types cellulaires, qui pourraient réagir différemment vis-à-vis des mêmes NPs. De plus, les doses et les durées d'exposition des cellules sont très différentes : les RAW264.7 ont été traitées pendant 24 à 48 heures avec des doses de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alors que les THP1 n'ont été exposées que pendant 6 heures à des doses de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il est donc possible que cette seconde durée soit insuffisante pour observer une réponse, malgré la dose élevée en ZnO. Par ailleurs, les doses employées sur les RAW264.7 correspondent également à des taux de mortalité élevés (de l'ordre de 60 à 65 %). Il semble donc cohérent qu'à de telles doses les fonctions des macrophages soient fortement perturbées et que les cellules répondent à ce stress par des mécanismes d'inflammation. Enfin, les résultats obtenus pour les NPs dans ces mêmes travaux sont aussi à mettre en perspective, dans la mesure où les réponses observées sont généralement moindres par rapport à celles induites par le LPS.

Enfin, une étude réalisée récemment sur des macrophages primaires de souris montre de plus que la forme nanoparticulaire du ZnO induit une production de ROS et de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IFN- γ notamment) supérieure à celle induite par des particules de taille plus importante, alors qu'elles seraient moins facilement internalisées que les grandes particules. Ceci met une fois de plus en évidence l'importance de la taille des NPs dans leur toxicité (Roy, R., *et al.*, 2011). Concernant l'inflammation, les cellules ont ici été traitées pendant 4 heures avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPs de ZnO de 50 nm. La production des cytokines pro-inflammatoires à une dose aussi faible sur une durée courte pourrait s'expliquer notamment par la forte réactivité des cellules primaires par rapport aux lignées. De façon générale, l'ensemble de ces données montre qu'il convient de rester prudent quant à la relation entre les NPs de ZnO et l'inflammation, qui dépend fortement du type cellulaire, ainsi que des doses et des durées d'exposition.

4. L'APPROCHE PROTEOMIQUE

4.1. Définitions et stratégies

La biologie des systèmes, qui vise à comprendre à la fois sur un plan structural et dynamique comment un système donné s'adapte et évolue en fonction de son environnement, a longtemps été conduite par les dogmes de la biologie moléculaire, s'appuyant d'abord sur l'étude des génomes (ensembles de gènes), puis sur celle de leurs produits d'expression, les transcriptomes (ensemble des ARN, ou transcrits) (Wright, P.C., *et al.*, 2012). Les domaines d'études de ces deux ensembles d'entités, respectivement appelés génomique et transcriptomique, ont conduit au séquençage de nombreux génomes dont celui de l'Homme, et à l'accumulation des séquences dans les banques de données génomiques.

Cependant, celles-ci se sont avérées insuffisantes pour comprendre les fonctions des protéines codées par ces séquences, et ainsi établir le lien entre le génome et le phénotype. L'exemple le plus fréquemment cité est celui de la chenille et du papillon (Figure 33), possédant tous deux le même génome, mais exprimant deux phénotypes très éloignés à deux stades différents de leur développement, chacun de ces phénotypes étant lié à l'expression de protéines spécifiques (Lottspeich, F., 1999).



Figure 33 : De la chenille au papillon : un génome, deux protéomes (d'après Lottspeich, F., 1999).

Cet exemple fait donc clairement apparaître la nécessité de s'intéresser directement aux protéines, plus proches du phénotype exprimé dans un ensemble de conditions données. Ainsi, le terme « protéome » a été employé pour la première fois par Marc Wilkins en 1994, et proposé peu après à la communauté scientifique (Wasinger, V.C., *et al.*, 1995 ; Wilkins, M.R., *et al.*, 1996). Il correspond à l'ensemble des

protéines exprimées par un génome dans un système donné (organisme entier, organe, tissu, cellule, organelle...), à un moment précis, et dans des conditions particulières.

La diversité des protéomes est liée à plusieurs aspects : (1) une séquence ADN peut coder pour plusieurs transcrits ; (2) la maturation des transcrits (modifications, épissages, ou dégradation) peut donner plusieurs protéines, et leur niveau d'expression n'est donc pas forcément corrélé à celui des protéines réellement actives ; (3) les protéines peuvent subir à leur tour des modifications post-traductionnelles, pouvant donner plusieurs isoformes (Rotilio, D., *et al.*, 2012 ; Angel, T.E., *et al.*, 2012). Aussi, la complexité de l'information augmente lorsque l'on passe du génome au protéome : chez l'Homme, on dénombre environ 20 000 gènes, à l'origine de plus de 10^7 formes protéiques différentes. Enfin, contrairement au génome, le protéome est dynamique, et varie à la fois chimiquement, temporellement et spatialement, et parfois en réponse à un stimulus, un stress, ou une pathologie (Angel, T.E., *et al.*, 2012 ; Diz, A.P., *et al.*, 2012).

Par analogie avec la génomique et la transcriptomique, le terme « protéomique », introduit en 1997, désigne la science qui étudie les protéomes (James, P., 1997). Celle-ci inclut aujourd'hui non seulement l'identification et la quantification des protéines, mais aussi l'étude de leurs dynamiques d'expression, leur régulation, leurs modifications, leurs fonctions et leurs interactions (Diz, A.P., *et al.*, 2012 ; Di Palma, S., *et al.*, 2012 ; Wright, P.C., *et al.*, 2012).

L'évolution rapide de la protéomique est issue de la convergence de plusieurs technologies marquées par des développements importants, en particulier depuis les années 1990 : (1) des techniques de séparation des protéines ou des peptides, imposées par la complexité des échantillons biologiques analysés ; (2) des outils de spectrométrie de masse, permettant l'analyse qualitative et quantitative à haut débit des protéines ou peptides issus de ces échantillons ; (3) des outils de bioinformatique, nécessaires à l'analyse et au traitement des données, générées en grande quantité par les analyses (Rotilio, D., *et al.*, 2012). Les technologies mises en œuvre aujourd'hui permettent ainsi de visualiser, de comparer, d'identifier ou encore de quantifier jusqu'à plusieurs centaines ou milliers de protéines en une seule expérience, soit dans une approche exploratoire globale, soit dans le cadre de la validation d'hypothèses (Diz, A.P., *et al.*, 2012).

En pratique, deux types de stratégies peuvent être employés pour conduire une analyse protéomique : d'une part les stratégies de type « *top-down* », relativement peu utilisées, et qui consistent à analyser les protéines entières par spectrométrie de masse, et d'autre part les stratégies de type « *bottom-up* », qui requièrent la digestion enzymatique des protéines en peptides, dont l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet ensuite l'identification des protéines (Zhang, X., *et al.*, 2010 ; Wu, Q., *et al.*, 2012). Ce type d'approche est largement plus utilisé, car l'analyse de peptides s'avère plus précise et plus simple à mettre en œuvre que celle de protéines entières. En particulier, leur taille plus petite augmente leur solubilité et donc leur manipulation, et leurs propriétés chimiques sont plus favorables à l'analyse par spectrométrie de masse (mesure de masse plus précise notamment) (Di Palma, S., *et al.*, 2012).

En revanche, la digestion des protéines en peptides augmente encore la complexité des échantillons, ce qui renforce la nécessité d'employer des méthodes de séparation à différentes étapes de l'analyse, en amont ou en aval de l'étape de digestion enzymatique (Wright, P.C., *et al.*, 2012 ; Zhang, X., *et al.*, 2010 ; Wu, Q., *et al.*, 2012). Ainsi, les stratégies *bottom-up* regroupent plusieurs approches, illustrées sur la Figure 34.

Ainsi, l'analyse protéomique se décompose en plusieurs grandes étapes, qui seront détaillées par la suite : (1) la préparation de l'échantillon protéique ; (2) la séparation des protéines entières, ou des peptides si l'échantillon a déjà été soumis à une digestion enzymatique ; (3) l'identification des peptides, puis des protéines par spectrométrie de masse, à l'aide d'outils bioinformatiques.

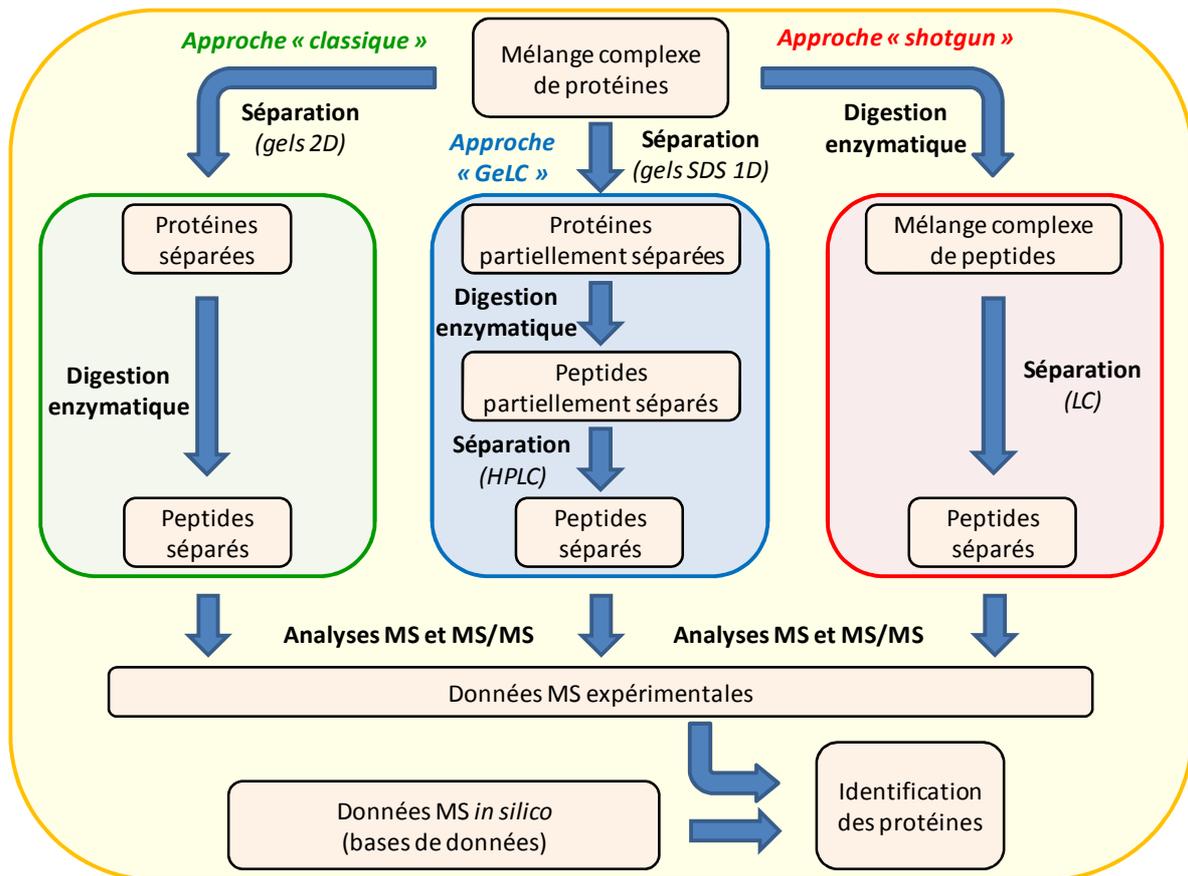


Figure 34 : L'analyse protéomique selon la stratégie « bottom-up » : approche classique, de type « shotgun », ou intermédiaire par GeLC. Les trois approches conduisent à l'obtention de mélanges plus ou moins complexes de peptides, qui sont ensuite analysés par spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS) en vue de l'identification des protéines de l'échantillon d'origine.

4.2. Préparation de l'échantillon protéique

L'extraction des protéines à partir des échantillons biologiques constitue la première étape de toute analyse protéomique. Elle est conditionnée à la fois par le type d'échantillons (culture cellulaire, fluide biologique...) et par la stratégie d'analyse envisagée. Ainsi, dans le cas fréquent de protéines extraites à partir de cultures cellulaires, l'extraction nécessite la lyse des cellules (dissolution des lipides membranaires notamment) dans un tampon adéquat, qui doit également être adapté à la méthode de séparation choisie.

Par exemple, si la séparation est envisagée par isoélectrofocalisation (IEF), basée sur le point isoélectrique des protéines, le tampon de lyse ne doit pas contenir de détergents chargés, tels que le sodium dodécylsulfate (SDS), susceptibles de modifier la charge initiale des protéines. En revanche, il est possible

d'utiliser des détergents non chargés tels que le Triton X-100 ou le CHAPS (3-[[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-1-propanesulfonate). Par ailleurs, les hauts voltages utilisés pour l'IEF imposent également de travailler avec des solutions de force ionique faible, contenant donc des quantités limitées de sels. De telles conditions peuvent cependant diminuer la solubilité des protéines et rendre difficile la rupture des interactions ioniques entre protéines - protéines d'une part et protéines - acides nucléiques d'autre part. Là encore, l'utilisation des détergents non ioniques permet de contourner cette contrainte. Combinés à des agents chaotropes (urée, thiourée...) et réducteurs (dithiothréitol (DTT), Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)), ils permettent la solubilisation et la dénaturation des protéines sans modification de leur charge (Rabilloud, T., *and* Lelong, C., 2011). L'ajout d'agents précipitant les acides nucléiques, tels que la spermine, dans des solutions à pH élevé, permet quant à elle de rompre les interactions moléculaires impliquant les acides nucléiques. De plus, la préparation des échantillons peut aussi s'accompagner de modifications des protéines induites par certains agents utilisés, notamment les chaotropes (carbamylation par exemple). Ceci peut également être limité par l'ajout d'ampholytes, qui seront modifiés préférentiellement. Enfin, à l'ensemble de ces contraintes se rajoutent les propriétés de viscosité des échantillons, qui peuvent interférer avec la séparation des protéines. Dans le cas d'une lyse cellulaire, il est possible de limiter la viscosité en diluant fortement l'échantillon dans le tampon de lyse, ce qui améliore également la dénaturation des protéines.

Dans certains cas, il peut être intéressant de s'intéresser à certains compartiments subcellulaires (noyaux, vésicules intracellulaires...). De telles études nécessitent une étape supplémentaire de fractionnement en vue de la simplification de l'échantillon protéique, qui peut être réalisée de façon mécanique, ou encore par ultracentrifugation. D'autres types d'études s'intéressent aux protéines de la fraction sécrétée par un type cellulaire donné (sécrétome), comme c'est le cas pour la recherche de certains biomarqueurs par exemple. Dans ces deux types de situation, le faible rendement des méthodes d'extraction est aussi à prendre en compte et nécessite souvent une quantité importante de matériel biologique. Ainsi, dans le cas des sécrétomes, une étape de précipitation des protéines en présence d'acide trichloroacétique (TCA) et de sodium lauroylsarcosinate (ou sarkosyl) permet de concentrer les protéines de l'échantillon de manière reproductible sans concentrer les sels (Chevallet, M., *et al.*, 2007). Enfin, l'étude de protéomes particuliers

peut aussi nécessiter des adaptations supplémentaires des méthodes d'extraction (rupture de la paroi de cellules bactériennes ou végétales), ou d'élimination des acides nucléiques (protéomes bactériens ou nucléaires). Quels que soient les protéomes ciblés et les protocoles choisis, il est important de conserver un certain degré de simplicité afin d'assurer une meilleure reproductibilité dans les étapes suivantes de l'analyse.

4.3. Séparation des protéines ou des peptides

Une fois les protéines extraites, il est impératif de les séparer afin de pouvoir les analyser individuellement. Plusieurs techniques de séparation existent et sont en développement constant. Elles peuvent être regroupées en deux classes distinctes : les méthodes sur gel (ou « *in-gel* ») et les méthodes en solution (ou « *gel-free* »).

4.3.1. Les méthodes de séparation « in-gel »

La séparation sur gel est basée sur les deux propriétés principales des protéines : leur charge (point isoélectrique) et leur poids moléculaire. Selon la complexité de l'échantillon et les étapes suivantes de l'analyse, cette séparation peut se faire par électrophorèse monodimensionnelle (1D) ou bidimensionnelle (2D).

L'électrophorèse 1D (SDS-PAGE), introduite au début des années 1970, permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Chaque bande obtenue peut cependant encore contenir plusieurs protéines, de poids moléculaire identique mais dont les points isoélectriques peuvent être différents (Figure 35). Cette méthode ne permet donc de séparer ni les différentes isoformes d'une même protéine ni des protéines différentes de même masse, et requiert des étapes ultérieures de séparation, généralement par chromatographies.

L'emploi de l'électrophorèse 2D, développée quelques années plus tard, permet de s'affranchir de cette limitation. En effet, les protéines sont ici séparées en deux temps : une première dimension les sépare

d'abord selon leur point isoélectrique (IEF), puis une deuxième dimension permet de les séparer selon leur poids moléculaire (Figure 35).

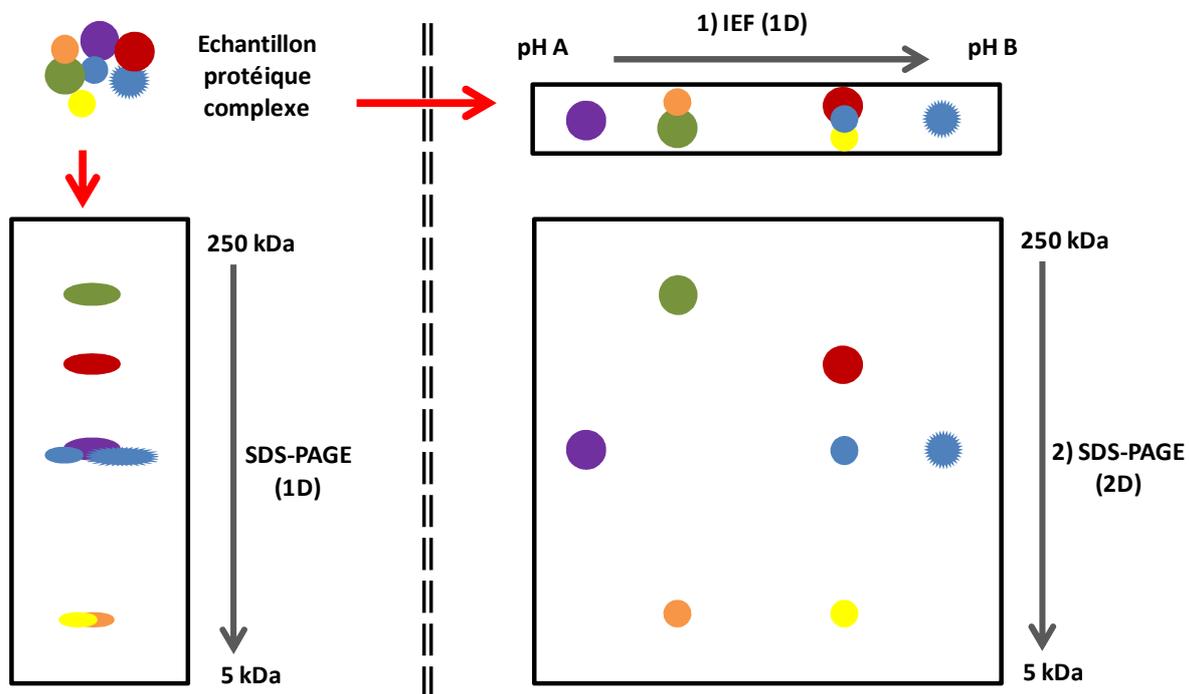


Figure 35 : Principe schématique de séparation des protéines par électrophorèse 1D (gauche) ou 2D (droite). L'électrophorèse 2D présente l'avantage de permettre la séparation de protéines de même poids moléculaire mais de point isoélectrique différent, notamment les isoformes d'une protéine donnée (ici en bleu).

Par ailleurs, les développements de l'électrophorèse 2D au cours des dernières décennies ont conduit à des techniques permettant aujourd'hui de résoudre correctement jusqu'à 10000 spots uniques, pouvant correspondre à près de 1000 protéines et isoformes différentes (Görg, A., *et al.*, 2009). La détection et la visualisation de ces spots nécessite une étape de coloration des gels 2D. Plusieurs méthodes sont aujourd'hui employées, en fonction là encore de l'approche d'analyse choisie. On peut cependant distinguer trois principales méthodes de coloration : (1) la coloration fluorescente, relativement sensible et linéaire, qui est principalement utilisée pour les colorations différentielles (« *differential gel electrophoresis* », ou 2D-DIGE) ; (2) la coloration au Bleu de Coomassie colloïdal, qui présente une sensibilité moyenne et un seuil de détection de l'ordre de la picomole, mais est parfaitement compatible avec une analyse par spectrométrie de masse en aval et permet également une analyse quantitative du fait

de sa linéarité ; (3) la coloration au nitrate d'argent, beaucoup plus sensible (seuil de détection de l'ordre de la femtomole), mais non linéaire, ce qui résulte en un phénomène de saturation et des difficultés de quantification. De plus, les sels d'argent formés peuvent rendre difficile l'analyse par spectrométrie de masse, et imposent donc une étape de décoloration au préalable (Richert, S., *et al.*, 2004).

Quel que soit le type de coloration pour lequel on opte, l'électrophorèse 2D demeure une technique d'analyse protéomique robuste et reproductible. En outre, l'utilisation au cours de l'IEF d'un gradient de pH immobilisé sur gel de polyacrylamide, outil développé vers la fin des années 1980, contribue à la robustesse et à la reproductibilité de cette méthode. Ainsi, aujourd'hui, on considère que les sources de variabilité dans une telle approche sont essentiellement situées en amont ou en aval de la 2D (préparation d'échantillon, méthodes de détection et d'analyse d'images des gels...) (Rabilloud, T., *et al.*, 2010).

Cependant, cette méthode présente tout de même des limitations. Tout d'abord, et compte tenu des étapes préalables de préparation d'échantillons, les gels 2D ne permettent de visualiser que les protéines les plus abondantes, ce qui dans certains cas ne représente qu'une faible fraction du protéome total (de l'ordre de 10% des protéines exprimées par un type cellulaire). Il apparaît donc essentiel d'utiliser cette technique sur des échantillons les moins complexes possibles (Rabilloud, T., *et al.*, 2010). De plus, ne sont aussi détectables que les protéines les plus solubles. Ceci exclut notamment les protéines hydrophobes, ou dont le point isoélectrique est extrême, ou encore les protéines membranaires du fait de leur agrégation lors des ruptures membranaires et de la présence de lipides empêchant la migration lors de l'IEF. Dans ce dernier cas, d'autres techniques ont été mises au point, tels que l'électrophorèse BN-PAGE (« *blue-native PAGE* »), dans laquelle les protéines sont extraites en conditions natives puis colorées au bleu de Coomassie afin de pouvoir migrer sur un gel PAGE classique. Cette méthode permet alors de visualiser des protéines ou des complexes protéiques entiers (Tulp, A., *et al.*, 1999).

Enfin, parmi les protéines détectables sur gel 2D classique, un grand nombre d'entre elles sont fréquemment identifiées, et ce quelles que soient les conditions expérimentales précédant l'analyse protéomique. Cet ensemble de protéines, couramment appelé le « déjà vu », présente ainsi des variations

qualitatives et/ou quantitatives qui ne proviennent pas forcément des conditions subies par le modèle cellulaire, et doivent être traitées avec prudence lors de l'analyse (Petraik, J., *et al.*, 2008).

Malgré tout, l'électrophorèse 2D représente un bon compromis entre la quantité d'informations biologiques apportées et la fiabilité de ces informations. En particulier, dans le cas d'études de toxicologie, où la reproductibilité et la fiabilité des données sont des critères essentiels, cette méthode apparaît comme relativement pertinente. C'est pourquoi elle a été choisie pour réaliser les travaux présentés ici.

4.3.2. Les méthodes « gel-free »

En parallèle de l'électrophorèse 2D, et afin de s'affranchir de ses limitations, d'autres techniques ont été améliorées, permettant notamment d'analyser des échantillons plus complexes. Il s'agit principalement de la chromatographie liquide (LC), dont le but est de concentrer les protéines ou les peptides dans de faibles volumes et de les séparer en vue de leur analyse par spectrométrie de masse. En effet, au cours de cette analyse, le signal sera d'autant plus intense que la concentration en peptides est élevée, ce qui est essentiel pour la détection et l'identification des protéines. C'est pour répondre à cet objectif que la nano-LC a été largement développée : elle permet d'améliorer la limite de détection, nécessitant donc de faibles quantités de matériel biologique, tout en travaillant avec de faibles volumes et de faibles débits compatibles avec les instruments de spectrométrie de masse. De plus, les faibles débits permettent d'augmenter la durée d'analyse, ce qui contribue également à augmenter la sensibilité de la méthode. Ce couplage aisément automatisé (LC-MS ou LC-MS/MS) présente généralement de bonnes performances, et est devenu une approche complémentaire de choix à l'électrophorèse 2D.

Cependant, contrairement à cette dernière, elle est généralement réalisée après digestion enzymatique des protéines, ce qui augmente encore la complexité de l'échantillon et diminue la capacité de séparation sur nano-colonnes. Or, un nombre trop important de peptides entrant dans les spectromètres de masse en aval peut en saturer les détecteurs, ce qui peut diminuer le nombre d'identifications peptidiques et augmenter la variabilité de la méthode (Zhang, X., *et al.*, 2010). C'est pourquoi, le plus souvent, la LC n'est pas employée seule, mais couplée à d'autres techniques de séparation préalables. Il peut s'agir de la 2D

directement, mais aussi d'autres chromatographies liquides en série (LC multidimensionnelle, ou MDLC) (Wu, Q., *et al.*, 2012 ; Di Palma, S., *et al.*, 2012).

Enfin, d'autres méthodes de séparation liquide peuvent aussi être utilisées. On peut notamment citer l'électrophorèse capillaire, qui permet de séparer des espèces en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un capillaire de faible diamètre (<100µm) sous l'action d'un champ électrique. Le principal avantage de cette technique par rapport aux électrophorèses conventionnelles, est la possibilité d'appliquer des champs électriques beaucoup plus élevés pour accélérer la séparation. Ceci est rendu possible par le faible diamètre du capillaire, qui limite fortement l'effet Joule. De plus, ce type d'électrophorèse permet de travailler avec de faibles quantités de matériel biologique, est facilement automatisable et peut être aisément couplé à un spectromètre de masse.

4.4. Spectrométrie de masse

Une des principales avancées de la protéomique a été la possibilité d'analyser les protéines par spectrométrie de masse (MS), découverte pour laquelle, en 2002, le prix Nobel de chimie a été attribué pour moitié à John Fenn et Koichi Tanaka d'une part, et pour l'autre moitié à Kurt Wüthrich d'autre part. La spectrométrie de masse est aujourd'hui un outil technologique en constant développement, permettant le recueil de quantités importantes d'informations, avec une grande sensibilité, et une rapidité croissante.

L'analyse des protéines par MS repose sur la séparation des fragments peptidiques qu'elles peuvent générer en fonction de leur masse moléculaire et de leur état de charge. C'est ensuite la détection de ces fragments qui permet l'identification de leur séquence, puis celle des protéines dont ils sont issus. Un spectromètre se compose ainsi de trois grandes parties : (1) une source d'ionisation, conférant une charge aux fragments peptidiques (formation d'ions à différents états de charges selon leur composition atomique) ; (2) un analyseur de masse permettant de les séparer en fonction de leur rapport masse-surcharge (m/z) caractéristique, qui détermine leur vitesse et leur trajectoire dans le champ électrique et/ou magnétique imposé ; (3) un détecteur de courant d'ions générant le signal à traiter (Figure 36). Les données

généérées sont exploitées via une interface informatique, sous la forme d'un spectre de masse exprimant l'intensité du signal en fonction des rapports m/z détectés. Ces différentes parties ont chacune connu des développements importants au cours des dernières décennies, et plusieurs types de sources et d'analyseurs sont aujourd'hui disponibles.

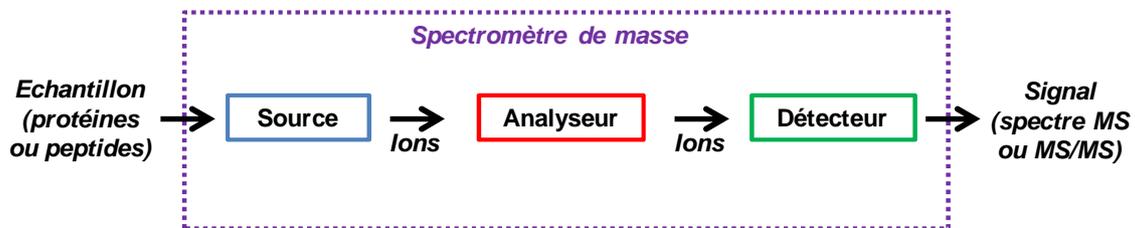


Figure 36 : Schéma simplifié des principales parties d'un spectromètre de masse.

4.4.1. Les sources d'ionisation

La source a pour objectif de produire à partir des protéines et/ou peptides de l'échantillon, des ions pouvant être mono- ou pluri-chargés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, et auxquels est transmise l'énergie nécessaire à leur déplacement et/ou à leur fragmentation. L'ionisation peut se faire en phase liquide ou en phase solide, par des mécanismes de capture/élimination d'électrons, protonation/déprotonation, ou encore par transfert de charge, et les ions générés sont ensuite mis en mouvement en phase gazeuse. On distingue les sources dites « énergétiques » ou « dures », qui auront tendance à induire la fragmentation des peptides, et les sources dites « douces », qui généreront des ions plus stables.

Ce n'est qu'à la fin des années 1980 qu'ont été mis au point deux outils permettant l'ionisation douce de biomolécules de taille importante (au-delà de 1000 Da) : d'une part l'ionisation par électronébulisation (« *electrospray ionization* », ou ESI) (Fenn, J.B., *et al.*, 1989), et d'autre part l'ionisation-désorption laser assistée par matrice (« *matrix-assisted laser desorption ionization* », ou MALDI) (Hillenkamp, F., *et al.*, 1991). Ces deux types de sources ont fortement contribué au développement de la spectrométrie de masse et de la protéomique, et sont encore les plus utilisés aujourd'hui.

i. L'ionisation par électrospray (ESI)

L'ESI correspond à l'ionisation de peptides initialement en solution, sous l'action d'un champ électrique intense, et à leur émission progressive en phase gazeuse sous pression atmosphérique et en présence d'un gaz de nébulisation (généralement l'azote). L'échantillon est injecté dans une aiguille fine à l'extrémité de laquelle est appliquée une tension élevée, conduisant ainsi à la séparation des charges positives et négatives (formation d'un cône de Taylor), puis à la formation de gouttelettes contenant les analytes chargés (nébulisation). Celles-ci subissent ensuite à leur tour des explosions coulombiennes successives pour devenir de plus en plus fines (Figure 37). Les ions émis en phase gazeuse sont ensuite entraînés vers l'analyseur grâce à la différence de pression existant entre celui-ci (10^{-6} à 10^{-7} mbars) et la source, ainsi qu'à des différences de potentiels appliquées sur des lentilles électrostatiques. Ce type d'ionisation génère en général des espèces pluri-chargées, et permet notamment l'analyse de molécules de masse élevée (supérieure à 100 kDa).

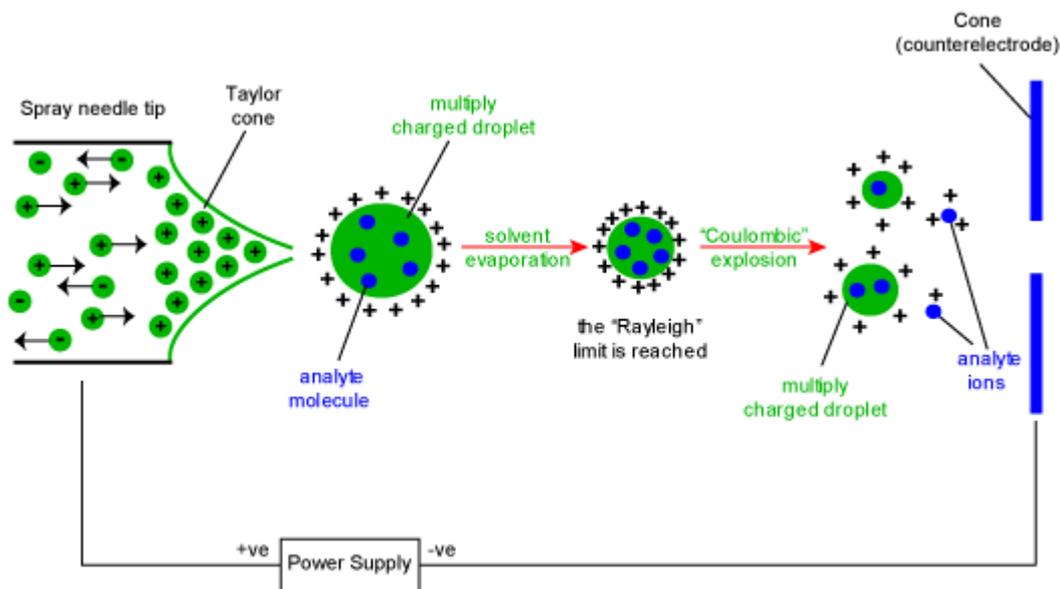


Figure 37 : Principe de l'ionisation par électrospray (ESI). L'application d'une tension élevée à l'extrémité du capillaire contenant l'échantillon, conduit à la formation de gouttelettes chargées contenant les analytes. L'évaporation progressive du solvant induit la fission de ces dernières en gouttelettes de plus en plus fines par explosions coulombiennes successives, jusqu'à l'émission des ions directement en phase gazeuse (adapté d'après Smith, M.L., et al., 2007).

ii. L'ionisation MALDI

Dans le cas des sources MALDI, l'ionisation de l'échantillon a lieu en phase solide, sur une cible conductrice, et sous vide. Après co-cristallisation avec une matrice introduite en excès (de 1000:1 à 10000:1) et évaporation du solvant, le dépôt matrice-analyte est irradié par des particules énergétiques ou, le plus souvent, par des photons via un laser pulsé émettant généralement dans l'UV ou dans l'IR. L'énergie absorbée par la matrice induit des transitions électroniques vers des états excités, dont le retour à des états stables conduit à l'éjection de matière en surface du dépôt sous la forme d'un plasma (désorption). Ce dernier forme ensuite un nuage d'ions, qui seront émis vers l'analyseur et accélérés par des différences de potentiels (Figure 38).

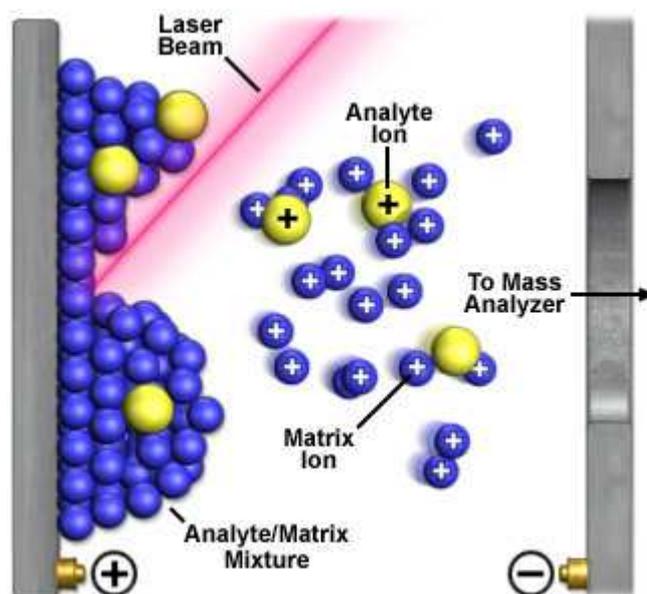


Figure 38 : Principe de l'ionisation MALDI. L'énergie des photons laser est absorbée par la matrice en large excès, puis transférée à l'analyte. Des ions sont formés désorbés en surface du dépôt, puis les ions de l'analyte sont ensuite dirigés vers l'analyseur via des lentilles de focalisation (d'après Chughtai, K., and Heeren, R.M.A., 2010).

L'emploi d'une matrice assure ici le transfert de l'énergie des photons qu'elle absorbe vers l'analyte tout en préservant ce dernier. Il existe plusieurs matrices possibles, dont le choix dépend essentiellement du type de molécule que l'on souhaite analyser. En effet, les sources MALDI permettent non seulement l'analyse des protéines, mais aussi des lipides et des sucres. En protéomique, les matrices les plus utilisées sont

principalement l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide sinapinique (SA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), et la dihydroxyacétophénone (DHAP). La taille des molécules d'intérêt conditionne également le choix de la matrice. Par exemple, l'HCCA est plus adapté pour des molécules de petite taille (moins de 10 kDa), telles que des peptides.

Cette méthode présente notamment des avantages en termes de sensibilité (de l'ordre de la femtomole), de rapidité d'analyse (quelques secondes par analyse) et de gamme de masses moléculaires possibles (jusqu'à 500 kDa). Par ailleurs, les ions générés en MALDI sont essentiellement mono-chargés, ce qui simplifie l'étude des spectres de masse. Il est également possible ici de choisir de travailler en mode positif ou en mode négatif (analyse des ions respectivement chargés positivement ou négativement). Enfin, ce type d'ionisation étant considéré comme « ionisation douce », elle est généralement couplée à des analyseurs de type « temps-de-vol », dont la gamme de masse est illimitée, en vue de l'analyse de molécules intactes de taille plus ou moins importante.

4.4.2. Les analyseurs de masse

Les analyseurs constituent la seconde partie d'un spectromètre de masse (Figure 36), et ont pour rôle de séparer les ions émis par la source en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z) afin de les analyser individuellement. Plusieurs types d'analyseurs existent : les quadripôles (QUAD ou Q), les analyseurs temps-de-vol (TOF), les trappes ioniques linéaires (IT ou TRAP) et les orbitrapes qui en dérivent, les secteurs magnétiques, ou encore les analyseurs avec résonance cyclotronique à transformée de Fourier (FT-ICR). Plusieurs paramètres permettent de les distinguer :

- la résolution spectrale (R , exprimée en Da ou ppm), calculée à partir de la différence de masse existant entre deux pics du spectre, et permettant de déterminer l'état de charge d'une molécule, de caractériser les massifs isotopiques et de discriminer les ions isobares (Figure 39, Tableau V) : plus sa valeur est faible, meilleure est la précision de mesure de masse de l'instrument ;

- le pouvoir résolutif, obtenu en divisant la masse par la largeur du pic à mi-hauteur (« *full width at half maximum* », ou FWHM) : plus le pic est fin, plus sa valeur est élevée, et plus la précision de masse est importante (Figure 39, Tableau V) ;
- la gamme de masses (m/z), qui détermine la taille maximale des molécules qu'il est possible d'analyser avec l'instrument considéré (Tableau V).

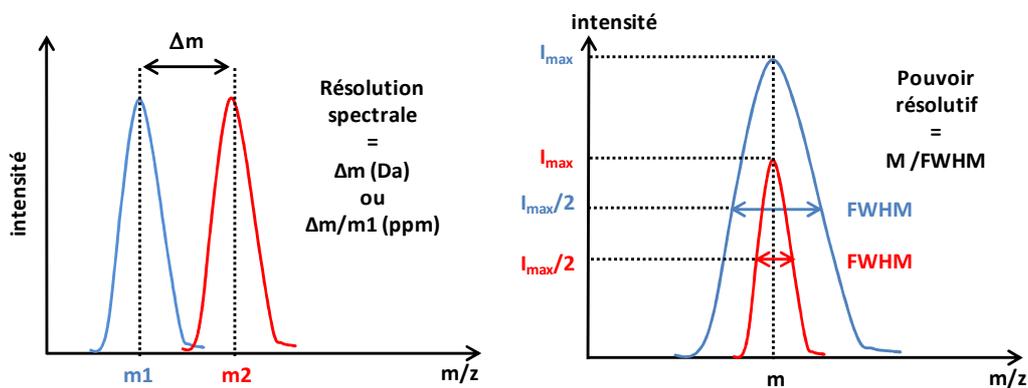


Figure 39 : Calcul de la résolution spectrale et du pouvoir résolutif en spectrométrie de masse.

D'autres paramètres sont aussi à prendre en compte, tels que la sensibilité, la rapidité de mesure, la vitesse des ions, la capacité de fragmentation des ions en vue de leur séquençage ou de leur caractérisation, etc. Le choix de l'instrument dans une approche protéomique dépend donc des objectifs de l'étude (analyse d'un grand nombre de protéines ou d'une protéine unique, quantification ou non, taille des molécules d'intérêt...) et de la précision souhaitée. De nombreux constructeurs continuent à développer des spectromètres de masse dont les performances sont constamment améliorées. Les analyseurs les plus utilisés à ce jour sont cependant les quadripôles, les temps-de-vol, et les trappes ioniques, qui seront plus détaillés par la suite du fait de leur utilisation pour la réalisation de ces travaux. Viennent ensuite les orbitrapes puis, dans une moindre mesure, les cyclotrons, notamment du fait de leur coût élevé (Wright, P.C., *et al.*, 2012).

Analyseur	Pouvoir résolutif	Précision de mesure (ppm)	Gamme m/z maximale
Quadripôle (Q)	2 000 à 15 000	10	4 000 à 8 000
Temps-de-vol (TOF)	5 000 à 50 000 (selon la longueur du tube)	50	500 000 à infinie
Trappe ionique (IT)	5 000 à 20 000	30	4 000 à 6 000

Tableau V : Comparaison des performances des analyseurs les plus couramment utilisés.

Chaque type d'analyseur peut en général être couplé à n'importe quel type de source, et une source donnée peut également être associée à plusieurs analyseurs en série, qu'ils soient identiques ou non, afin d'améliorer les performances d'analyse. On parle dans ce cas de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS², puis MS³, MSⁿ...). Dans ce cas, le premier analyseur (le plus souvent QUAD) a généralement pour rôle de sélectionner un ion parent selon son m/z pour le diriger vers une chambre de collision, où il sera fragmenté en plusieurs ions fils. Ces derniers sont ensuite dirigés vers le second analyseur en vue de leur caractérisation, et ainsi de suite. Les associations source-analyseur(s) déterminent le nom du spectromètre de masse ; on pourra ainsi trouver les terminologies suivantes : MALDI-TOF, MALDI-TOF-TOF, MALDI-Q-TOF, ESI-IT, ESI-Q-TOF, ESI-Q-TRAP, ESI-ITⁿ, etc.

i. Les quadripôles (Q ou QUAD)

Un quadripôle est généralement constitué de 4 cylindres métalliques, entre lesquels sont appliquées des différences de potentiels produisant à la fois un courant continu et un courant alternatif au centre du quadripôle. Le champ de radiofréquences qui en découle induit l'oscillation et la mise en mouvement des ions émis par la source en amont (phénomène de résonance) (Wright, P.C., *et al.*, 2012).

Le contrôle des composantes continue et alternative du courant imposé permet de sélectionner les ions à analyser : si la composante alternative est plus importante que la composante continue, les ions de rapport m/z faible deviennent instables et sont éjectés (ions non résonants) et seuls les ions de rapport m/z élevé (résonants) sont sélectionnés et dirigés vers l'analyseur suivant ou le détecteur (Figure 40). Les paramètres inverses permettent de sélectionner les ions de faible rapport m/z . Le même principe peut être appliqué en utilisant un nombre supérieur de cylindres (hexapôles, octopôles...). Enfin, les quadripôles sont souvent associés à d'autres analyseurs situés en aval (en général TOF).

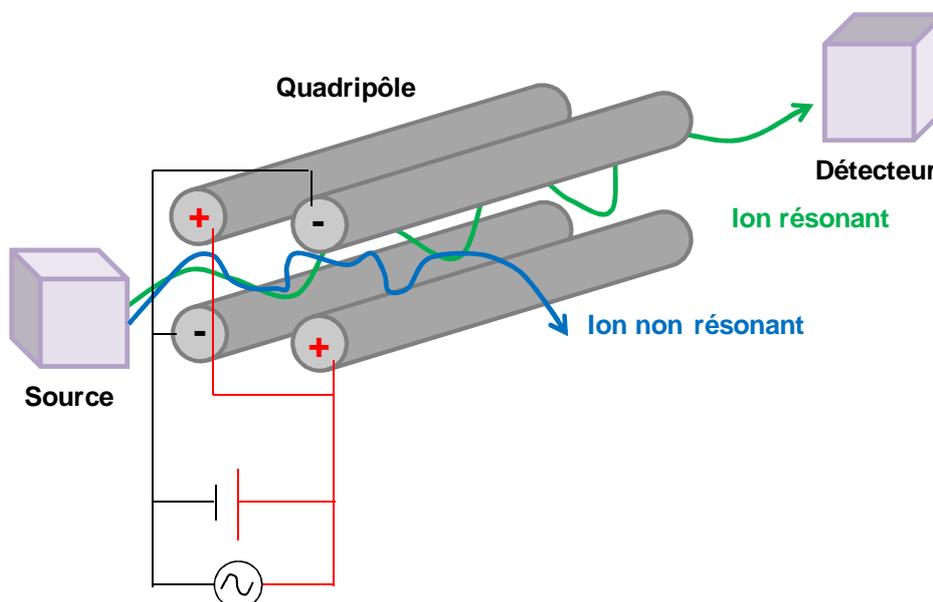


Figure 40 : Principe de fonctionnement d'un analyseur quadripôle.

ii. Les analyseurs temps-de-vol (TOF)

Les ions issus de la source ou d'un précédent analyseur sont généralement accélérés par des différences de potentiels appliqués dans une cellule intermédiaire (grille d'accélération). Ils pénètrent ensuite dans le tube de vol de l'analyseur TOF, où ils progressent dans un vide poussé, et à une vitesse qui ne dépend que de leur masse.

Deux modes de fonctionnement sont possibles avec ce type d'analyseurs : le mode linéaire et le mode réflecteur (ou réflectron). En mode linéaire, la trajectoire des ions suit l'axe de la source et du tube de vol. Ainsi, les ions de faible masse atteindront le détecteur en premier, et vice versa (Figure 41). Ce mode est caractérisé par une gamme de masses quasi infinie et une grande sensibilité. En revanche, la résolution spectrale n'est pas toujours optimale. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que certains ions, bien qu'ayant la même masse, peuvent avoir des énergies cinétiques différentes, et donc des vitesses différentes, dues à des décalages dans les phases de désorption/ionisation. Les spectres qui en résultent comportent donc des pics trop larges pour certaines valeurs de m/z .

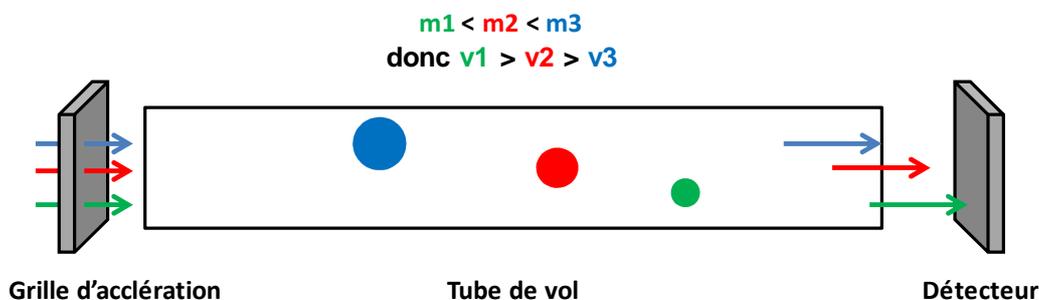


Figure 41 : Principe de l'analyseur temps-de-vol (TOF) en mode linéaire.

C'est pourquoi a été mis au point le mode réflectron, dans lequel une série d'anneaux électrostatiques de potentiels croissants a été introduite à la place du détecteur classique du mode linéaire. Ces anneaux permettent de refocaliser les ions de même masse et de les rediriger de façon simultanée vers un autre détecteur, placé en sortie d'un second tube de vol, améliorant ainsi non seulement la résolution spectrale mais aussi la séparation des ions (allongement du tube de vol) (Figure 42). Cependant, ce deuxième mode d'analyse présente une gamme de masses plus limitée que le mode linéaire (jusqu'à 7 000 ou 8 000) ainsi qu'une sensibilité plus faible.

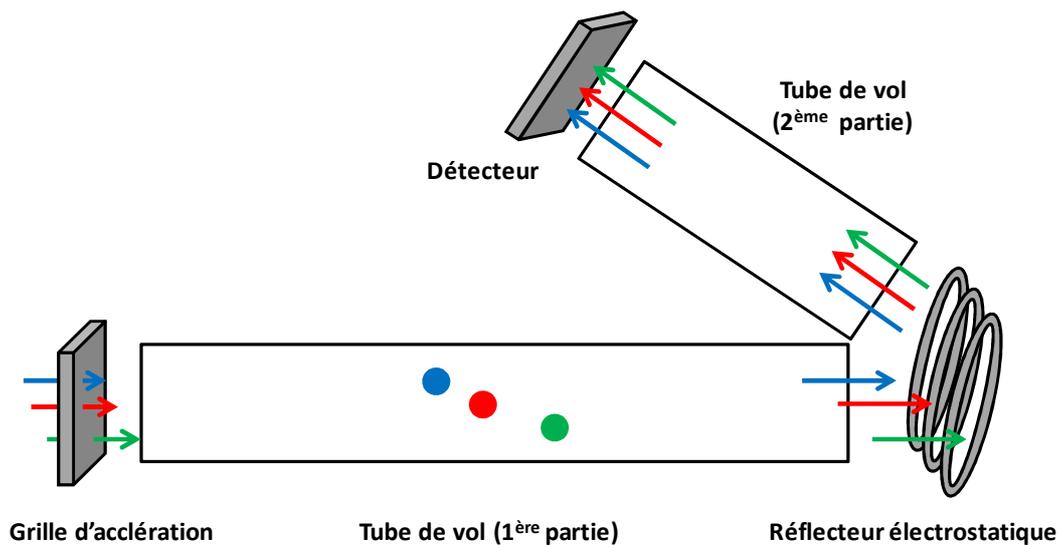


Figure 42 : Principe de l'analyseur TOF en mode réflectron.

iii. Les trappes ioniques (IT)

Une trappe ionique est constituée de 3 électrodes : deux électrodes extrêmes dites « chapeaux » (ou « *cap electrode* »), qui permettent l'entrée et la sortie des ions, et une électrode annulaire centrale à laquelle est appliquée une tension oscillante. Contrairement aux quadripôles et au TOF, la trappe ionique n'est pas traversée par les ions, mais a pour rôle de les piéger dans un espace de volume limité (environ 1 cm²), sous une pression d'hélium de l'ordre de 10⁻⁵ bars. Un champ électromagnétique quadripolaire est alors produit par l'électrode annulaire sous l'effet de la tension appliquée, forçant les ions à emprunter une trajectoire circulaire au sein de la trappe. La diminution progressive de la tension appliquée permet alors d'éjecter les ions successivement en fonction de leur m/z croissant, pour les diriger vers un détecteur ou un autre analyseur (Figure 43). Enfin, il est aussi possible d'introduire dans la trappe un gaz de collision, si l'on souhaite à ce moment-là fragmenter les ions pour analyser certains fragments particuliers. Dans ce cas, les ions fils sont aussi éjectés en fonction de leur m/z, par modification de la tension appliquée.

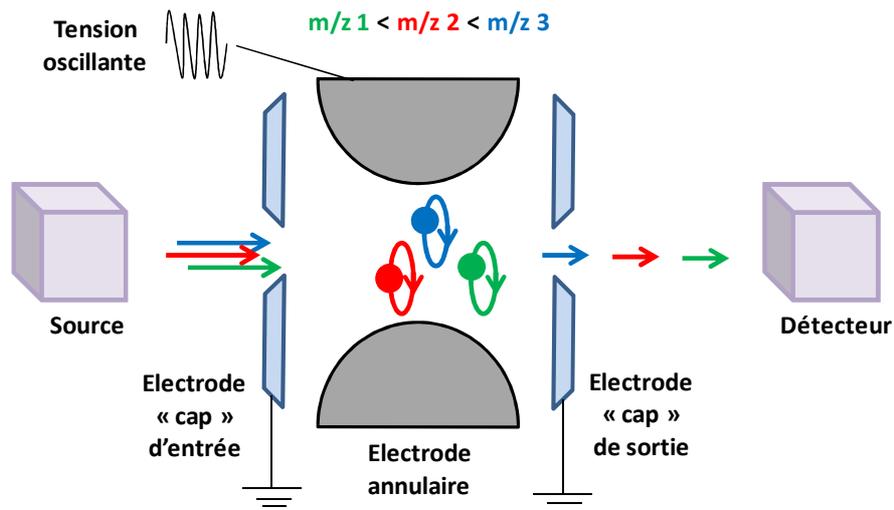


Figure 43 : Principe de la trappe ionique (IT).

Les courants d'ions détectés en sortie des différents analyseurs sont convertis en signaux électriques puis en spectres de masse, via des interfaces informatiques. L'interprétation de ces spectres conduit ensuite à l'identification des protéines.

4.4.3. Analyse des spectres et identification des protéines

La spectrométrie de masse n'a pas pour objectif de déterminer la séquence entière des protéines présentes dans l'échantillon, mais permet d'identifier celles-ci par la reconnaissance de fragments peptidiques caractéristiques (peptides dits protéo-typiques), et ce après comparaison avec les séquences contenues dans des banques de données électroniques. En pratique, deux stratégies peuvent être employées pour identifier les protéines : l'empreinte peptidique massique (ou « *peptide mass fingerprint* », PMF), et le séquençage par fragmentation MS/MS.

i. L’empreinte peptidique massive (PMF)

Cette première stratégie fait généralement appel à des instruments de type MALDI-TOF ou ESI-analyseur. Les protéines de l'échantillon sont séparées et digérées, le plus souvent à la trypsine, et les peptides sont analysés par le spectromètre de masse. Les spectres obtenus font apparaître les pics correspondants aux masses de ces peptides, qui sont alors comparées aux masses théoriques des peptides issus de la digestion *in silico* de l'ensemble des protéines contenues dans les banques de données (James, P., *et al.*, 1993).

Plusieurs moteurs de recherche sont dédiés à ce type d'analyse, parmi lesquels Mascot (le plus utilisé), mais aussi MS-Fit, GlobalServer ou encore PeptideSearch, basés sur le même principe mais dont les algorithmes de recherche sont quelque peu différents. Lors de la recherche, plusieurs paramètres importants sont à renseigner sur :

- l'échantillon et sa préparation : organisme d'origine, type de digestion enzymatique et nombre de clivages manqués autorisés, modifications connues fixes ou variables, telles que des oxydations ou des carbamidations (souvent liées à la préparation)... ;
- la méthode d'analyse : type de spectromètre, précision et tolérance de masse souhaitées, état de charge des ions...
- la (les) banque(s) de données de référence : il peut s'agir de banques générales telles que SwissProt ou la banque non redondante du NCBI (NCBI nr), ou de banques restreintes à certains organismes (humain, murin...).

La comparaison avec les banques de données permet l'identification des protéines sur la base du score rendu par le moteur de recherche, et du pourcentage de couverture de séquence entre les peptides du spectre et la protéine identifiée. Un exemple de résultats est présenté sur la Figure 44.

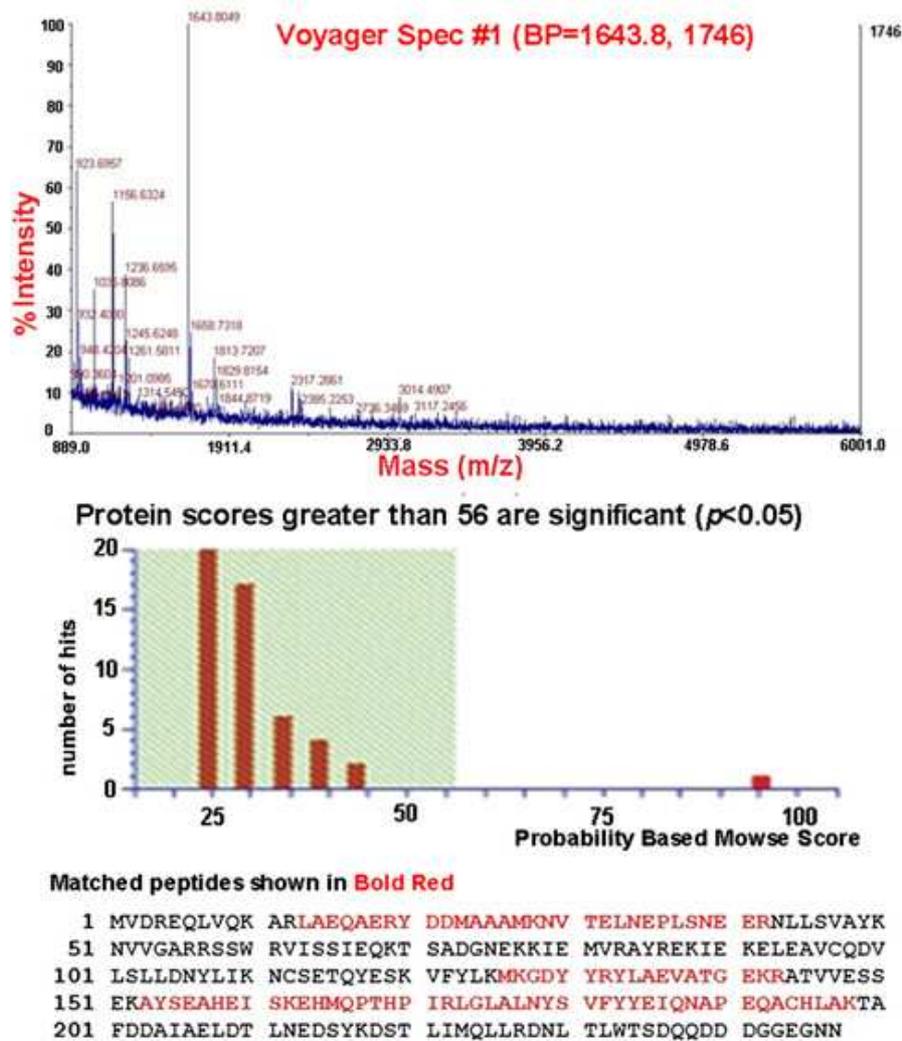


Figure 44 : Exemple de résultats obtenus selon l'approche PMF. Dans cette étude, l'analyse protéomique a été menée par électrophorèse 2D-DIGE suivie d'une analyse PMF par MALDI-TOF sur plusieurs spots d'intérêt. Les masses m/z obtenues sur le spectre présenté ici ont permis via Mascot d'identifier la protéine 14-3-3 γ avec un score significatif de 95 et un pourcentage de couverture de séquence de 38% (10 peptides protéo-typiques) (extrait de Wu, Z., et al., 2013).

Le principal avantage du PMF est qu'il n'est pas nécessaire de connaître la séquence des peptides pour identifier les protéines, mais seulement leur masse. Ce type d'approche permet ainsi de réaliser des analyses haut-débit rapides, facilement automatisables, et de manière robuste, sans pour autant impliquer des coûts élevés (He, Z., et al., 2008 ; Rabilloud, T., and Lelong, C., 2011). En revanche, cette méthode n'est pas applicable lorsque les séquences des protéines ne sont pas répertoriées dans les banques de données. Par ailleurs, elle nécessite des concentrations suffisamment élevées en protéines, de façon à avoir par la suite de nombreux peptides à analyser pour obtenir des scores assez élevés, et donc une identification plus

précise. De plus, les algorithmes de PMF étant basés sur l'hypothèse que les peptides analysés proviennent d'une seule protéine, cette méthode n'est pas non plus souhaitable pour des mélanges complexes, dans la mesure où elle ne permet pas de distinguer deux peptides différents de même masse. Il peut en effet en résulter plusieurs identifications dans les banques de données, avec des scores et des couvertures de séquences proches, rendant impossible l'identification précise des protéines. Ainsi, seule une séparation en amont par électrophorèse 2D, dont les spots contiennent un nombre limité de protéines, est envisageable pour employer ce type d'approche (Rabilloud, T., and Lelong, C., 2011). Enfin, le PMF ne prend pas en compte les éventuelles modifications post-traductionnelles des protéines, ce qui peut encore rendre difficile leur identification. Compte tenu de ces limitations, il peut s'avérer plus intéressant d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

ii. La fragmentation MS/MS

Cette seconde stratégie est mise en place soit lorsque l'empreinte PMF seule ne suffit pas à identifier les protéines, soit de façon complémentaire à la PMF. Ici, on utilisera plutôt des spectromètres de type source-IT, source-Q-Q, source-Q-TOF ou encore source-TOF-TOF, souvent placés en série avec une séparation par nano-LC (nanoLC-MS/MS). Les spectres obtenus fournissent alors des informations de séquence sur les fragments des peptides analysés. Ces séquences d'acides aminés sont directement comparées aux séquences de l'ensemble des protéines contenues dans les banques de données (Yates, J.R., *et al.*, 1995 ; Yates, J.R., *et al.*, 1997).

La fragmentation est basée sur les propriétés des liaisons peptidiques, et dépend de l'énergie de collision qui est apportée. Ainsi, plusieurs types de fragments peuvent être observés, selon que le site de coupure se situe directement au niveau de la liaison peptidique (CO-NH), en amont ou en aval de celle-ci en position α , ou plus loin encore dans la séquence (Figure 45). Ces fragments sont caractérisés selon une nomenclature précise, qui dépend également de la localisation de la charge résultant de la coupure (Roepstorff, P., and Fohlman, J., 1984 ; Biemann, K., 1988) :

- dans le cas où la charge est portée par le fragment N-terminal, les ions sont dénommés « a » (coupure CO-CH en amont de la liaison peptidique), « b » (coupure de la liaison peptidique CO-NH), ou « c » (coupure NH-CH en aval de la liaison peptidique) ;
- si la charge est portée par le fragment C-terminal, on parle d'ions « x » (coupure CO-CH en amont de la liaison peptidique), « y » (coupure de la liaison peptidique CO-NH) et « z » (coupure NH-CH en aval de la liaison peptidique).

Ces fragments sont les plus fréquemment formés (en particulier les ions « b » et « y ») car les coupures ne requièrent qu'un faible niveau d'énergie. Mais d'autres types de fragments issus de clivages sur les chaînes latérales des acides aminés peuvent aussi être observés dans un second temps (fragments dits de 2^{ème} génération) ou si l'on travaille à haute énergie : les ions « d », qui résultent d'une coupure sur la chaîne latérale en position β et dont la charge est portée par l'acide aminé N-terminal ; les ions « v » et « w », portant une charge sur la partie C-terminale et issus de coupures des chaînes latérales en position α et β respectivement.

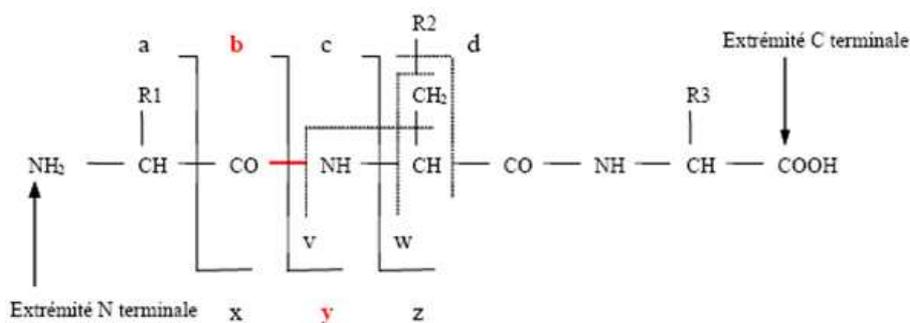


Figure 45 : Nomenclature des ions issus de la fragmentation MS/MS. Rx : chaînes latérales.

Le spectre obtenu après détection des différents fragments donne la masse chacun d'entre eux. La différence de masse observée entre deux fragments de même type correspond à la masse d'un des 20 acides aminés (Figure 46). Ainsi, il est possible de déterminer la séquence des peptides d'intérêt, ensuite comparée aux séquences contenues dans les banques de données via les mêmes moteurs de recherche que précédemment pour identifier les peptides et protéines correspondants.

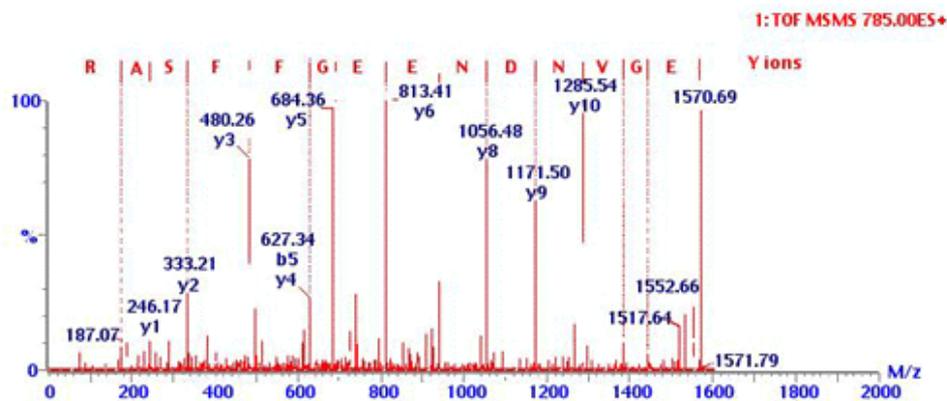


Figure 46 : Exemple d'interprétation d'un spectre MS/MS. Le peptide de référence Glu1-Fibrinopeptide B humain a été analysé ici par Q-TOF MS/MS. Le spectre a été interprété sur la base des ions y formés au cours de la fragmentation. Les écarts de masse m/z entre les pics les plus intenses correspondent aux masses des acides aminés, ce qui permet de déterminer la séquence du peptide. (Réalisé par : Skirball Institute of Biomolecular Medicine, <http://saturn.med.nyu.edu/facilities/paf/qtof>, 2012).

Si les séquences ne sont pas connues ou pas encore disponibles dans les banques de données, on parle de séquençage *de novo*. Cette dernière stratégie consiste en une interprétation manuelle des spectres MS/MS afin de déterminer les séquences théoriques des peptides et des protéines. Cette analyse peut aussi être assistée par informatique via des logiciels spécifiques. Les séquences déterminées sont alors comparées avec celles disponibles dans les banques, à l'aide de programmes de « blast », permettant une identification hypothétique des protéines par homologies de séquences.

Contrairement au PMF, la MS/MS ne nécessite que de faibles quantités de peptides pour l'identification, puisque celle-ci prend en compte à la fois leur masse et leur séquence. L'identification est également plus spécifique et donc plus précise. En revanche, les analyses haut-débit ne sont pas envisageables, et les coûts sont plus élevés. Enfin, le séquençage *de novo* reste difficile à automatiser. Néanmoins, la MS/MS reste une stratégie de choix pour l'identification des protéines issues de mélanges complexes.

4.5. Choix d'une approche protéomique en toxicologie des nanoparticules

Les études de nanotoxicologie sont aujourd'hui de plus en plus nombreuses du fait de l'utilisation variée et croissante des nanomatériaux. Cependant, la plupart de ces études fournissent des données essentiellement descriptives, telles que le degré de cytotoxicité, la production d'espèces oxydantes ou de médiateurs inflammatoires, etc. Peu d'entre elles renseignent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité potentielle des nanoparticules au niveau cellulaire.

Or, de telles données sont aujourd'hui facilement accessibles grâce aux ressources utilisées en analyse protéomique. Les instruments sont de plus en plus puissants et précis, et permettent de mieux décrypter un nombre considérable de mécanismes moléculaires intracellulaires : on peut aujourd'hui accéder à des modifications à la fois qualitatives et quantitatives du protéome sous certaines conditions d'exposition des cellules. Compte tenu des avantages de ce type d'approche, certains auteurs évoquent même aujourd'hui l'émergence de la « toxicoprotéomique » en tant que champ de technologie et de recherche à part entière. Pourtant, malgré les ressources disponibles, ce type d'approche reste encore peu employé pour l'étude de la toxicité des nanomatériaux.

Par ailleurs, parmi les différentes stratégies possibles en analyse protéomique, certaines permettent d'assurer une reproductibilité importante des données. C'est le cas notamment de l'électrophorèse 2D, qui demeure une technique robuste, principalement soumise aux variabilités liées à l'échantillon biologique et, dans une moindre mesure, à l'opérateur. Or, la robustesse et la reproductibilité constituent des critères essentiels en toxicologie. Associée aux progrès de la spectrométrie de masse, la 2D s'avère ainsi un outil de choix pour mener de telles études.

Enfin, l'approche protéomique, quelle que soit la stratégie employée, présente l'avantage d'être une approche globale, fournissant un nombre important de données, et ce sans aucune hypothèse faite *a priori* et qui pourrait biaiser l'analyse.

C'est pourquoi, dans le cadre des travaux présentés ici, nous avons opté pour une approche protéomique basée sur le couplage entre l'électrophorèse 2D et la spectrométrie de masse par nano-LC/ESI-MS et nano-

LC/ESI-MS/MS (Figure 47). L'objectif de cette analyse est de mettre en évidence toutes les variations affectant le protéome total des cellules exposées aux nanoparticules d'intérêt. La combinaison de la protéomique avec les approches classiques de biochimie, biologie cellulaire et biologie moléculaire permettra également de renforcer et de compléter les données obtenues.

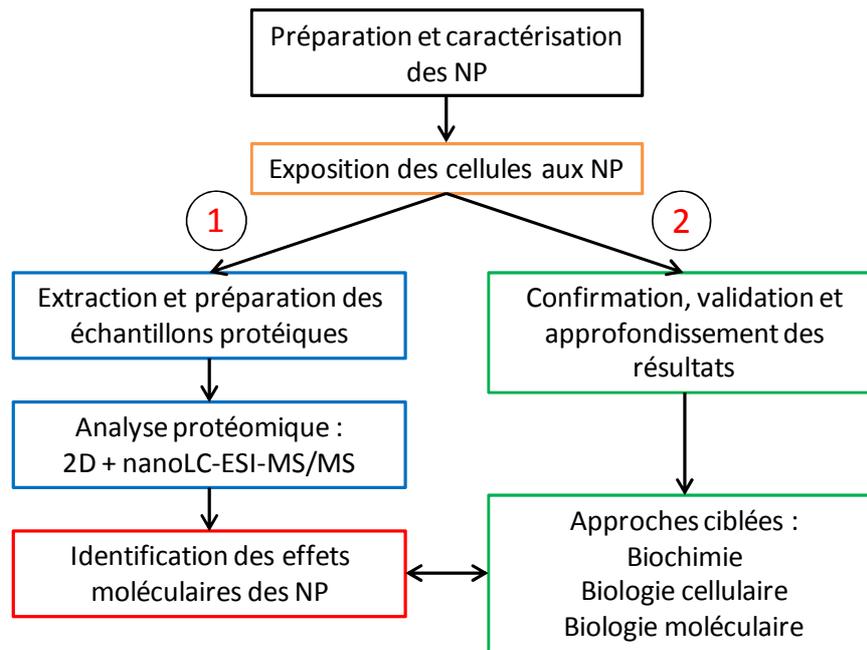


Figure 47 : Stratégie globale choisie pour l'étude.

MATERIELS
et METHODES

1. LES NANOPARTICULES

1.1. Caractéristiques et mise en suspension des NP

Les NP choisies dans le cadre de ces travaux ont toutes été obtenues auprès du même fournisseur (Sigma-Aldrich). Le Tableau VI résume les principales caractéristiques des différentes particules.

Dénomination (Réf.)	Formule	Forme	Taille (méthode de mesure)
Cuivre (684007)	Cu	Nanopoudre	< 50 nm (MET)
Oxyde de cuivre (II) (544868)	CuO	Nanopoudre	< 50 nm (MET)
Oxyde de zinc (II) (677450)	ZnO	Nanopoudre	< 50 nm (MET)
		Dispersion 50 % (p/v) en H ₂ O	
Oxyde de zinc (II) (721077)	ZnO	+ Modification cationique (3-Aminopropyltriéthoxysilane)	< 100 nm (DLS)

Tableau VI : Principales caractéristiques des NP choisies (obtenues d'après le fournisseur).

Les nanopoudres ont été pesées puis mises en suspension à la concentration finale de 5% (p/v), dans de l'eau ultrapure dégazée par filtration sous vide sur une membrane 0,2 µm. La dispersion a ensuite été réalisée par sonication à haute fréquence dans un instrument de type cup-horn (BioBlock Scientific, France) préréglé avec les paramètres suivants : durée d'impulsions = 1 seconde ON / 1 seconde OFF ; durée totale = 30 minutes ON ; amplitude = 60 % (soit 90 watts par impulsion) ; température du circuit de refroidissement = 5°C. Pour certaines suspensions, un agent stabilisateur a également ajouté en conditions stériles, avant ou après la sonication, afin de tenter d'améliorer la dispersion. Plusieurs agents ont été testés pour les différentes particules : albumine bovine (BSA, 1mg/mL en concentration finale), gélatine de porc (1 mg/mL final), polyéthylène glycol 8000 (PEG8000, 1% final), polyvinylpyrrolidone 40 (PVP40, 1% final), et dextran (1% ou 2% final). Les NP ont alors été enrobées par le stabilisateur par immersion et sonication dans un bain à ultrasons pendant 60 à 90 minutes. Les différentes suspensions obtenues, avec ou sans agent stabilisateur, ainsi que la dispersion commerciale de ZnO, utilisée comme telle, ont enfin été caractérisées par DLS et/ou microscopie électronique.

1.2. Caractérisation par DLS

1.2.1. Principe

Dans une suspension donnée, les particules sont en mouvement constant, aléatoire, indépendamment les unes des autres (mouvements Browniens). Lorsqu'elles diffusent la lumière, certains faisceaux diffusés par des particules différentes à instant donné peuvent s'additionner ou s'annuler (phénomènes d'interférences), conduisant ainsi à des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée totale au cours du temps. Dans la technique de DLS, ces fluctuations sont mesurées sur une période de temps donnée, par un compteur de photons. Elles sont directement liées au taux de diffusion des particules, lui-même dépendant de leur rayon hydrodynamique. Ces mesures permettent donc d'accéder directement à la taille des particules dans la suspension analysée.

Les instruments de DLS sont constitués de plusieurs modules en série : (1) une source laser, émettant une lumière monochrome constante de longueur d'onde égale à 250 nm, qui vient frapper l'échantillon contenu dans une cuve d'analyse ; (2) des détecteurs répartis à différents angles autour de l'échantillon, permettant de récupérer les photons diffusés par les particules qu'il contient ; (3) un analyseur d'intensité associé à une interface informatique, qui effectue le traitement du signal détecté et permet de déterminer la distribution de tailles des particules contenues dans l'échantillon. Compte tenu de la longueur d'onde du laser, cette technique est particulièrement adaptée pour l'analyse des NP, dont les tailles attendues sont généralement inférieures à 250 nm, et qui diffusent donc la lumière dans toutes les directions, améliorant ainsi la détection et la précision de mesure sur la taille.

1.2.2. Préparation des échantillons

Les suspensions à analyser ont été diluées de façon à atteindre des concentrations finales de l'ordre de 10 µg/mL, optimales pour l'analyse de NP. Pour cela, des dilutions en série ont été réalisées, en eau ultrapure stérile et dégazée (appelée ici USD), afin d'éviter toute interférence lors des mesures DLS. La dilution finale a été réalisée soit en eau USD, soit en milieu de culture complet (DMEM contenant 1 % de SVF). Enfin, les échantillons ont été placés à raison de 100 µL dans des UVettes (Eppendorf), puis analysés sur un

instrument de type DynaPro NanoStar (Wyatt Technology), en utilisant les paramètres suivants : température d'analyse = 25°C (pièce et instrument thermostatés) ; modèle d'analyse : sphères de Rayleigh ; solvant : eau ; nombre d'acquisitions par échantillon = 10 ; durée des acquisitions = 5 secondes. Pour chaque échantillon analysé, le diamètre des particules, les profils d'autocorrélation, les histogrammes de dispersion de tailles (intensité en fonction du diamètre) et le pourcentage de polydispersité (%Pd) ont été vérifiés. Chaque type de suspension a été analysé au moins une fois. Les conditions de dispersion donnant les diamètres les plus petits possibles et les suspensions les plus homogènes ont été retenues pour la suite de l'étude.

1.3. Microscopie électronique

1.3.1. Principe général

La microscopie électronique repose sur l'émission, par un canon à électrons, d'un faisceau d'électrons, qui est accéléré par une tension élevée, et focalisé sur l'échantillon par un système de lentilles électrostatiques et électromagnétiques. L'avantage de la microscopie électronique par rapport à la microscopie optique réside dans son pouvoir de résolution important, permis notamment par la faible longueur d'onde des électrons par rapport aux photons de lumière visible. Ainsi, cette technique permet de visualiser des éléments de très petite taille, tels que des NP. Deux types de microscopes peuvent être utilisés : les microscopes à balayage, et les microscopes à transmission.

1.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Dans cette technique, le faisceau d'électrons vient seulement frapper la surface de la préparation, induisant ainsi une perte d'énergie des électrons incidents, qui est alors convertie en d'autres formes d'énergie, telle que l'émission d'électrons secondaires, de lumière ou encore de rayons X..., et dont l'intensité variable est détectée pour chaque point de l'échantillon. La profondeur de champ importante permet également d'obtenir ici des images tridimensionnelles des objets analysés.

Cette technique a été utilisée pour analyser les suspensions de NP de cuivre (Cu/PVP40 et CuO/PVP40). Pour cela, une grille de carbone de 200 mesh a été introduite dans les suspensions, puis séchées à l'air libre avant d'être analysée, avec un grossissement allant jusqu'à x200 000. Les paramètres du microscope ont été fixés comme suit : tension d'accélération des électrons = 3 kV ; distance de travail = 4,1 mm.

1.3.3. Microscopie électronique à transmission (MET)

Dans cette seconde technique, le faisceau d'électrons à haute tension traverse l'échantillon, qui absorbe plus ou moins ces derniers. Le faisceau transmis contient donc directement des informations sur la structure de l'échantillon. Il est ensuite amplifié par un système de lentilles, puis détecté par un système optique, qui renvoie une image complète de l'échantillon. Cette technique est particulièrement intéressante pour l'analyse d'échantillons biologiques, qui nécessite cependant la fixation, l'inclusion et la réalisation de coupes très fines de l'échantillon pour que le faisceau incident puisse le traverser.

Ici, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec les NP, puis fixées pendant 10 minutes dans un volume équivalent d'une solution fixatrice préalablement chauffée à 37°C. Celle-ci contient du glutaraldéhyde 5% dans un tampon cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,3 (nommé tampon « A » par la suite). Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot a été repris dans une seconde solution fixatrice contenant du glutaraldéhyde 2,5% en tampon « A » pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées (tampon « A »), puis post-fixées pendant 1 heure à 4°C dans du tétroxyde d'osmium 1% en tampon « A », avant d'être colorées pendant 1 heure à 4°C à l'acétate d'uranyle 4%. Après lavage en eau distillée, et déshydratation par passage dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (50, 70, 80, 95, et 100%), les cellules ont enfin été incubées pendant 1 heure dans un mélange de volumes équivalents d'Epon (Electron Microscopy Sciences) et d'éthanol absolu, puis pendant une nuit entière dans l'Epon seul, et enfin incluses dans l'Epon. Des coupes ultrafines ont alors été réalisées et colorées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle, avant d'être analysées au microscope électronique (Philips CM 120 BioTwin, 120 kV).

1.4. Mesure de la dissolution des NP dans les milieux de culture

Ces dosages ont été réalisés dans du milieu de culture complet (RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, SVF), soit préparé extemporanément et préchauffé à 37°C, soit préalablement conditionné, c'est-à-dire mis en contact avec des cellules pendant 24 heures à 37°C avant d'être récupéré et centrifugé pour éliminer les cellules en suspension. Le milieu conditionné ou non conditionné a été réparti en plaques 6 puits à raison de 2 mL par puits. Les NP de CuO et ZnO ont été introduites dans certains puits à différentes concentrations (5, 10 et 20 µg/mL pour CuO/PVP40 ; 4 µg/mL pour ZnO cationique ; 8 µg/mL pour ZnO/H₂O). En parallèle, des concentrations connues de solutions de chlorure de cuivre (CuCl₂) ou d'acétate de zinc ((CH₃CO₂)₂Zn) ont été introduites dans d'autres puits, afin d'établir une gamme de concentration d'ions dans le milieu. Les plaques contenant les NP et les ions ont ensuite été incubées simultanément pendant 24 heures en conditions standard (37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂).

Le milieu a ensuite été récolté et ultracentrifugé pendant 45 minutes à 270 000 g afin d'éliminer les NP en suspension. La concentration en ions cuivre ou zinc dans les surnageants a été déterminée par dosage colorimétrique utilisant soit le zincon (cuivre), soit l'orange de xylénol (zinc), deux indicateurs capables de complexer les ions métalliques divalents. Pour cela, 1 mL de surnageant a été prélevé, et les protéines ont été précipitées par ajout d'acide trichloroacétique (TCA) (7,5% (p/v) final dans le cas du cuivre, et 5% (p/v) final dans le cas du zinc), afin de libérer la fraction métallique pouvant être liée à celles-ci. La précipitation a été réalisée par incubation pendant 30 minutes sur glace.

Après élimination des protéines précipitées par centrifugation (15 minutes à 15 000 g et 4°C), les surnageants ont été récoltés et neutralisés, avant d'être dosés. Dans le cas du cuivre, les échantillons ont été neutralisés par ajout de 0,3 volumes de Tris 2M, puis le zincon a été introduit (50 µM final) et la concentration totale en ions Cu²⁺ a été déterminée par mesure de l'absorbance à 600 nm et comparaison avec la gamme de CuCl₂ réalisée en milieu de culture. De même, dans le cas du zinc, la neutralisation des surnageants à doser a été réalisée par ajout de 0,3 volumes d'une solution de 2-(N-morpholino)-éthanesulfonate de sodium (MES sodium) 2M et NaOH 0,7M. L'orange de xylénol a ensuite été ajouté (50

μM final), et la concentration totale en ions Zn^{2+} a été déterminée par comparaison avec la gamme de $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ faite en milieu de culture. Ces dosages ont été réalisés au moins 3 fois pour chaque concentration de NP, sur des expériences indépendantes, et les gammes d'ions correspondantes ont été refaites pour chaque expérience.

2. MODELES CELLULAIRES ET TESTS DE VIABILITE

2.1. Culture des lignées RAW 264.7 et J774A.1

Les lignées de macrophages murins RAW 264.7 et J774A.1 ont été obtenues auprès de la Collection Européenne de Cultures Cellulaires (European Cell Culture Collection, Salisbury, Royaume-Uni). Il s'agit dans les deux cas de macrophages issus d'ascites de souris de souche BALB/c, possédant donc majoritairement le même fond génétique. Les deux lignées ont cependant été établies à partir de sources différentes : J774A.1 est issue d'une tumeur de type sarcome (Ralph, P., *et al.*, 1975 ; Ralph, P., and I. Nakoinz, *Cancer Res.*, 1977), tandis que RAW 264.7 est issue d'une tumeur induite par transformation virale (« Abelson murine leukemia virus », A-MuLV) (Ralph, P., and I. Nakoinz, *J. Immunol.*, 1977 ; Raschke, W.C., *et al.*, 1978). Les cellules J774A.1 sont également physiologiquement plus proches des macrophages totalement différenciés, alors que la lignée RAW 264.7 reste à un stade plus précoce, intermédiaire entre le monocyte et le macrophage. Néanmoins, les deux lignées possèdent les caractéristiques structurales (marqueurs de surface) et fonctionnelles majeures des macrophages : sensibilité aux stimulations exogènes (lipopolysaccharide par exemple), capacités d'internalisation (par phagocytose, pinocytose, ...), et production de médiateurs inflammatoires (oxyde nitreux, interleukines, ...). Enfin, les deux lignées peuvent être entretenues en conditions standard dans les milieux classiques de culture (DMEM, RPMI, ...), en cultures adhérentes ou non adhérentes ; le second mode de culture a été retenu ici afin de limiter le taux de mortalité qui peut être induit lors de la récolte de cellules adhérentes.

Les cellules ont été cultivées en flacons à surface non adhérente, dans du milieu complet RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Tous les deux jours, les cellules ont été récoltées, comptées sur cellule de Malassez (on atteint généralement 10^6 cellules/mL), réensemencées à raison de 10^5 cellules/mL dans du milieu frais, et incubées en conditions standard (37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂). Ces cultures peuvent ainsi être maintenues pendant 6 à 8 semaines ; au-delà, la décongélation de nouvelles ampoules de cellules est nécessaire, car les cellules perdent peu à peu leurs caractéristiques fonctionnelles (notamment phagocytose et sécrétion de médiateurs inflammatoires).

2.2. Mise en culture primaire de macrophages de souris

Les analyses sur les lignées cellulaires ont été complétées par plusieurs séries de tests réalisés sur des cultures primaires de macrophages murins, obtenues à partir de moelle osseuse de souris de la lignée C57BL/6. La mise en culture primaire a été réalisée selon des protocoles décrits précédemment (Tarakanova, V.L., *et al.*, 2007 ; Schleicher, U., *and* C. Bogdan, 2009). Pour cela, des souris âgées de 4 à 6 semaines ont été sacrifiées par dislocation cervicale, et la moelle osseuse des tibias et des fémurs a été collectée en conditions stériles. Les amas cellulaires ont ensuite été dissociés par aspirations/refoulements successifs dans un milieu de culture nommé ici « BM 20 » à base de DMEM, auquel ont été ajoutés 10% de SVF et 5% de sérum de cheval, ainsi que 20% de surnageant de cultures de cellules L929 (v/v). En effet, la moelle osseuse contenant de nombreux types cellulaires et précurseurs, il est nécessaire ici de sélectionner ceux conduisant exclusivement aux macrophages (progéniteurs myéloïdes monocyte/macrophage), et de les différencier progressivement vers cette voie jusqu'à maturation complète. Le surnageant de cultures de la lignée L929 contient les facteurs de croissance et de différenciation nécessaires à ce processus : les M-CSF (« *macrophage colony stimulating factor* ») (Weischenfeldt, J., *and* B. Porse, 2008).

Selon l'âge des animaux notamment, on obtient généralement entre 20 et 30 x10⁶ cellules/souris, que l'on ensemence à raison de 4 x10⁶ cellules/mL en flasques non adhérentes de 175 cm². Après 4 jours d'incubation en conditions standard (37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂), un volume équivalent de milieu BM 20 est rajouté sur les cellules afin de poursuivre la différenciation. Au 7^{ème} jour de culture, les cellules sont récoltées à l'aide de grattoirs, comptées sur cellules de Malassez, et réensemencées à raison de 10⁶ cellules/mL en boîtes de Pétri non adhérentes (typiquement celles utilisées en bactériologie), dans un milieu « BM 10 », dont la composition est proche de celle du BM 20, mais ne contenant plus que 10% de surnageant de culture L929 (v/v).

Au terme de la maturation, les cellules sont caractérisées grâce à un typage par cytométrie en flux (FACScalibur), permettant de vérifier la présence ou non de marqueurs spécifiques des macrophages différenciés matures. En particulier, on vérifie ici la présence des marqueurs CD11b et CD14, nécessaires et indispensables aux fonctions immunitaires innées des macrophages murins (Perera, P.Y., *et al.*, 2001). Pour

cela, ceux-ci sont marqués spécifiquement par des anticorps couplés à des fluorochromes détectables en cytométrie en flux : typiquement, il s'agit de l'isothiocyanate de fluorescéine (anti-CD11b-FITC, longueurs d'ondes d'excitation/émission : 488/530 nm) et de la phycoérythrine (anti-CD14-PE, excitation/émission : 488/585 nm) (cf. *Analyses fonctionnelles* partie 4.1, page 139).

Les macrophages ainsi obtenus sont matures dès le 10^{ème} jour de culture, et peuvent être maintenus en conditions standard pendant 2 à 3 semaines maximum, au cours desquelles le milieu de culture (BM 10) doit être partiellement renouvelé tous les 3 jours (2/3 à 3/4 du volume total). Au-delà de ce délai, les macrophages perdent leurs caractéristiques fonctionnelles et le taux de mortalité augmente fortement. Il est donc préférable de générer de nouvelles cultures primaires.

Pour chaque série de tests réalisés, les cellules sont récoltées par grattage, et réensemencées en plaques non adhérentes 6 puits. Afin de limiter la mortalité associée au décollement des cellules grattage, il est aussi possible d'ensemencer directement en plaques 6 puits au 7^{ème} jour, et de terminer la différenciation et la maturation dans ces conditions.

2.3. Tests de viabilité par exclusion de colorant

Les lignées cellulaires ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/mL dans des plaques 6 puits non adhérentes contenant 2 mL de milieu complet (RPMI 1640 + SVF 10%) par puits, puis laissées au repos pendant 24 heures à 37°C/5% de CO₂. Différentes concentrations de NP ou d'ions cuivre ou zinc ont ensuite été introduits directement dans le milieu de culture, puis les plaques ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires à 37°C/5% de CO₂.

Les macrophages primaires ont étéensemencés en plaques 6 puits à raison de 2 mL de suspension cellulaire (cellules en milieu BM10) par puits, et laissées au repos pendant environ 2 heures afin de permettre leur adhésion sur le fond des plaques. Les NP ou les ions ont ensuite été introduits directement dans le milieu à différentes concentrations, puis les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37°C/5% de CO₂.

Les cellules (lignées ou macrophages primaires) ont ensuite été récoltées à l'aide de grattoirs, puis 20 μ L de suspension cellulaire ont été dilués dans un volume équivalent de Bleu de Trypan 4%. Ce colorant vital pénètre dans les cellules dont la membrane est devenue perméable, c'est-à-dire les cellules mortes ou altérées, qui deviennent alors entièrement bleues, tandis que les cellules vivantes excluent le colorant et restent claires. Les cellules ont ensuite été observées au microscope optique, et comptées sur des lames de numération (Hycor). Le taux de mortalité a enfin été estimé en calculant le rapport entre le nombre de cellules mortes et le nombre total de cellules dans le champ. L'expérience a été renouvelée de façon indépendante au moins 3 fois pour chaque dose de NP et d'ions. Les résultats ont été analysés en utilisant le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney. La dose d'ions et de NP permettant d'atteindre environ 20% de mortalité cellulaire (DL20) a été retenue pour effectuer l'analyse protéomique ainsi que les tests fonctionnels complémentaires.

3. ANALYSE PROTEOMIQUE

3.1. Traitement des cellules et préparation des échantillons

Les lignées RAW 264.7 et J774A.1 ont étéensemencées à raison de 2×10^5 cellules/mL dans 30 à 50 mL de milieu complet en flasques non adhérentes, et laissées au repos pendant 24 heures à 37°C/5% de CO₂. Les NP de Cu et CuO, ainsi que les ions Cu²⁺, ont ensuite été introduits directement dans le milieu, à la dose correspondant à la DL20 déterminée lors des tests de viabilité. Les flasques ont alors été incubées pendant 24 heures supplémentaires en conditions standard. Dans le cas de l'étude sur le ZnO, seule la lignée RAW 264.7 a été utilisée pour l'analyse protéomique, pour des raisons de temps essentiellement. Les cellules ont étéensemencées comme précédemment, et exposées de même pendant 24 heures aux NP de ZnO cationique, ZnO/H₂O et aux ions Zn²⁺ aux DL20 correspondantes. Dans tous les cas, ces traitements ont été renouvelés 4 fois sur des cultures indépendantes, chaque expérience comprenant également 2 flasques de cellules non traitées (contrôles), afin d'assurer la fiabilité statistique des résultats.

Après exposition aux NP ou aux ions, les cellules ont été récoltées à l'aide de grattoirs, lavées 3 fois dans du tampon PBS (« *phosphate buffered saline* »), et le volume du culot cellulaire final a été estimé. Ce dernier a été repris dans un volume identique de tampon « TES » (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; sucrose 0,25 M), constituant un milieu iso-osmotique de faible force ionique, nécessaire pour les étapes suivantes de l'analyse. Un volume de tampon de lyse correspondant à 4 fois le volume total du mélange obtenu a ensuite été ajouté, et l'ensemble a été homogénéisé doucement et laissé pendant 30 minutes à 1 heure à température ambiante. Ce tampon de lyse est constitué d'urée 8,75 M, thiourée 2,5 M, CHAPS 5% (p/v), TCEP-HCl 6,25 mM, et spermine base 25 mM. Il permet la lyse des membranes cellulaires, améliorée aussi par le phénomène de dilution, ainsi que la précipitation des acides nucléiques en milieu basique (cf. Synthèse bibliographique, § 4.2, page 94). Ces derniers sont ensuite éliminés par ultracentrifugation à 270 000 g pendant 45 minutes à température ambiante. Les protéines totales dans le surnageant sont alors dosées selon la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, M.M., 1976), contre une gamme de concentrations connues de BSA, par mesure de l'absorbance à 595 nm (Jenway 7315 Spectrophotometer). Enfin, un cocktail d'ampholytes (Pharmalytes pH 3-10) a été ajouté dans les échantillons, à raison d'un

centième du volume total de surnageant récupéré, afin de protéger les protéines des réactions éventuelles de dégradation, notamment la carbamylation, et d'assurer la neutralité du pH. Les différents échantillons (4 répliques par condition) ont été conservés à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en attendant leur utilisation.

3.2. Electrophorèse bidimensionnelle

3.2.1. Isoélectrofocalisation (IEF)

L'IEF a été réalisée sur des gradients linéaires de pH 4-8 immobilisés préparés au sein du laboratoire. Pour cela, des gels d'acrylamide 4,5%, de hauteur 160 mm et d'épaisseur 1 mm, et contenant le gradient de pH, ont été coulés selon les protocoles existants (Gianazza, E., *et al.*, 1989 ; Rabilloud, T., *et al.*, 1994). Des bandelettes de 4 mm de largeur ont été découpées dans ces gels de gradient, et réhydratées sur la nuit avec les échantillons, préalablement dilués dans une solution de réhydratation (urée 7 M ; thiourée 2 M ; CHAPS 4% ; TCEP 5 mM ; ampholytes (Pharmalytes pH 3-10) 0,4% ; dithiodiéthanol 100 mM, en concentrations finales) de façon à atteindre une quantité de 120 μg de protéines totales dans un volume final de 600 μL (Rabilloud, T., *et al.*, 1997 ; Luche, S., *et al.*, 2004). Ceci permet notamment une répartition homogène des échantillons sur le volume total des bandelettes.

A l'issue de la réhydratation, les bandelettes ont été déposées sur un système de type Multiphor (GE Healthcare), afin de procéder à l'IEF, qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique, sous l'action de champs électriques de plus en plus élevés. Ainsi, l'IEF a ici été réalisée sur environ 24 heures, avec les paramètres électriques suivants : 1 heure à 100V, puis 300V pendant 3 heures, suivis d'1 heure à 1000 V, et enfin de 3400 V appliqués pendant la durée restante de l'IEF, jusqu'à atteindre 60 à 70 kWh au total. Les bandelettes contenant les protéines focalisées ont ensuite été placées pendant 20 minutes sous agitation dans un tampon d'équilibration (Tris 125 mM ; HCl 100 mM ; SDS 2,5% ; glycérol 30% ; urée 6 M), qui assure la continuité avec la migration sur gel SDS par la suite et confère également aux protéines focalisées la charge négative nécessaire à leur migration (du fait du SDS qui se fixe sur les protéines). Enfin, les bandelettes sont déposées en haut des gels SDS et scellées avec de l'agarose 1% dans une solution de Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 0,4% et bleu de bromophénol 0,005% (p/v), qui permet notamment le suivi du front de migration.

3.2.2. Electrophorèse SDS-PAGE et détection des protéines

La séparation des protéines selon leur poids moléculaire a été réalisée sur des gels de dimensions 160*200*1,5 mm, dans le système Tris-aurine décrit précédemment, à pH 7,9 et force ionique de 0,1 (Tastet, C., *et al.*, 2003). Ce système permet de visualiser, après séparation, la majeure partie des protéines de l'échantillon, sans pertes trop importantes des protéines de poids moléculaire trop élevé ou trop faible. Le tampon de gel est composé de Tris 180 mM, HCl 100 mM, acrylamide 10% (p/v), bisacrylamide 0,27% (concentrations finales). Les gels sont polymérisés à température ambiante par ajout de TEMED (tétraméthyléthylènediamine, 2 µM final) et d'ammonium persulfate (APS, 58 mM final).

Après dépôt des bandelettes issues de l'IEF en haut des gels, ceux-ci sont placés en cuve de migration électrophorétique contenant le tampon d'anode (électrode inférieure positive) : Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1%. Le tampon de cathode (électrode supérieure négative) est quant à lui constitué de : Tris 50 mM, aurine 200 mM, SDS 0,1%. Les échanges d'ions entre les deux tampons, ainsi que les charges conférées par le SDS, favorisent le déplacement des protéines de l'anode vers la cathode sous l'action des champs électriques appliqués, en fonction de leur masse moléculaire (le ratio masse-sur-charge étant équivalent). Ici, les paramètres électriques utilisés étaient les suivants : 1 heure à 25 V, permettant la concentration des protéines et leur entrée dans le gel, puis 12,5 W par gel, pour séparer les protéines, appliqués de façon constante jusqu'à ce que le front de migration atteigne l'extrémité inférieure des gels.

La détection des protéines a ensuite été réalisée en appliquant une coloration au nitrate d'argent rapide, selon les protocoles décrits précédemment (Chevallet, M., *et al.*, 2006). Les gels sont fixés pendant 30 minutes dans une solution d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v), puis pendant la nuit entière dans une solution d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 5% (v/v). Après plusieurs lavages de 10 minutes dans des solutions de concentration décroissante en éthanol (20% (v/v), 10% (v/v), puis eau seule 2 fois), ceux-ci sont plongés pendant 1 minute dans un bain de thiosulfate de sodium pentahydraté 0,02% (p/v), qui permet de sensibiliser les gels, puis rincés par deux bains d'eau successifs pendant 1 minute. Les gels sont alors immergés pendant 30 minutes dans un bain de nitrate d'argent 12,5 mM, qui se fixe sur les protéines de manière proportionnelle à leur quantité. Après rinçage pendant 15 secondes à l'eau, la

révélation est réalisée dans une solution de carbonate de potassium 3,5% (p/v), contenant également du thiosulfate de sodium pentahydraté 1,25% (p/v) et du formaldéhyde 8 mM, qui améliorent la fixation, la sensibilité et l'uniformité de la coloration. Une agitation modérée régulière permet ici d'éviter la formation de précipités. Les spots les plus intenses apparaissent en premier (relativement rapidement), et la révélation de l'ensemble du gel peut durer jusqu'à 30 minutes. Elle est stoppée par immersion des gels pendant 30 minutes minimum dans une solution de Tris-base 4% (p/v) et d'acide acétique glacial 2% (v/v). Enfin, les gels sont rincés 2 fois pendant 15 minutes dans l'eau avant d'être scannés en vue de l'analyse des images.

3.3. Analyse d'images

Après coloration au nitrate d'argent, les gels ont été scannés (Epson perfection V750) avec une acquisition paramétrée en niveaux de gris 16 bits. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Delta2D version 3.6 (Decodon GmbH, Allemagne). Chaque groupe expérimental est ainsi composé des 4 images de la condition correspondante, issues des 4 expériences réalisées sur des cultures indépendantes. Pour chacun de ces groupes, un gel de référence est choisi et les trois autres sont alignés par rapport à celui-ci (mode « *group warping strategy* »), afin de s'affranchir des décalages liés aux différences de migration entre deux expériences de gels 2D données. Le gel de référence de chaque groupe test est ensuite aligné avec celui du premier groupe contrôle (le second groupe contrôle étant ici considéré comme un groupe test supplémentaire permettant de limiter les faux positifs). Une image de fusion regroupant toutes les images alignées, et faisant donc apparaître tous les spots détectés sur au moins un gel, est alors constituée. La position des spots détectés sur cette image est ensuite transférée sur toutes les images d'origine. Le logiciel calcule alors l'intensité de chaque spot, exprimée en ppm de l'intensité totale des spots détectés sur l'ensemble du gel, ainsi que les ratios d'intensité dans les groupes tests par rapport au groupe contrôle de référence, pour lesquels la fiabilité statistique est calculée selon le test *t* de Student.

Les spots dont l'intensité n'est jamais supérieure à 100 ppm de l'intensité des spots totaux sont éliminés (filtres). Les spots conservés sont analysés et la variation par rapport au contrôle est considérée comme significative lorsque le ratio d'intensité (groupe test vs groupe contrôle) est à la fois $\geq 1,5$ ou $\leq 0,67$, et

associé à une valeur statistique $p \leq 0,05$ pour le test t . Les spots correspondants sont sélectionnés en vue d'une découpe. Pour cela, de nouvelles séries de gels 2D doivent être réalisées à partir des échantillons correspondants, dans les mêmes conditions que précédemment, et sur lesquels les échantillons peuvent être chargés jusqu'à 150 μg de protéines totales afin d'améliorer la visibilité des spots les moins intenses. Après coloration des gels au nitrate d'argent et acquisition des images, les spots sélectionnés sont découpés au scalpel le plus précisément possible afin d'éviter la présence d'acrylamide en excès par la suite, puis placés dans des plaques 96 puits en vue de l'identification des protéines qu'ils contiennent par spectrométrie de masse. Cependant, celle-ci nécessite une étape supplémentaire de décoloration des spots, qui doit être réalisée le jour même de la coloration pour assurer une meilleure sensibilité et une meilleure efficacité d'identification par spectrométrie de masse.

3.4. Identification des protéines par spectrométrie de masse

3.4.1. Décoloration des spots et digestion enzymatique des protéines

Les spots excisés sur les gels colorés au nitrate d'argent ont été décolorés en plaques 96 puits en utilisant la méthode ferricyanide/thiosulfate, selon les protocoles préexistants (Gharahdaghi, F., *et al.*, 1999 ; Richert, S., *et al.*, 2004). Brièvement, les spots sont incubés, sous agitation et jusqu'à disparition complète de la coloration brune du nitrate d'argent (environ 5 minutes), dans 100 μL d'une solution oxydante d'hexacyanoferrate de potassium 15 mM et thiosulfate de sodium pentahydraté 50 mM, obtenue à partir de solutions mères deux fois concentrées, préparées et mélangées à volume égal extemporanément. Les spots apparaissent alors jaunes. Après 3 rinçages de 5 minutes dans l'eau distillée, une solution de carbonate d'ammonium 200 mM est appliquée pendant 20 minutes sous agitation (100 μL /puits) afin d'accélérer et d'améliorer la décoloration. Enfin, les spots devenus translucides sont rincés 3 fois dans l'eau distillée, puis les plaques sont scellées et peuvent être conservées à $\leq -20^\circ\text{C}$ jusqu'à l'étape de digestion enzymatique.

La digestion enzymatique a été réalisée in-gel, à l'aide d'un système de digestion automatisé (MassPrep Station, Waters, Milford, Etats-Unis), en utilisant la trypsine, qui induit des coupures dans les protéines après les résidus lysine et arginine. Les fragments de gels préalablement décolorés (en plaques 96 puits)

sont déshydratés par 2 lavages avec une solution de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) 25 mM dans l'acétonitrile 50%, avant d'être séchés (SpeedVac). Puis, dans le robot MassPrep, 50 μL d'une solution de dithiothréitol (DTT) 10 mM en NH_4HCO_3 25 mM sont ajoutés sur les fragments de gels secs, et l'ensemble est incubé à 57°C pendant 1 heure sous agitation afin de permettre la réduction des résidus cystéines. Après élimination du surnageant, et retour à température ambiante, une étape supplémentaire d'alkylation est réalisée, par ajout d'une solution d'iodoacétamide 55 mM en NH_4HCO_3 25 mM, et incubation pendant 45 minutes sous agitation. Enfin, après déshydratation par 2 lavages successifs dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM en acétonitrile 50%, les protéines sont digérées dans le gel par ajout manuel de 10 μL /puits d'une solution de trypsine porcine modifiée (Promega, Madison, WI, Etats-Unis) à 12 ng/ μL en NH_4HCO_3 25 mM. La digestion se déroule sur la nuit entière, à température ambiante et sous agitation. Les peptides issus de la digestion sont ensuite extraits du gel dans 40 μL d'une solution d'acide formique 0,1% dans l'acétonitrile 60% pendant 1 heure à température ambiante. Après transfert dans de nouvelles plaques 96 puits (adaptées pour la spectrométrie de masse), le solvant est évaporé (SpeedVac) jusqu'à ce que le volume final soit de 10 μL environ, de façon à concentrer les peptides extraits pour l'analyse MS et MS/MS. Pour celle-ci, certaines analyses ont été menées sur un système de type nanoLC-ESI-Q-TOF, tandis que d'autres ont été faites sur un système nanoLC-ESI-IT, selon la disponibilité des instruments.

3.4.2. Analyse par NanoLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Ce premier système se compose d'un instrument de chromatographie liquide de type nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation, Milford, Etats-Unis), constitué d'une pré-colonne Symmetry C18 (20 mm \times 180 μm , particules de \varnothing 5 μm) et d'une colonne ACQUITY UPLC[®] BEH130 C18 (250 mm \times 75 μm , particules de \varnothing 1,7 μm), et couplé en série à un spectromètre de masse de type Synapt[™] High Definition Mass Spectrometer[™] (Waters Corporation, Milford, Etats-Unis). L'ensemble du système est piloté par l'interface informatique MassLynx version 4.1 SCN639 (Waters Corporation, Milford, Etats-Unis).

La chromatographie a été réalisée en injectant 4 μL d'échantillon sur la pré-colonne pendant 3 minutes avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, dans un solvant composé de 99% d'acide formique 0,1% en eau (solvant A) et de 1% d'acide formique 0,1% en acétonitrile (solvant B). L'élution des peptides a ensuite été réalisée sur la

colonne avec un débit constant de 300 nL/min, sur un gradient linéaire de 8 à 35% de solvant B établi sur une durée de 9 minutes. Les peptides élués ont ensuite été injectés dans le spectromètre de masse via une source électrospray équipée d'un système de *lock-mass* (utilisé pour la calibration), sous une tension capillaire de 2,8 kV, et une tension à l'extrémité du cône de 35 V. L'instrument a été calibré à l'aide de fragments issus d'un peptide de référence (Glu-fibrino peptide B, utilisé ici comme *lock-mass*), sur une gamme de masses m/z de 50 à 2000 : les données MS ont été calibrés à partir de l'ion doublement chargé de $m/z = 785,8426$; l'ion mono-chargé de $m/z = 684,3469$ a permis de calibrer les données MS/MS. Le système a également été paramétré pour passer automatiquement du mode MS (0,5 sec/scan sur une gamme m/z de 150 à 1700) au mode MS/MS (0,5 sec/scan sur une gamme m/z de 50 à 2000). Pour chaque scan MS, les 2 ions précurseurs les plus intenses ont été sélectionnés pour être fragmentés en chambre de collision, en utilisant l'argon comme gaz de collision, puis analysés par MS/MS.

Les données MS et MS/MS ont été traitées à l'aide du logiciel ProteinLynx Global Server version 2.3 (Waters Corporation, Milford, Etats-Unis), qui fournit les listes des valeurs m/z détectées (fichiers .pkl), après déconvolution de charge et *deisotoping* du signal, afin de ramener chaque massif observé sur les spectres à un pic mono-isotopique correspondant à un ion mono-chargé. Ceci permet en effet d'améliorer l'intensité du signal et le rapport signal-sur-bruit (réduction du bruit de fond). Ainsi, les listes obtenues peuvent être utilisées pour effectuer la recherche dans les banques de données protéiques.

3.4.3. Analyse par NanoLC-ESI-IT-MS/MS

Ce second système se compose d'un module de chromatographie liquide de type nanoLC-Chip (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, Palo Alto, Etats-Unis), constitué d'une pré-colonne d'enrichissement Zorbax 300SB-C18 (40 nL, particules de $\varnothing 5 \mu\text{m}$) suivie d'une colonne analytique Zorbax 300SB-C18 (43 mm \times 75 μm , particules de $\varnothing 5 \mu\text{m}$), et couplé en série à un spectromètre à trappe ionique de type amaZon (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne). L'ensemble du système est piloté par les interfaces informatiques HyStar version 3.2 et trapControl version 7.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne).

Le système de solvants utilisé pour la chromatographie est constitué ici d'un solvant A : acétonitrile 2% et acide formique 0,1% en eau, et d'un solvant B : eau 2% et acide formique 0,1% en acétonitrile. La chromatographie a été réalisée en injectant 4 μL d'échantillon sur la pré-colonne avec un débit de 3,75 $\mu\text{L}/\text{min}$, dans le solvant A. L'élution des peptides a ensuite été réalisée sur la colonne d'analyse avec un débit constant de 300 nL/min, sur un gradient linéaire de 8 à 40% de solvant B établi sur une durée de 7 minutes. Les peptides élués ont ensuite été injectés dans le spectromètre de masse, sous une tension à l'extrémité du capillaire de -1850 V. Le système a également été paramétré pour passer automatiquement du mode MS (8100 mesures de m/z par seconde, sur une gamme m/z de 250 à 1500) au mode MS/MS (32 500 mesures de m/z par seconde, sur une gamme m/z de 100 à 2000). Pour chaque scan MS, les 6 ions précurseurs les plus intenses ont été sélectionnés pour être isolés, fragmentés et analysés par MS/MS. Enfin, les données MS et MS/MS ont été traitées à l'aide du logiciel DataAnalysis version 4.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne), qui fournit les listes des valeurs m/z détectées (fichiers .mgf), après déconvolution de charge. Les listes obtenues sont utilisées pour effectuer la recherche dans les banques de données protéiques.

3.4.4. Traitement des données et identification des protéines

Les données MS/MS issues des deux types d'analyses (fichiers .pkl ou .mgf) ont été interprétées à l'aide d'un serveur local utilisant l'algorithme MASCOT version 2.4.0 (Matrix Science, London, Royaume-Uni) et les recherches ont été effectuées contre la banque de données UniProtKB/SwissProt. La recherche a été faite sur toutes les espèces référencées, en autorisant un clivage manqué par la trypsine. La tolérance de masse a été fixée à 15 ppm en mode MS et 0,05 Da en mode MS/MS pour les analyses Q-TOF, et à 0,3 Da pour les analyses par trappe ionique (modes MS et MS/MS). Les modifications variables de type carbamidométhylation des résidus cystéines et oxydation des méthionines ont été prises en compte. L'identification des protéines a été validée à partir de 2 peptides minimum ayant un score Mascot supérieur à 20, ou bien 1 seul peptide ayant un score Mascot supérieur à 30 et associé à 5 fragments consécutifs sur les spectres MS/MS.

4. ANALYSES FONCTIONNELLES COMPLEMENTAIRES

4.1. Cytométrie en flux

4.1.1. Principe général

La cytométrie en flux est une technique biophysique permettant l'analyse multiparamétrique simultanée des caractéristiques physiques et/ou chimiques de particules contenues dans un fluide. Elle est basée sur la combinaison de systèmes de fluidique, d'optique et d'électronique. L'un des avantages majeurs de cette technique est la possibilité d'analyser des quantités importantes de particules en un temps limité (jusqu'à plusieurs milliers d'événements par seconde), celles-ci pouvant être de taille comprise entre 0,2 et 150 μm . Ainsi, cette technique est largement utilisée pour la numération, le tri et la caractérisation des cellules, pour des applications allant du diagnostic à la découverte de biomarqueurs, ou encore pour le tri de populations cellulaires d'intérêt, l'étude du cycle cellulaire, etc.

Brièvement, la suspension à analyser est focalisée, et le débit est ajusté de façon à séparer progressivement les cellules, jusqu'à ce qu'elles se suivent une à une, à une distance au moins égale à leur diamètre (système fluidique). Celles-ci passent ensuite devant un rayon monochromatique (en général laser), qui vient exciter les éléments fluorescents qu'elles contiennent ou qui sont présents à leur surface. La lumière émise par ces fluorochromes (longueur d'onde supérieure à celle d'excitation) est alors récoltée par plusieurs détecteurs : un placé dans l'axe de la lumière incidente (« *Forward Scatter* » ou FSC), généralement corrélé au volume cellulaire, et plusieurs placés perpendiculairement à celle-ci (« *Side Scatter* » ou SSC), qui rendent compte de la complexité interne des cellules (nombre, forme et taille des organelles, des granules intracellulaires...). L'intensité de fluorescence relative des cellules est également mesurée (système optique). L'ensemble des signaux optiques est ensuite converti via un système électronique, permettant le traitement informatique des données. A l'issue de la mesure, certains instruments permettent également de fractionner la suspension en gouttelettes individuelles ne contenant chacune qu'une seule cellule, qui peuvent ensuite être chargées puis déviées dans un champ

électrostatique en vue de la récupération de certaines fractions d'intérêt (populations cellulaires rares par exemple).

Plusieurs types de techniques de cytométrie en flux sont disponibles, selon les longueurs d'ondes de la lumière incidente et les applications souhaitées. Dans ces travaux, deux techniques ont été utilisées : le FACS (« *Fluorescence-Activated Cell Sorting* »), dans lequel l'appareil est réglé de façon à émettre et à détecter une ou plusieurs longueurs d'ondes de fluorescence particulières sur les cellules en vue de l'analyse de constituants particuliers, et le MoFlo (« *Modular Flow* »), instrument très utilisé pour le tri cellulaire à haute vitesse, et qui est également doté d'un laser émettant dans l'UV, nécessaire pour certaines applications.

4.1.2. Estimation de la capacité phagocytaire

La fonction phagocytaire des macrophages peut être évaluée en incubant ceux-ci avec des billes fluorescentes, que l'on peut ensuite détecter par cytométrie en flux de type FACS (Abel, G., *et al.*, 1991). La fluorescence mesurée sur les cellules est alors proportionnelle à la quantité de billes internalisées par celles-ci. Dans ces travaux, la phagocytose a été analysée à la fois sur les lignées RAW 264.7 et J774A.1, et sur les macrophages primaires.

Les lignées ont étéensemencées en plaques non adhérentes 6 puits, à raison de 2×10^5 cellules/mL en milieu RPMI 1640 complet (SVF 10%), puis laissées au repos pendant 24 heures avant d'être traitées ou non aux NP et aux ions de cuivre ou de zinc à différentes concentrations. Chaque plaque a ici été réalisée en double exemplaire. Les macrophages primaires ont étéensemencés en plaques non adhérentes 6 puits à raison de 10^6 cellules/mL en milieu BM 10, et laissées au repos pendant 2 à 4 heures, avant d'être traitées de la même manière aux NP ou aux ions. Chaque plaque a également été réalisée en double exemplaire.

Après 24 heures d'exposition au cuivre ou au zinc, les cellules (lignées et primaires) ont été incubées pendant 2 à 4 heures avec des billes de latex fluorescentes vertes de $1\mu\text{m}$ de diamètre (Réf. L4655, Sigma-Aldrich), préalablement incubées pendant 30 minutes à 37°C , à la concentration de 55 mg/mL dans un mélange de PBS et de sérum de cheval (1:1 v/v), et ajoutées sur les cellules à raison de 5,5 mg/mL en

concentration finale. Ici, pour chaque jeu de deux plaques identiques, l'une a été placée à 37°C et l'autre à 4°C, température à laquelle l'ensemble du métabolisme et des activités cellulaires sont ralenties, et pour laquelle il ne devrait donc pas y avoir de phagocytose. Les cellules ont ensuite été récoltées et lavées deux fois au PBS froid (centrifugations de 5 minutes à 200 g et 4°C).

A ce stade, certaines billes pouvant être uniquement adsorbées en surface des cellules mais non internalisées pourraient être également détectées en cytométrie en flux, introduisant ainsi des faux positifs dans les résultats de l'analyse. Afin de s'affranchir de ce biais, une étape supplémentaire de désorption chimique a été mise au point. L'agent de désorption choisi doit ici permettre d'éliminer les billes adsorbées sur les cellules, sans affecter leur viabilité, ce qui implique également que la solution utilisée soit isotonique (250 mOsm). Plusieurs agents de désorption ont donc été testés : D-sorbitol 0,25 M, urée 0,25 M, butylurée 0,25 M, PEG200 0,25 M, PEG400 0,25 M, et hexylène glycol 0,25 M. Brièvement, des cellules de la lignée J774A.1 ont été traitées au rouge neutre (40 µg/mL en concentration finale, ajouté à partir d'une solution concentrée 100X dans l'éthanol 50% en eau), permettant d'évaluer leur viabilité, puis mises en présence des billes comme précédemment après changement du milieu. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS puis reprises dans 1 mL de solution d'agent désorbant, et incubées pendant 5 minutes sur glace. Enfin, après centrifugation (5 minutes à 300 g et 4°C) et reprise dans 250 µL de PBS froid, une partie des cellules a été observée en microscopie optique et à fluorescence afin de déterminer la toxicité des différents agents de désorption. Le reste des cellules a été analysé par cytométrie en flux afin de déterminer si ceux-ci sont efficaces.

A l'issue de cette optimisation, la désorption a été réalisée par incubation des cellules en présence de l'agent choisi pendant 5 minutes sur la glace. Puis les cellules ont été centrifugées (5 minutes à 300 g et 4°C) et reprises dans 250 µL de PBS froid, avant d'être analysées par cytométrie en flux, sur un instrument de type FACScalibur (Beckton Dickinson), paramétré selon les filtres d'excitation et d'émission de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, longueurs d'ondes à 488 nm et 530 nm, respectivement). L'analyse des données a été restreinte aux cellules vivantes uniquement, sélectionnées sur la base de leurs paramètres de taille et de granulométrie (FSC et SSC, respectivement). L'ensemble de l'expérience a été

renouvelé au moins 3 fois sur des cultures indépendantes. Les données ont été analysées grâce au test statistique non paramétrique de Mann et Whitney.

4.1.3. Dosage du glutathion réduit intracellulaire

Plusieurs techniques permettant de mesurer les niveaux de glutathion intracellulaire sont disponibles. Nous avons choisi d'utiliser ici une technique employant le monochlorobimane (MCB) (Rice, G.C., *et al.*, 1986), qui a précédemment fait l'objet d'optimisations au sein du laboratoire (Aude-Garcia, C., *et al.*, 2011). Le MCB, excitable dans l'UV, pénètre dans les cellules et forme un complexe covalent de façon spécifique avec le glutathion réduit (GSH), que l'on peut détecter à 450 nm. La fluorescence mesurée est ainsi proportionnelle à la quantité de GSH présent dans les cellules. Ce test a été réalisé à la fois sur les lignées RAW 264.7 et J774A.1, et sur les macrophages primaires.

Les lignées ont étéensemencées en plaques non adhérentes 6 puits, à raison de 2×10^5 cellules/mL en milieu RPMI 1640 complet (SVF 10%), puis laissées au repos pendant 24 heures avant d'être traitées ou non aux NP et aux ions de cuivre ou de zinc à différentes concentrations. Les macrophages primaires ont étéensemencés en plaques non adhérentes 6 puits à raison de 10^6 cellules/mL en milieu BM 10, et laissées au repos pendant 2 à 4 heures, avant d'être traitées de la même manière aux NP ou aux ions. Un contrôle négatif a également été réalisé dans chaque cas, par ajout de diéthylmaléate (DEM, 200 μ M final), composé capable de se lier au GSH de façon irréversible (Plummer, J.L., *et al.*, 1981).

Après 24 heures d'exposition au cuivre ou au zinc, les cellules (lignées et primaires) ont été récoltées, lavées deux fois au PBS préchauffé à 37°C, puis marquées au MCB par incubation pendant 5 minutes à 37°C et à l'obscurité dans 1 mL d'une solution mère à 50 μ M diluée en PBS chaud (7,5 μ L/mL de PBS). La réaction a ensuite été stoppée par incubation pendant 5 minutes sur glace et à l'obscurité, le MCB étant photosensible. Enfin, les cellules ont été centrifugées (5 minutes à 300 g et 4°C), reprises dans 250 μ L de PBS froid, puis analysés par cytométrie en flux sur un instrument de type MoFlo (Beckman Coulter), paramétré avec une longueur d'excitation dans l'UV (350 nm), et un filtre d'émission à 450 nm. L'analyse des données a été restreinte aux cellules vivantes uniquement, sélectionnées sur la base de leurs

paramètres de taille et de granulométrie (FSC et SSC, respectivement). L'ensemble de l'expérience a été renouvelé 3 fois sur des cultures indépendantes. Les données ont été analysées grâce au test statistique non paramétrique de Mann et Whitney.

4.1.4. Etude des variations de potentiel transmembranaire mitochondrial

Les variations de potentiel transmembranaire mitochondrial ont été analysées selon une méthode décrite précédemment, et basée sur l'internalisation par les mitochondries de la rhodamine 123 (Johnson, L.V., *et al.*, 1980 ; Ludovico, P., *et al.*, 2001). Ce composé non toxique pénètre dans les cellules où il atteint directement les mitochondries, dans lesquelles il est d'autant mieux internalisé que le potentiel transmembranaire est normal. Si ce dernier varie, l'internalisation est généralement réduite. Ainsi, la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de rhodamine internalisée, et les variations du potentiel transmembranaire induiront des variations d'intensité de fluorescence. Ce test a été réalisé à la fois sur les lignées RAW 264.7 et J774A.1, et sur les macrophages primaires.

Les lignées ont étéensemencées en plaques non adhérentes 6 puits, à raison de 2×10^5 cellules/mL en milieu RPMI 1640 complet (SVF 10%), puis laissées au repos pendant 24 heures avant d'être traitées ou non aux NP et aux ions de cuivre ou de zinc à différentes concentrations. Les macrophages primaires ont étéensemencés en plaques non adhérentes 6 puits à raison de 10^6 cellules/mL en milieu BM 10, et laissées au repos pendant 2 à 4 heures, avant d'être traitées de la même manière aux NP ou aux ions. En parallèle, un contrôle négatif a été réalisé dans chaque cas, par ajout d'azide de sodium (NaN_3 , 0,2% (p/v) final), composé inhibant les complexes III et surtout IV de la chaîne respiratoire, et induisant ainsi des variations du gradient de protons, et donc du potentiel transmembranaire (Harvey, J., *et al.*, 1999 ; Maneiro, E., *et al.*, 2005 ; Ludovico, P., *et al.*, 2001).

Après 24 heures d'exposition au cuivre ou au zinc, les cellules (lignées et primaires) ont été marquées pendant 30 minutes à 37°C par ajout directement dans le milieu d'une solution de Rhodamine 123 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en concentration finale). Les cellules ont ensuite été récoltées, lavées deux fois au PBS froid, puis reprises dans 250 μL de PBS froid. L'analyse par cytométrie en flux a été faite sur un instrument de type

FACScalibur (Beckton Dickinson), paramétré selon les filtres d'excitation et d'émission du FITC (488 nm et 530 nm, respectivement), les spectres d'excitation/émission des deux composés étant proches. L'analyse des données a été restreinte aux cellules vivantes uniquement, sélectionnées sur la base de leurs paramètres FSC et SSC, comme précédemment. L'ensemble de l'expérience a été renouvelé 3 fois sur des cultures indépendantes. Les données ont été analysées grâce au test statistique non paramétrique de Mann et Whitney.

4.2. Dosage du NO sécrété par les cellules

En conditions biologiques, l'oxyde nitreux (NO) est produit par les macrophages lorsque ceux-ci sont stimulés par la présence d'agents pathogènes ou de motifs spécifiques produits par ces derniers, tels que le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Les enzymes de synthèses du NO (NOS) utilisent pour cela l'arginine comme substrat. Lorsqu'une telle stimulation est reproduite *in vitro*, le NO sécrété par les cellules peut être dosé dans le surnageant de culture de façon simple, au moyen d'un dosage colorimétrique basé sur la réaction de Griess, déjà documentée précédemment (Sun, J., *et al.*, 2003). Le réactif de Griess réagit avec le NO pour former un composé stable détectable à 540 nm. L'absorbance mesurée est ainsi directement proportionnelle à la quantité de NO présent dans l'échantillon. Ce dosage a été réalisé à la fois sur les lignées RAW 264.7 et J774A.1, et sur les macrophages primaires.

Les lignées ont étéensemencées en plaques adhérentes 6 puits, à raison de 2×10^5 cellules/mL en milieu RPMI 1640 complet (SVF 10%), puis laissées au repos pendant 24 heures avant d'être traitées ou non aux NP et aux ions de cuivre ou de zinc à différentes concentrations. Chaque plaque a ici été réalisée en double exemplaire. Les macrophages primaires ont étéensemencés en plaques adhérentes 6 puits à raison de 10^6 cellules/mL en milieu BM 10, et laissées au repos pendant 2 à 4 heures, avant d'être traitées de la même manière aux NP ou aux ions. Chaque plaque a également été réalisée en double exemplaire.

Après 24 heures d'exposition au cuivre ou au zinc, les cellules (lignées et primaires) ont été stimulées pour produire du NO. Pour cela, pour chaque jeu de deux plaques identiques, l'une a été traitée avec du LPS issu

de souches de *Salmonella* (1 µg/mL en concentration finale), tandis que l'autre n'a pas été traitée et sert de témoin négatif de production de NO. En revanche, le substrat des enzymes NOS a été ajouté en excès sur les deux plaques sous forme de monohydrochlorure d'arginine (5 mM en concentration finale), afin de vérifier que la synthèse de NO n'a lieu qu'en présence de LPS. L'ensemble des plaques a alors été incubé pendant 24 heures supplémentaires à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récoltés, centrifugés (10 000 g pendant 10 minutes, 20°C) afin d'éliminer les cellules éventuellement en suspension et les débris, puis 500 µL de chaque condition ont été prélevés pour être dosés à l'aide d'un volume équivalent (500 µL) de réactif de Griess. Enfin, après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 540 nm (Jenway 7315 Spectrophotometer), contre une gamme de nitrite de sodium (NaNO₂) de 0 à 50 µM, afin de déterminer la concentration en NO présent dans les différents échantillons. L'ensemble de l'expérience a été renouvelé au moins 3 fois sur des cultures indépendantes. Les données ont été analysées grâce au test statistique non paramétrique de Mann et Whitney.

4.3. Dosage enzymatique du pyruvate

Le pyruvate, produit final de la voie de la glycolyse, joue un rôle essentiel dans le métabolisme central des cellules. Il peut notamment être utilisé dans le cycle de l'acide citrique mitochondrial, conduisant à la production d'énergie, ou également être recyclé par la voie de la néoglucogénèse, afin de restaurer les niveaux de glucose. La modification du niveau de production de ce métabolite peut ainsi être associée à certaines pathologies, dont le diagnostic nécessite alors le dosage spécifique du pyruvate. Celui-ci peut être réalisé par voie enzymatique, en présence des cofacteurs nécessaires. Dans le cadre de ces travaux, les effets du zinc sur la production de pyruvate ont été étudiés, à la fois sur les lignées et sur les macrophages primaires.

Des cellules de la lignée RAW 264.7 ont étéensemencées en flasques non adhérentes 25 cm², à raison de 2 x10⁵ cellules/mL en milieu RPMI 1640 complet (SVF 10%), puis laissées au repos pendant 24 heures avant d'être traitées ou non aux NP et aux ions de zinc à leurs DL20 respectives. Les macrophages primaires ont

été ensemencés en plaques non adhérentes 6 puits à raison de 10^6 cellules/mL en milieu BM 10, et laissées au repos pendant 2 à 4 heures, avant d'être traitées de la même manière aux NP ou aux ions zinc.

Après 24 heures d'exposition au zinc, les cellules (lignées et primaires) ont été récoltées, comptées sur cellules de Malassez, lavées 2 fois au PBS 1X froid (centrifugations 10 minutes, 1000 g, 4°C), et lysées en conditions natives par incubation pendant 30 minutes sur glace dans 500 μ L de tampon de lyse (Hépès 40 mM, CHAPS 1% (p/v), NaCl 100 mM, EGTA 2 mM, et $MgCl_2$ 2 mM, pH ajusté à 7,5). Après centrifugation (10 minutes, 10 000 g, 4°C), les surnageants ont été récoltés afin de réaliser le dosage du pyruvate, à l'aide d'un kit enzymatique (Sigma-Aldrich, Réf. MAK071) conduisant à la formation d'un composé coloré dont la quantité est proportionnelle à la quantité de pyruvate présent dans l'échantillon.

D'après les recommandations du fournisseur, une étape de déprotéinisation est nécessaire préalablement au dosage. Celle-ci a été réalisée par chargement des différents échantillons sur des colonnes de type Vivaspin 500 (Sartorius, Réf. VS0101) et centrifugation (10 minutes, 15 000 g, 20°C). L'efficacité de cette étape a été déterminée par dosage des protéines dans les échantillons avant et après leur passage sur colonne, selon la méthode de Bradford. Le dosage du pyruvate a ensuite été réalisé avec le kit, selon les indications du fournisseur. Les échantillons ont été déposés en plaques 96 puits, mis en présence des différents réactifs, puis les plaques ont été incubées sous agitation plane pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance a ensuite été mesurée par spectrophotométrie à 560 nm (Thermo Multiskan), contre une gamme de pyruvate de 0 à 10 nmol. L'ensemble de l'expérience a été renouvelée 4 fois sur des cultures indépendantes dans le cas de la lignée RAW 264.7, et une fois sur des macrophages primaires. La quantité de pyruvate mesurée a été normalisée en fonction de la quantité de cellules dans les différents échantillons. Les résultats ont été analysés selon le test statistique non paramétrique de Man et Whitney.

RESULTATS
et DISCUSSION

1. EFFETS DES NANOPARTICULES DE CUIVRE ET D'OXYDE DE CUIVRE

1.1. Préparation et caractérisation des nanoparticules de Cu et CuO

Les deux types de nanoparticules étant obtenus sous forme de nanopoudres (diamètre ≤ 50 nm) auprès du fournisseur, la première étape de l'étude consiste en la préparation de suspensions utilisables pour traiter les cellules par la suite. Compte tenu des propriétés des NP évoquées précédemment (cf. Synthèse bibliographique, § 3.3, page 72), les suspensions obtenues doivent posséder les caractéristiques suivantes :

- une dispersion optimale et homogène des particules, associée à une agrégation limitée ;
- une conservation de la taille nanométrique ;
- une stabilité dans le temps, assurant la reproductibilité des conditions d'exposition des cellules.

1.1.1. Optimisation de la dispersion des NP et caractérisation par DLS

Afin d'obtenir de telles suspensions, il est nécessaire de travailler à des concentrations initiales élevées en NP (≥ 1 mg/mL et parfois jusqu'à 500 mg/mL pour certaines particules). De telles concentrations favorisent en effet la conservation des dimensions nanométriques et limitent en partie les phénomènes d'agrégation. Dans cette étude, les concentrations des suspensions de Cu et CuO sont ainsi de l'ordre de 50 mg/mL.

De plus, afin d'optimiser la dispersion des NP, l'utilisation d'agents stabilisateurs (ou agents d'enrobage) est nécessaire. Ceux-ci doivent cependant avoir une toxicité nulle ou limitée vis-à-vis des cellules. Ainsi, il peut s'agir de protéines, telles que la gélatine ou l'albumine bovine (« *bovine serum albumin* », BSA), ou encore de polymères inertes, tels que le polyéthylène glycol (PEG) ou la polyvinylpyrrolidone (PVP40). Plusieurs composés ont été testés ici pour les deux types de particules (Tableau VII).

Enfin, la sonication des suspensions obtenues à forte puissance à l'aide d'un instrument de type *cup-horn* favorise également la dispersion des NP et, le cas échéant, leur enrobage par l'agent stabilisateur. Ici, des essais de dispersion ont été réalisés avec sonication avant (en eau stérile) ou après ajout de l'agent

d'enrobage (Tableau VII). Les suspensions de NP dispersées ont ensuite été analysées par diffusion de lumière (DLS), afin de déterminer la taille des particules et la présence ou non d'agrégats. Le Tableau VII présente les diamètres obtenus pour les particules en présence des différents agents stabilisateurs testés.

Agent stabilisateur (AS)	Cu (50 mg/mL)		CuO (50 mg/mL)	
	<i>Sonication avant AS</i>	<i>Sonication après AS</i>	<i>Sonication avant AS</i>	<i>Sonication après AS</i>
H₂O stérile seule	1000 nm	N/A	210 nm	N/A
BSA (1 mg/mL)	280 nm	720 nm	650 nm	600 nm
Gélatine porcine (1 mg/mL)	1300 nm	410 nm	380 nm	330 nm
PVP40 (1%)	400 nm	230 nm	230 nm	250 nm
PEG 8000 (1%)	2500 nm	240 nm	240 nm	530 nm
Dextran (1%)	4000 nm	250 nm	400 nm	340 nm

Tableau VII : Diamètres maximaux obtenus par DLS pour les NP de Cu et CuO en suspension, en présence de différents agents stabilisateurs (AS). Les suspensions mères (NP à 50 mg/mL) ont été diluées à 10 µg/mL par dilutions successives en eau stérile dégazée. N/A : non applicable.

Ces résultats montrent que, malgré la présence d'agents stabilisateurs et l'utilisation de procédés de sonication à haute puissance, les nanopoudres forment tout de même des agrégats de taille minimale une fois mises en suspension. Ainsi, aucune des suspensions testées n'a permis d'obtenir des particules de taille réellement inférieure ou égale à 100 nm. Cependant, on peut considérer que des diamètres compris entre 200 et 250 nm restent d'ordre nanométrique. De plus, les dimensions obtenues ici sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature. En effet, Karlsson *et coll.* ont étudié les effets de nanoparticules de CuO obtenues sous forme de nanopoudres de 42 nm de diamètre moyen, mais atteignant d'après leurs mesures en DLS un diamètre de 200 à 220 nm une fois en suspension (Karlsson,

H.L., *et al.*, 2008 ; Karlsson, H.L., *et al.*, 2009). De même, Hanagata *et coll.* ont travaillé avec des NP de CuO initialement obtenues sous forme de poudre de 50 nm de diamètre, mais formant des agrégats de 300 nm environ une fois mises en suspension dans leurs milieux de culture (Hanagata, N., *et al.*, 2011).

Par ailleurs, afin d'assurer la cohérence expérimentale lors des traitements sur cellules, il était important de choisir un agent stabilisateur permettant une dispersion satisfaisante avec les deux types de NP. Ainsi, compte tenu des résultats, ce choix pouvait s'orienter vers le PEG 8000 ou le PVP40. C'est ce dernier qui a été choisi pour la suite des travaux, puisqu'il présente notamment une cytotoxicité plus faible que les PEG. Enfin, les données précédentes montrent également que la dispersion des NP est optimale lorsqu'elles sont soniquées directement en présence du PVP40 pour le Cu, alors que le CuO doit être soniqué en eau seule avant l'ajout de ce stabilisateur. C'est pourquoi, dans ce dernier cas, afin de favoriser l'enrobage, une étape supplémentaire de sonication en bain à ultrasons est également réalisée après avoir rajouté le PVP40.

Après avoir choisi les conditions de dispersion, le comportement des NP en suspension a également été évalué dans le milieu de culture cellulaire (DMEM), en présence ou non de sérum de veau fœtal (SVF). L'analyse par DLS a permis de déterminer non seulement la taille des particules, mais aussi le degré de stabilité et d'homogénéité dans les différents milieux, grâce au pourcentage de polydispersité (Pd). Ainsi, sur le type d'appareil utilisé ici, une suspension homogène est associée à un pourcentage Pd de l'ordre de 20 %. Les données obtenues montrent que le diamètre moyen des NP augmente légèrement dans le milieu de culture seul (en moyenne + 12 nm pour Cu, et + 32 nm pour CuO), de même que le pourcentage Pd (+ 8 % pour Cu, et + 4 % pour CuO) (Tableau VIII). Ceci suggère que l'introduction des NP dans les milieux de culture sans sérum induit la formation d'agrégats supplémentaires.

En revanche, la présence de SVF dans le milieu de culture semble améliorer la taille et, dans le cas du CuO, l'homogénéité des NP (Tableau VIII, Figure 48). On peut supposer que ceci est permis par la présence des protéines nombreuses dans le sérum utilisé en culture cellulaire. Or, il a déjà été montré que certaines NP sont capables d'adsorber les protéines, et que leur agrégation est alors moins importante (MacCusprie, R.I., *et al.*, 2010). De plus, les effets positifs du sérum sur la dispersion des NP ont déjà été observés par d'autres groupes auparavant, notamment Cronholm *et coll.* (Cronholm, P., *et al.*, 2011).

Suspension / diluant	Diamètre moyen (nm)	Polydispersité (% Pd moyen)
Cu-PVP40 / H ₂ O	228 ± 25	16 ± 6
Cu-PVP40 / DMEM	240 ± 20	24 ± 8
Cu-PVP40 / DMEM + SVF 1%	207 ± 17	24 ± 5
CuO-PVP40 / H ₂ O	250 ± 17	19 ± 2
CuO-PVP40 / DMEM	282 ± 35	23 ± 7
CuO-PVP40 / DMEM + SVF 1%	271 ± 10	20 ± 5

Tableau VIII : Analyse par DLS des caractéristiques des NP dispersées dans les milieux de culture.

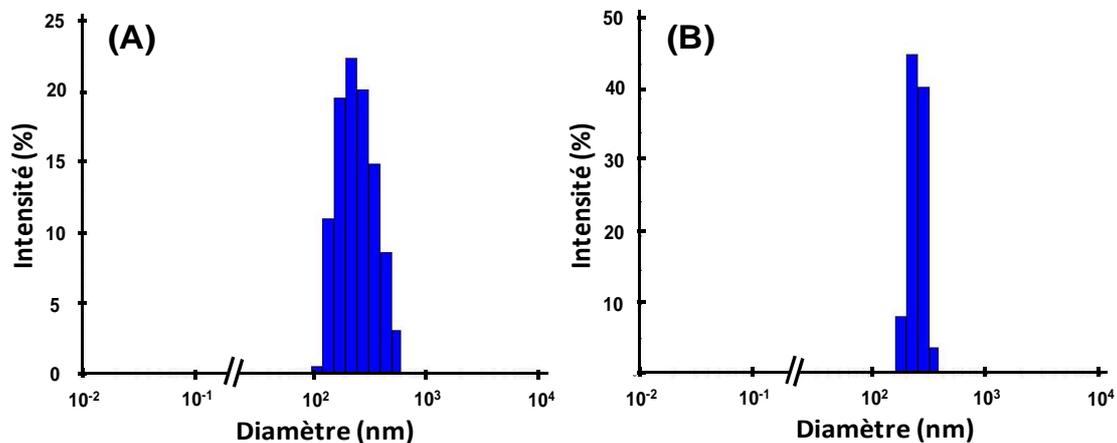


Figure 48 : Histogrammes de dispersion de tailles obtenus par DLS pour les suspensions CuO-PVP40 diluées dans les milieux de culture cellulaire. (A) DMEM seul ; (B) DMEM + SVF 1%.

Enfin, la stabilité dans le temps des suspensions a été évaluée par mesures régulières de la taille des particules par DLS. Ces mesures ont montré que les suspensions Cu-PVP40 et CuO-PVP40 conservent leur taille moyenne et leur homogénéité sur une période d’environ 2 mois (données non présentées ici). Au-delà de cette période, les particules s’agglomèrent, et il est nécessaire de préparer de nouvelles suspensions, qui seront également caractérisées par DLS.

Par ailleurs, il est important de préciser ici qu’au cours de la réalisation de cette étude, des problèmes de stabilité importants sont survenus après plusieurs mois avec les NP de Cu. La méthode de dispersion choisie

ne permettant alors plus d'obtenir des suspensions similaires à celles utilisées depuis le début de l'étude, nous avons tenté d'obtenir des informations auprès du fournisseur quant à des changements éventuels dans les procédés de fabrication des NP. Cependant, les informations obtenues sont restées très limitées. De ce fait, les NP de Cu ont dû être écartées de la suite du travail, et certains essais réalisés plus tardivement au cours de la thèse n'ont pu être menés que sur les NP de CuO.

1.1.2. Caractérisation des NP en suspension par microscopie électronique

L'analyse des NP de Cu et CuO en suspension en présence de PVP40 par microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de confirmer les données obtenues par DLS. En effet, comme le montre la Figure 49, les dimensions des deux types de NP dans ces suspensions sont comprises entre 200 et 250 nm de diamètre moyen.

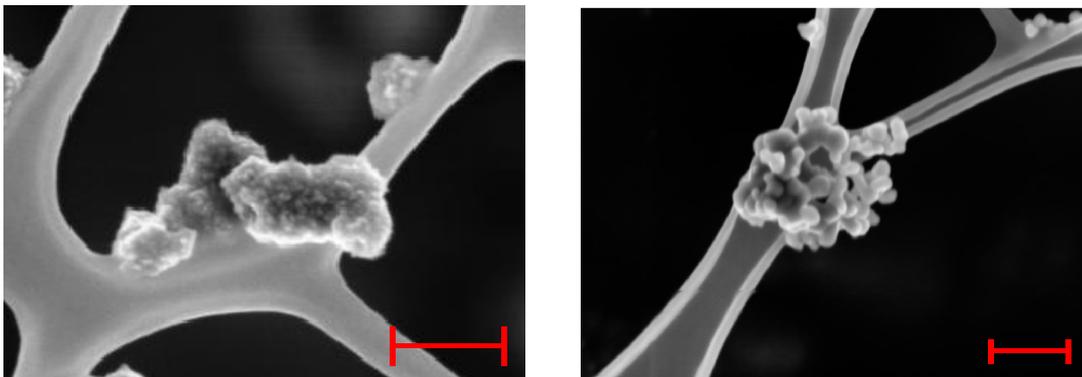


Figure 49 : Caractérisation des NP de Cu (gauche) et CuO (droite) par MEB. La barre d'échelle rouge représente 200 nm. Grossissement = $\times 200\ 000$; tension d'accélération = 3 kV ; distance de travail = 4,1 mm.

Cette analyse fournit également des informations complémentaires quant à la forme et à l'aspect des deux types de NP : le Cu se présente sous la forme de particules individuelles relativement compactes et plus ou moins sphériques, tandis que le CuO constitue plutôt de petits agrégats de forme floconneuse. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence de nature chimique entre les deux NP. En effet, dans le cas de l'oxyde métallique, la présence de l'oxygène pourrait induire des interactions supplémentaires entre les NP de plus petite taille, contribuant à leur agrégation.

1.1.3. Evaluation du degré de dissolution des NP dans les milieux de culture

Afin d'évaluer la proportion de NP éventuellement dissoute sous forme ionique dans les milieux de culture cellulaire, les particules dispersées de CuO-H₂O (sans ajout de PVP40) et de CuO-PVP40 ont été introduites pendant 24 heures à différentes concentrations dans du milieu RPMI contenant 10 % de SVF (conditions de culture et d'exposition des lignées cellulaires utilisées dans ces travaux). Deux situations ont été testées ici : milieu de culture conditionné (ayant contenu des cellules au préalable), et non conditionné. Après élimination des NP par ultracentrifugation, la fraction ionique dans les différentes conditions a été dosée à l'aide du zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene), indicateur formant des complexes avec les ions métalliques divalents, en particulier le cuivre (Cu²⁺) et le zinc (Zn²⁺), à différentes valeurs de pH, et permettant ainsi la détection colorimétrique de ces éléments (Rush, R.M., and Yoe, J.H., 1954 ; Richter, P., et al., 1997 ; Säbel, C.E., et al., 2010). Comme évoqué précédemment, ces essais ayant été réalisés plus tardivement au cours de la thèse, seuls les résultats obtenus pour le CuO sont présentés ici (Figure 50).

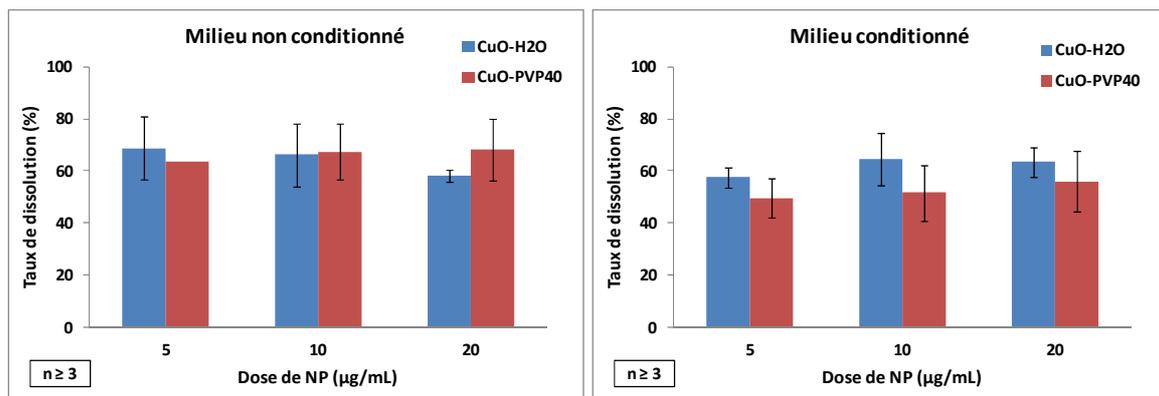


Figure 50 : Taux de dissolution des NP de CuO après 24h en milieu RPMI conditionné ou non conditionné. Le taux de dissolution est exprimé en pourcentage de la dose de NP introduite initialement.

Les données obtenues montrent que, après 24 heures en milieu de culture RPMI, les NP de CuO sont en moyenne dissoutes à 60 % sous forme ionique. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les suspensions avec et sans agent de dispersion (PVP40). De même, le taux de dissolution des NP est similaire dans les milieux conditionné et non conditionné. Cette fraction ionique importante est à prendre en compte lors de l'évaluation des effets toxiques des NP, puisqu'elle pourrait elle-même contribuer à ces

effets (cf. Synthèse bibliographique, § 3.6, page 85). Néanmoins, Midander *et coll.* ont montré que les NP de Cu et CuO pouvaient libérer 30 à 40 % de cuivre dans les milieux de culture (DMEM), mais que les effets cytotoxiques de cette fraction sur des cellules A549 étaient bien moins importants que ceux liés aux NP elles-mêmes (Midander, K., *et al.*, 2009). Piret *et coll.* ont également observé les mêmes phénomènes sur des cellules HepG2 exposées aux NP de CuO, pour lesquelles la fraction ionique libérée était de l'ordre de 10% pour une concentration de NP de 20 µg/mL et semblait avoir une contribution minimale aux effets cytotoxiques (Piret, J-P., *et al.*, 2012).

1.2. Evaluation de la cytotoxicité sur les lignées RAW264.7 et J774A.1

La cytotoxicité des NP de Cu et CuO sur les lignées a été estimée à partir du taux de mortalité des cellules en présence de différentes doses de NP (suspensions dispersées avec PVP40). Ce dernier a été déterminé par le test d'exclusion de colorant au Bleu de Trypan. Les effets des NP ont été comparés à ceux des ions Cu²⁺ à des doses équivalentes (Figure 51).

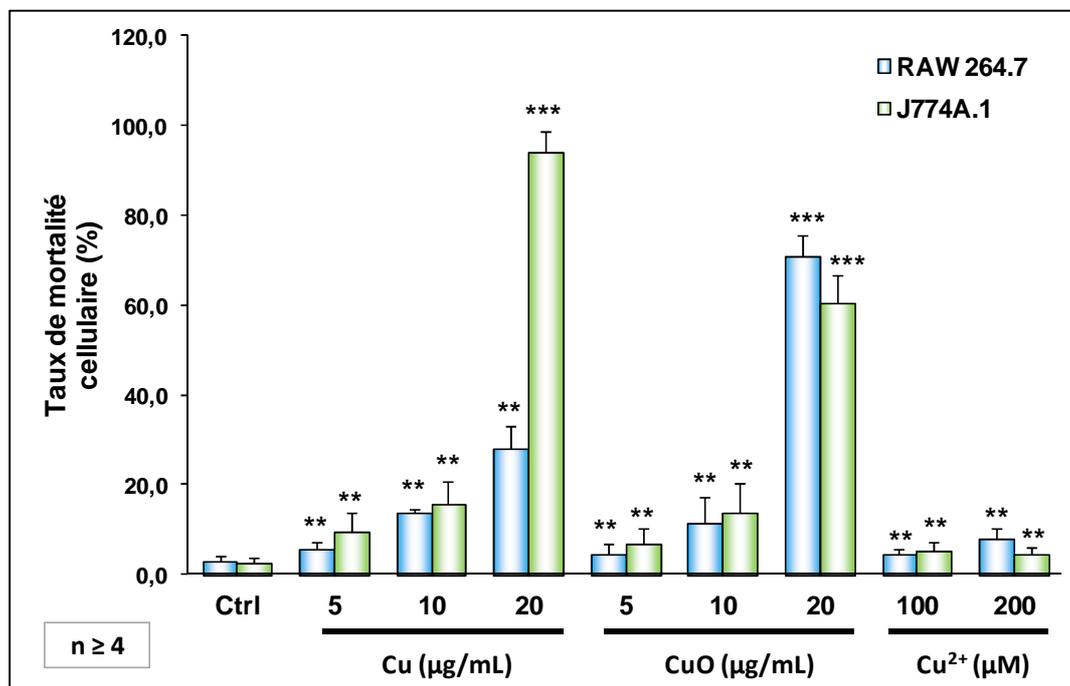


Figure 51 : Taux de mortalité cellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1 en présence de NP et d'ions cuivre. Les cellules ont été exposées pendant 24h à différentes doses de Cu, CuO et ions Cu²⁺. Le taux de mortalité a ensuite été déterminé par test d'exclusion au Bleu de Trypan. Significativité statistique : ** pour $p \leq 0,01$ et *** pour $p \leq 0,001$ selon le test non paramétrique de Mann et Whitney.

Ces tests ont permis de déterminer pour les deux lignées la dose létale correspondant à environ 20% de mortalité cellulaire (DL20). Le choix de cette dose est déterminant pour la suite de l'étude, en particulier pour l'analyse protéomique. En effet, à cette dose, il est possible d'observer des effets suffisamment marqués au niveau protéomique, sans pour autant que ces effets ne soient uniquement liés à la mort cellulaire. Ainsi, pour les NP de Cu et CuO, celle-ci s'élève à 10 µg/mL (Figure 51). Au-delà de cette dose, le taux de mortalité cellulaire augmente très fortement, atteignant jusqu'à plus de 90 % (J774A.1 exposées à 20 µg/mL de Cu).

Ces valeurs semblent cohérentes avec celles trouvées dans la littérature. En effet, Piret *et coll.* obtiennent une DL20 de l'ordre de 8 µg/mL sur des cellules HepG2 (Piret, J-P., et al, 2012), tandis que sur des cellules Hep-2 exposées aux NP de CuO, Fahmy et Cormier obtiennent environ 25% et 45% de mortalité avec des doses respectives de 8 et 16 µg/mL de NP (Fahmy, B., and Cormier, S.A., 2009), qui encadrent la valeur que nous avons obtenue pour la DL20 sur les deux lignées de macrophages. De même, sur des cellules A549, Hanagata *et coll.* obtiennent 60% de mortalité à 25 µg/mL de NP (Hanagata, N., et al., 2011)), et Karlsson *et coll.* atteignent plus de 90% de mortalité à 40 µg/mL (Karlsson, H.L., et al., 2008). Cette dernière étude montre également qu'à la même dose (40 µg/mL), des NP d'oxyde de titane, d'oxydes de fer et d'oxyde de zinc induisent des taux de mortalité cellulaire toujours inférieurs à 25%. Les NP de CuO ont donc une toxicité plus importante que d'autres oxydes métalliques, et on peut considérer que la DL20 de 10 µg/mL est une dose relativement faible, notamment si l'on se réfère à certaines études faites sur les NP de TiO₂, pour lesquels on peut obtenir la DL20 avec des doses de l'ordre de 100 µg/mL sur des cellules Hep-2 (Osman, I.F., et al., 2010) voire même 1000 µg/mL sur des cellules pulmonaires humaines (Kim, I-S., et al., 2010).

On constate également une sensibilité accrue de la lignée J774A.1 par rapport à la lignée RAW 264.7, en particulier vis-à-vis des NP de Cu. En revanche, la lignée RAW 264.7 s'avère plus sensible au CuO qu'au Cu aux doses élevées (20 µg/mL), ce qui n'est pas le cas de la seconde lignée. Ces différences de sensibilité pourraient en partie s'expliquer par le fait que les deux lignées cellulaires ne correspondent pas à des macrophages de même stade de différenciation : la lignée J774A.1 est plus avancée vers le stage

macrophage que la lignée RAW264.7, dont la morphologie reste encore proche de celle des monocytes. De plus, la lignée RAW264.7 étant issue d'une tumeur induite par un virus murin, les modifications induites dans le génotype peuvent aussi expliquer la réponse différente des cellules. Ces résultats démontrent cependant l'intérêt de travailler sur deux lignées en parallèle, afin de s'affranchir des effets spécifiques à chacune d'entre elle.

Concernant les ions Cu^{2+} , des doses allant jusqu'à 200 μM de CuCl_2 ont été testées, cette dernière concentration correspondant à une quantité totale de cuivre de l'ordre de 12,7 $\mu\text{g/mL}$. Les doses d'ions appliquées sont donc équivalentes à la DL20 observée pour les deux NP. Or, à 200 μM d'ions, le taux de mortalité cellulaire des deux lignées reste inférieur à 10%. Des résultats similaires ont été obtenus par Seth *et coll.* sur des cellules HepG2 dans les mêmes conditions d'exposition et avec le même test de viabilité (Seth, R., *et al.*, 2004). Il apparaît donc ici que les ions seuls sont moins toxiques que les NP de cuivre et la fraction éventuellement dissoute à partir de celles-ci. Ceci suggère des effets spécifiques liés à la forme nanoparticulaire du cuivre et de l'oxyde de cuivre.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, on peut s'attendre à observer par la suite, notamment au cours de l'analyse protéomique mais aussi dans les tests fonctionnels complémentaires, des effets similaires entre les deux NP, et plus importants que ceux induits par les ions Cu^{2+} .

1.3. Analyse protéomique sur les lignées cellulaires

Nous avons choisi ici de travailler selon une approche protéomique globale, afin d'identifier au sein du protéome total des cellules, les protéines éventuellement affectées par les NP (inductions, répressions, éventuellement modifications post-traductionnelles...). L'identification de ces protéines, ainsi que des voies métaboliques auxquelles elles participent, permettra alors de formuler des hypothèses sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets toxiques des NP, que nous tenterons ensuite d'approfondir et de valider à l'aide de tests ciblés et fonctionnels basés sur d'autres techniques d'analyse.

Ainsi, l'analyse protéomique des effets des NP de Cu et CuO, ainsi que des ions Cu^{2+} , a été réalisée sur les deux lignées de macrophages RAW 264.7 et J774A.1. Pour cela, les cellules ont été exposées pendant 24 heures aux NP ou aux ions, puis les protéines totales ont été extraites, dosées, et analysées par électrophorèse bidimensionnelle. L'expérience complète a été renouvelée 4 fois sur des cultures indépendantes. Les images de gels ont été analysées à l'aide du logiciel Delta2D, qui a permis la détection et la quantification des spots dans les différentes conditions. Les spots issus des échantillons traités aux NP et aux ions, et montrant des variations statistiquement significatives par rapport à ceux issus des cellules non traitées (ratio d'intensité $\geq 1,5$ ou $\leq 0,67$, avec $p \leq 0,05$ pour le test t de Student), ont été sélectionnés pour être analysés par spectrométrie de masse. Celle-ci a consisté en une analyse par nanoLC-MS/MS afin d'identifier les protéines correspondantes, contre la banque de données UniprotKb/SwissProt.

1.3.1. Résultats de l'analyse protéomique sur la lignée RAW 264.7

i. Analyse globale

Les résultats obtenus ici ont fait l'objet d'une publication, récemment revue et soumise auprès du journal *Molecular and Cellular Proteomics*, et actuellement en révision. Les gels types obtenus pour cette lignée dans les différentes conditions sont donc illustrés sur la figure 4 de la publication, présente en annexe 1. L'analyse des images de gels a permis la détection d'environ 1400 spots avec une résolution satisfaisante, qui ont ensuite été analysés d'un point de vue quantitatif. Les spots variant de façon significative par rapport à la condition contrôle ont été identifiés par spectrométrie de masse. Les résultats de

l'identification sont présentés dans le tableau 1 de la publication (Annexe 1). L'ensemble des données étant également discuté plus en détails dans cette publication, seuls les points paraissant les plus importants sont exposés dans cette partie.

Sur cette lignée, il est important de noter que les NP ont été introduites aux DL20 correspondantes (soit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En revanche, le traitement aux ions a été effectué avec une dose de 25 μM , choisie d'après des résultats préliminaires obtenus précédemment dans le laboratoire, mais n'ayant, d'après les tests de viabilités présentés ci-dessus, aucun effet suffisamment marqué sur les cellules. De ce fait, nous focaliserons l'analyse des résultats présentés ici sur ceux obtenus pour les NP. Les effets du cuivre ionique à la DL20 (200 μM) seront analysés plus en profondeur lors des tests fonctionnels et ciblés présentés par la suite. De plus, l'analyse des distributions des valeurs p du test de Student dans les différentes conditions, a confirmé que les résultats obtenus avec du Cu^{2+} 25 μM ne pouvaient pas être statistiquement significatifs, tandis que ceux obtenus avec les deux NP le sont (cf. Annexe 1).

En outre, afin de démontrer la spécificité des résultats obtenus pour les NP de Cu et CuO, des expériences complémentaires ont récemment été réalisées par ailleurs dans l'équipe avec des NP d'oxyde de zirconium (ZrO_2), pour lesquelles il a été démontré auparavant que la toxicité est très limitée, notamment vis-à-vis de la lignée RAW 264.7 (Brunner, T.J., *et al.*, 2006). Ces particules ont été introduites en quantité équivalente à celle en NP à base de cuivre et l'analyse protéomique a été conduite dans les mêmes conditions. Elle a montré une quantité très faible de variations, dont aucune ne correspond à celles observées après traitement aux NP de Cu et CuO. Ceci renforce la spécificité des variations observées pour ces dernières.

Parmi les 1400 spots détectés sur les gels, on dénombre environ une quarantaine de variations quantitatives dans les conditions traitées, qui sont statistiquement significatives par rapport à la condition contrôle. Ainsi, le nombre total de variations correspond à environ 3% du protéome observable sur les gels. Cette faible proportion renforce ici la fiabilité et la spécificité des résultats. En effet, une quantité trop élevée de variations suggèrerait soit un biais dans la méthode d'analyse choisie, soit une mortalité cellulaire trop importante, rendant impossible la détermination des effets précis des NP en elles-mêmes.

Il apparaît également que les effets observés sont souvent plus marqués avec les NP de CuO qu'avec les NP de Cu (augmentation ou diminution plus forte de la quantité de protéines, et/ou meilleure significativité statistique), ce qui suggère ici une toxicité supérieure de l'oxyde métallique. Or, d'après les tests de viabilité présentés ci-avant, ceci est vérifié sur la lignée RAW 264.7, en particulier aux doses élevées. L'absence de différence de mortalité observée à la DL20 peut alors s'expliquer par le fait que, bien que le CuO induise des modifications plus importantes du protéome, celles-ci ne sont pas encore suffisantes à cette dose pour causer une mortalité plus élevée que celle induite par le Cu.

Par ailleurs, l'analyse globale montre que les protéines affectées sont impliquées dans divers processus et/ou compartiments cellulaires, en particulier la régulation du métabolisme central et mitochondrial, la synthèse et le repliement protéique, mais aussi la signalisation cellulaire, le cytosquelette, ou encore la réponse au stress oxydant, notamment le système impliquant le glutathion (cf. Tableau 1 de la publication en annexe 1). Ces différentes voies seront maintenant abordées plus en détails.

ii. Analyse de la réponse générale des cellules au stress

Du point de vue protéomique, certaines des variations observées et leur spécificité quant au traitement par les NP, pourraient cependant être remises en question, en particulier celles concernant le métabolisme central ainsi que la production et le repliement protéique, mais aussi, dans une moindre mesure, certaines protéines impliquées dans la signalisation, le cytosquelette ou la réponse au stress oxydant. En effet, des modifications dans ces processus sont classiquement détectées par ce type d'approche, et ce quelle que soit l'origine du stress subi par le modèle cellulaire. Il s'agit par exemple de protéines de la famille des énoleses, de protéines « *Heat Shock* » (HSP60, HSP70...), de déshydrogénases (glycolyse ou cycle de Krebs), de la GAPDH, de certaines ATP synthases, mais aussi de l'actine, la tubuline, la vimentine ou la tropomyosine, faisant partie du cytosquelette, ou bien encore également de peroxyrédoxines, qui répondent au stress oxydant, ou de protéines 14-3-3, acteurs dans la signalisation cellulaire. Cet ensemble récurrent de protéines modifiées, qui constitue en quelque sorte une réponse générale à toute situation de stress, a été nommé « déjà vu en protéomique » par certains auteurs (Petra, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009).

En revanche, dans cette étude, si certaines des protéines affectées par le traitement aux NP de cuivre sont effectivement communes avec celles du « déjà vu » classique, la majorité d'entre elles n'apparaissent cependant pas dans cette liste générale. A l'inverse, de nombreuses protéines faisant partie de cette liste classique n'ont pas été observées ici. De plus, pour les protéines communes au « déjà vu », les effets sont souvent contraires à ceux généralement observés. Ainsi, on peut en déduire que les effets observés ici sont bien liés presque exclusivement au traitement par le Cu ou le CuO nanoparticulaire (cf. publication en annexe 1).

iii. Analyse de la réponse au stress oxydant

L'induction d'un stress oxydant par les NP de cuivre et d'oxyde de cuivre est essentiellement marquée, d'après nos résultats, par une forte induction de l'hème oxygénase (ratios d'intensité vs contrôle jusqu'à 3,8 avec CuO, $p = 0,02$), de plusieurs formes de peroxyrédoxines (Prx1, forme oxydée ou native selon les cas ; ratio de 3,3 avec CuO, $p = 0,03$), et surtout par l'induction de la formyl glutathion hydrolase (ratio de 1,84 avec CuO, $p = 0,03$) et d'une sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase (ratio de 1,35 avec CuO, avec $p = 0,01$), enzymes impliquées dans la dégradation et la biosynthèse du glutathion, respectivement.

En revanche, d'autres classes d'enzymes, telles que les catalases et les superoxyde dismutases, connues pour intervenir dans la réponse au stress oxydant, n'ont ici été affectées que très faiblement, voire pas du tout (cf. Annexe 1). De façon générale, l'induction d'un stress oxydant par les NP métalliques est cohérente avec les données disponibles dans la littérature, certaines des protéines affectées étant particulièrement sensibles aux métaux lourds (Horie, M., *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent également que, pour répondre au stress induit par les NP de Cu et CuO, les cellules tentent d'augmenter leur niveau de glutathion intracellulaire. Afin d'approfondir et de valider cette hypothèse, des tests complémentaires permettant de doser ce dernier ont été mis en place et seront exposés par la suite.

iv. Analyse de la réponse mitochondriale

L'analyse protéomique a montré tout d'abord la répression d'une des sous-unités à centres fer-soufre du complexe membranaire NADH déshydrogénase (protéine « 8 », ratio de 0,6 avec CuO, $p = 0,002$). De telles sous-unités sont impliquées non seulement dans les transferts de protons et d'électrons, et par extension, dans le maintien du potentiel transmembranaire qui en découle, mais aussi dans le maintien de l'équilibre redox au niveau de la mitochondrie (Weiss, H., *et al.*, 1991 ; Moller, I.M., 2001 ; Murray, J., *et al.*, 2003 ; Chen, Y.R., *et al.*, 2005). La répression de cette protéine suggère donc une toxicité des NP métalliques vis-à-vis des protéines à centres fer-soufre des complexes respiratoires, pouvant induire des variations du potentiel transmembranaire.

Par ailleurs, on note également une induction de plusieurs autres protéines mitochondriales (cf. Tableau 1 de l'Annexe 1), parmi lesquelles le facteur d'élongation mitochondrial Tu (mit-EF-Tu) (ratio de 1,6 avec CuO, $p = 0,05$). Or, ce dernier est impliqué dans la synthèse de protéines de la chaîne respiratoire à partir du génome mitochondrial. Cette induction est donc cohérente avec celle observée pour certaines sous-unités de complexes membranaires de la chaîne respiratoire : une sous-unité du complexe cytochrome b-c1 (ratio de 1,4 avec Cu et CuO, $p \leq 0,007$), impliqué dans les transferts de protons et d'électrons permettant la synthèse d'ATP (Crofts, A.R., 2004), ainsi qu'une autre sous-unité du complexe NADH déshydrogénase ne contenant pas de centre fer-soufre (protéine « 3 », ratio de 1,55 avec Cu, $p = 0,03$). De plus, il a été montré que mit-EF-Tu possède des propriétés de protéine chaperonne, en particulier dans les situations de stress (Suzuki, H., *et al.*, 2007). Il semble donc cohérent que cette protéine soit induite sous l'effet des NP.

L'induction observée pour ces protéines suggère ici une sur-activation du métabolisme mitochondrial et de la chaîne respiratoire, en réponse à un déséquilibre induit par les NP métalliques. Cette réponse aurait ici pour objectif de compenser les éventuelles variations du potentiel transmembranaire, phénomènes déjà observés auparavant sur plusieurs modèles cellulaires exposés à des particules ou des ions à base de cuivre (Karlsson, H.L., *et al.*, 2009). Afin de tester cette hypothèse, les variations du potentiel transmembranaire mitochondrial ont été évaluées par un test ciblé basé sur l'internalisation de rhodamine 123.

v. Analyse des effets sur le cytosquelette

Concernant le cytosquelette, aucune modification significative n'a été observée sur les actines et les tubulines, pourtant classiquement observées dans le « déjà vu ». En revanche, nos résultats mettent en évidence la diminution de protéines telles que les tropomyosines (ratio jusqu'à 0,45 avec CuO, $p = 0,05$), participant à la structure et aux mouvements du cytosquelette d'actine-myosine, ainsi que de protéines inhibitrices des facteurs de dissociation Rho-GDP (Rho-GDI) (ratio jusqu'à 0,606 avec CuO, $p = 0,07$), impliquées dans la régulation de la formation des filaments d'actine (Annexe 1), et enfin d'une sous-unité d'une ATPase pompe à protons (ratio de 0,69 avec CuO, $p = 0,01$). Ces éléments étant des composants essentiels dans les mécanismes de phagocytose (cf. Synthèse bibliographique, § 1.2.3, page 45), nos résultats suggèrent une possible altération de ces mécanismes sous l'effet des NP de cuivre. De même que précédemment, celle-ci a donc été analysée en présence des NP et des ions, afin de corrélérer les données protéomiques à des événements fonctionnels.

vi. Autres modifications induites par les NP

D'autres modifications moins marquées ont été observées au cours de cette analyse, telles qu'une légère diminution de certains canaux ioniques (canaux à chlorure, ratio jusqu'à 0,7 avec CuO, $p = 0,03$), qui pourrait être liée à des perturbations de l'équilibre ionique des cellules résultant du stress induit par les NP. On note également une diminution pour une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN (« *proliferating cell nuclear antigen* », PCNA ; ratio de 0,66 avec CuO, $p = 0,02$), suggérant des difficultés pour les cellules à réparer les dommages éventuellement subis par les acides nucléiques, ce qui pourrait être étudié par des approches complémentaires telles que le test des comètes.

La diminution observée pour une ubiquitine thioestérase (ratio de 0,66 avec CuO, $p = 0,04$), peut quant à elle être associée à la sous-expression de facteurs de traduction et d'élongation et à l'induction de protéines ribosomales, suggérant ainsi une dégradation limitée et une surproduction des protéines dans le cadre de la réponse générale au stress.

Enfin, la diminution d'une adénylhomocystéinase (ratio de 0,47 avec Cu, $p = 0,004$), protéine contribuant au maintien du niveau intracellulaire en adénosine, elle-même favorisant les propriétés pro-inflammatoires des cellules, suggère des perturbations dans la capacité des macrophages à produire certains médiateurs de l'inflammation. Cette hypothèse a également été étudiée, par le biais de dosages complémentaires de l'oxyde nitreux (NO).

vii. Comparaison entre NP et ions

D'un point de vue global, l'ensemble de ces résultats montre essentiellement que les variations observées après traitement par les NP ne sont pas induites par le traitement aux ions, à l'exception de 5 protéines (la vimentine, un facteur d'élongation protéique, une sous-unité ribosomale, l'hème oxygénase, et la sous-unité de la glutamate-cystéine ligase). Ceci mettrait en évidence des effets spécifiques de la forme nanoparticulaire du cuivre. En revanche, comme expliqué précédemment, le faible taux de variations significatives observées avec l'ion peut aussi être lié à la dose trop faible utilisée pour le traitement des cellules.

Par ailleurs, il reste difficile de connaître exactement la part de toxicité liée aux NP en elles-mêmes et celle induite par la fraction ionique issue de leur dissolution, qu'elle soit intracellulaire ou extracellulaire. Or, la fraction dissoute dans le milieu de culture peut être relativement importante, comme cela a été démontré précédemment (jusqu'à 60 %). L'approfondissement et la confirmation de ces résultats est donc nécessaire à ce stade, notamment par le biais des tests fonctionnels et ciblés complémentaires.

1.3.2. Résultats de l'analyse protéomique sur la lignée J774A.1

Une analyse similaire à celle conduite sur RAW 264.7 a été réalisée sur cette seconde lignée. L'emploi de deux lignées cellulaires permet ici de s'affranchir des effets spécifiques à une lignée donnée, et d'obtenir ainsi un aperçu plus précis des effets des NP de Cu et CuO. De plus, sur cette lignée, les traitements aux ions Cu²⁺ ont été faits à partir des DL20 réelles, soit 200 µM. Il est donc possible de mieux comparer les effets entre NP et ions. Les gels types qui ont été obtenus pour cette lignée sont présentés sur la Figure 52. Comme précédemment, les spots montrant des variations quantitatives significatives ont été identifiés par MS/MS. Les résultats de cette identification sont présentés dans le Tableau IX.

i. Analyse globale

D'un point de vue quantitatif, l'analyse d'images par Delta2D a conduit à la détection d'environ 1650 spots également, parmi lesquels on dénombre une quarantaine de modifications statistiquement significatives, soit environ 2,5% du protéome visible sur les gels, ce qui correspond à ce qui a été observé sur la lignée RAW 264.7. D'une part, ceci met notamment en évidence le fait que l'approche et la méthode d'analyse choisies assurent une bonne reproductibilité dans la quantité de données obtenues sur le modèle cellulaire choisi (protéome observé, spots modifiés). D'autre part, ceci suggère que les deux lignées de macrophages, relativement proches malgré quelques différences physiologiques, sont affectées dans la même mesure par les NP. Cependant, si l'on s'intéresse au nombre de protéines induites (6) et réprimées (35), on constate que les protéines de la lignée J774A.1 sont majoritairement réprimées (Figure 52), alors que la moitié environ des protéines modifiées sur RAW 264.7 étaient plutôt induites. Ceci pourrait suggérer des effets toxiques plus importants des NP sur cette seconde lignée, que les cellules n'arriveraient plus à compenser. Or, cette différence de toxicité apparaît notamment dans nos tests de viabilité, en particulier à dose élevée en NP. Les différences de variations en protéomique pourraient donc s'expliquer, là encore, par les différences physiologiques existant entre les deux lignées.

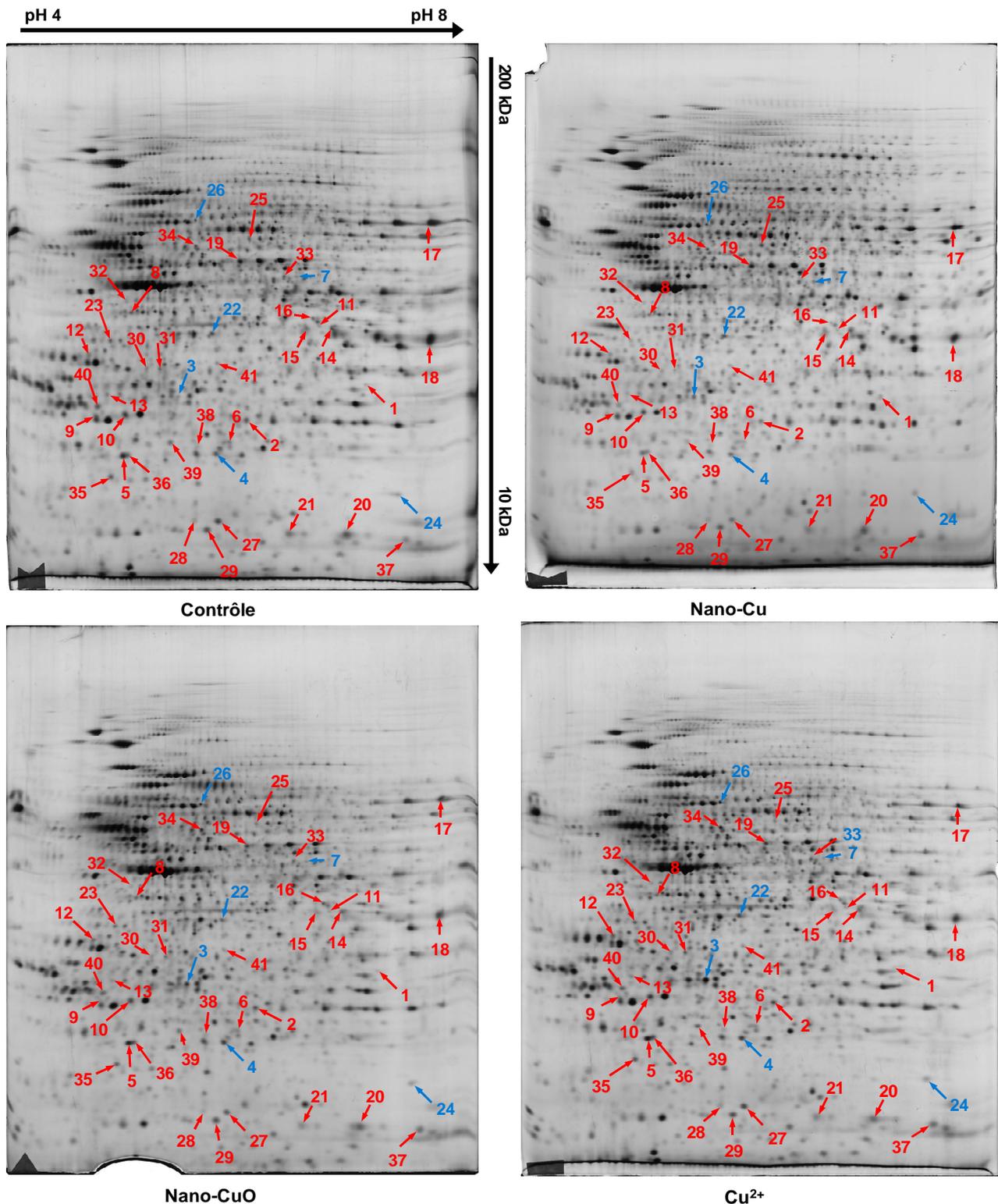


Figure 52 : Gels 2D obtenus pour la lignée J774A.1 traitée au cuivre. Les cellules ont été exposées pendant 24h aux NP de Cu ou CuO et aux ions Cu²⁺ à la DL20 correspondante. 150 µg de protéines totales ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle : 1^{ère} dimension (IEF) sur gradient linéaire de pH 4-8 ; 2^{ème} dimension (SDS-PAGE) de 10 à 200 kDa ; coloration au nitrate d'argent rapide. L'analyse quantitative des spots a été faite à l'aide du logiciel Delta2D. Flèches rouges : protéines réprimées dans au moins une condition ; flèches bleues : protéines induites dans au moins une condition. Les numéros correspondent à ceux du tableau d'identification (Tableau IX).

N°	Nom de la protéine (anglais)	Numéro d'accension UniProtKb	Poids moléculaire (Da)	Nombre de peptides uniques	Cu/contrôle		CuO/contrôle		Cu ²⁺ /contrôle	
					ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value

Réponse au stress oxydant

1	Glutathione S-transferase omega-1	O09131	27480	4	0,618	0,03	0,535	0,01	0,971	0,88
2	Peroxiredoxin-6 (forme native)	O08709	24854	6	0,797	0,04	0,852	0,01	0,990	0,85
3	Glutamate—cysteine ligase regulatory subunit	O09172	30517	2	1,677	0,04	1,735	0,02	1,790	0,09
4	Ferritin light chain 1	P29391	20784	3	0,717	0,27	1,654	0,03	1,294	0,35
5	Peroxiredoxin-2 (forme native)	Q61171	21761	5	0,755	0,07	0,753	0,04	0,944	0,59
6	Protein DJ-1	Q99LX0	20003	2	0,669	0,09	0,622	0,05	0,928	0,70

Mitochondrie

7	Elongation factor Tu, mitochondrial	Q8BFR5	49500	3	0,836	0,01	1,146	0,17	0,879	0,08
---	-------------------------------------	--------	-------	---	-------	------	-------	------	-------	------

Signalisation cellulaire

8	Guanine nucleotide-binding protein G	P08752	40522	4	0,787	0,08	0,598	0,03	0,834	0,13
9	14-3-3 protein zeta/delta (forme modifiée)	P63101	27754	5	0,696	0,21	0,535	0,02	0,992	0,94
10	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (forme modifiée)	Q99PT1	23390	3	0,892	0,31	0,782	0,02	0,967	0,60
11	Calcium-binding protein 39	Q06138	39853	2	0,881	0,16	0,692	0,01	0,939	0,54
12	Annexin A5	P48036	35736	2	1,068	0,64	0,788	0,01	0,858	0,08

Métabolisme central

13	Inositol monophosphatase 1	O55023	30419	4	0,713	0,08	0,876	0,38	0,654	0,05
14	Aldose reductase	P45376	35715	4	0,701	0,12	0,529	0,02	0,721	0,17
15	Aldose reductase	P45376	35715	3	0,776	0,15	0,597	0,03	0,886	0,39
16	Transaldolase	Q93092	37370	7	0,527	0,01	0,654	0,08	0,798	0,40
17	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P52480	57828	17	0,215	0,01	0,552	0,14	1,104	0,80
18	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	35792	7	1,231	0,42	0,159	0,01	1,235	0,39
19	Alpha-enolase	P17182	47124	5	0,835	0,26	0,647	0,01	0,841	0,13

Production et repliement protéique

20	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17882	6	0,652	0,02	0,859	0,26	0,995	0,95
21	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17882	2	0,560	0,06	0,342	0,01	1,043	0,80
22	60S acidic ribosomal protein P0	P14869	34353	3	0,941	0,49	0,685	0,01	1,022	0,70
23	Elongation factor 1-delta	P57776	31275	2	0,902	0,61	0,696	0,04	0,878	0,39
24	Transcription factor BTF3	Q64152	22150	2	1,338	0,08	1,167	0,43	1,304	0,03

Cytosquelette

25	T-complex protein 1 subunit beta	P80314	57459	2	0,815	0,18	0,788	0,03	0,840	0,19
26	T-complex protein 1 subunit theta	P42932	59499	8	1,439	0,05	1,202	0,33	1,223	0,21
27	Stathmin	P54227	17257	6	0,776	0,18	0,643	0,02	1,018	0,93
28	Stathmin	P54227	17257	4	0,481	0,04	0,335	0,02	1,043	0,88
29	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Q9CPW4	16303	4	0,843	0,21	0,281	0,00	1,128	0,26
30	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q61166	29999	3	0,901	0,23	0,297	0,00	1,086	0,39
31	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q61166	29999	4	0,957	0,77	0,706	0,04	1,032	0,78
32	Tropomodulin-3	Q9JHJ0	39487	3	0,770	0,21	0,540	0,03	1,081	0,73

Dégradation protéique											
33	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	Q8BG32	47448	3	0,744	0,02	0,979	0,78	0,941	0,50	
34	Cytosolic non-specific dipeptidase	Q9D1A2	52750	5	0,575	0,05	0,791	0,18	1,151	0,39	
35	Proteasome subunit beta type-9	P28076	23379	2	0,899	0,44	0,618	0,05	0,972	0,84	
36	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	20812	3	1,189	0,29	0,844	0,20	1,238	0,05	
Divers											
37	Nucleoside diphosphate kinase A	P15532	17190	5	0,169	0,00	1,101	0,66	1,070	0,64	
38	UMP-CMP kinase	Q9DBP5	22262	5	0,580	0,04	0,673	0,17	0,984	0,94	
39	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	Q9EPB4	21441	3	0,752	0,18	0,550	0,03	0,907	0,60	
40	Tumor protein D52	Q62393	24295	3	0,696	0,21	0,992	0,94	0,535	0,02	
41	Protein FAM49B	Q921M7	36731	4	0,930	0,70	0,306	0,01	0,926	0,71	

Tableau IX : Identification des protéines de la lignée J774A.1 affectées par les NP ou les ions cuivre.

D'un point de vue qualitatif, le Tableau IX montre que les variations détectées et identifiées, correspondent globalement aux mêmes groupes protéiques et voies métaboliques que ceux observés sur la lignée RAW 264.7, à savoir : la réponse au stress oxydant, le métabolisme central et mitochondrial, la signalisation cellulaire, la production et le repliement protéique, et le cytosquelette. Ceci pourrait suggérer des réponses similaires de la part des deux lignées. En revanche, des modifications supplémentaires ont été observées ici, pour un certain nombre de protéines impliquées dans la dégradation protéique, notamment par la voie du protéasome, qui n'apparaissent pas sur la lignée précédente. De plus, les protéines mitochondriales sont beaucoup moins affectées sur J774A.1, puisqu'une seule variation a été observée, contre 5 sur RAW 264.7.

Par ailleurs, sur l'ensemble des protéines modifiées, on constate que même à une dose de 200 μM , les ions Cu^{2+} n'ont que très peu d'effets statistiquement significatifs : seules 4 protéines sont affectées de façon significative ($p \leq 0,05$), dont deux sont impliquées dans la réponse générale des cellules au stress (répression de l'inositol monophosphatase 1 – métabolisme central – et induction du facteur de transcription BTF3 – biosynthèse protéique), et ne sont par ailleurs pas affectées par les NP. Toutes les autres modifications ne sont donc liées spécifiquement qu'au traitement par les NP. Là encore, ces données sont en accord avec celles des tests de viabilité, ainsi qu'avec celles de l'analyse protéomique sur RAW 264.7, montrant dans les deux cas une toxicité limitée des ions par rapport aux NP.

De plus, comme dans le cas de RAW 264.7, les NP de CuO semblent avoir des effets plus marqués que les NP de Cu (du moins en quantité) : les quelques modifications communes (4) sont toutes plus intenses et ont toutes une meilleure significativité statistique avec CuO, et le nombre de protéines modifiées uniquement par CuO (24) est plus important que celui des protéines modifiées uniquement par Cu (9). Cependant, ceci ne permet pas de déduire à ce stade que la toxicité du CuO est effectivement plus élevée que celle du Cu, puisque les protéines affectées par l'une ou l'autre des deux NP sont différentes sur le plan qualitatif. En effet, le CuO affecte principalement le cytosquelette, la signalisation, et dans une moindre mesure la réponse oxydante, ce qui peut être lié à sa nature d'oxyde métallique, et suggère des effets importants sur les fonctions du macrophage (phagocytose, réponse inflammatoire associée à la réponse oxydante...), tandis que le Cu affecte essentiellement la signalisation et le métabolisme central, qui constituent plutôt la réponse générale à tout type de stress. Cependant, les NP de Cu induisent aussi des modifications dans les voies de dégradation des protéines, qui peuvent avoir des conséquences néfastes pour les cellules, et sont également les seules à induire une modification pour une protéine mitochondriale. Dans tous les cas, la réalisation de tests fonctionnels complémentaires apparaît ici essentielle afin de mieux discerner les effets toxiques des deux NP.

Si l'on s'intéresse maintenant plus en détails aux protéines identifiées ici par rapport à celles identifiées sur RAW 264.7, on constate également des différences, bien que les voies métaboliques et compartiments cellulaires mis en évidence soient identiques.

ii. Analyse de la réponse générale au stress

Tout d'abord, concernant le métabolisme central, la production et le repliement protéique, et la signalisation cellulaire, qui correspondent à la réponse générale de la lignée à une situation de stress, les protéines identifiées sont essentiellement réprimées. Certaines de ces protéines sont communes à celles observées sur RAW 264.7, et/ou font partie de celles couramment identifiées dans les cellules soumises à un stress quel qu'il soit (« déjà vu ») (Petrak, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009) : α -énolase, GAPDH, annexine 5, protéines 14-3-3, divers facteurs de transcription et d'élongation... En revanche, on n'observe pas de modifications sur les protéines les plus classiques de réponse aux stress, à savoir les HSP, comme

cela a pu être observé par d'autres groupes avec des NP métalliques (Tsai, Y.Y., *et al.*, 2011). La réponse générale observée ici pourrait s'expliquer par le fait que les cellules concentrent leurs efforts dans les processus leur permettant de lutter contre le stress oxydant, induisant ainsi une baisse de régime dans les autres processus métaboliques.

iii. Analyse de la réponse au stress oxydant

La réponse au stress oxydant chez la lignée J77A.1 est marquée par l'induction par les deux NP de la sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase (GCLM) (ratio de 1,755 avec CuO, $p = 0,02$) et la répression de la peroxyrédoxine 6 (Prx 6) (ratio de 0,797 avec Cu, $p = 0,04$), déjà observées sur RAW 264.7. Elle est également complétée ici par la répression de la Prx 2 (ratio 0,753 avec CuO, $p = 0,04$) et de la glutathion S-transférase (GST) (ratio 0,535 avec CuO, $p = 0,01$), enzyme catalysant la fixation de composés toxiques sur le glutathion réduit (GSH) (Wu, G., *et al.*, 2004).

Ceci suggère, comme pour la lignée RAW 264.7, la mise en place par les cellules de mécanismes de détoxification mettant notamment en jeu le glutathion. Plus particulièrement, l'induction de la GCLM associée à la répression de la GST peuvent être interprétées comme un effort fourni par les cellules dans le but non seulement d'augmenter la quantité de glutathion réduit mais aussi de ne pas le consommer par ailleurs (« détournement » du système), afin de mieux lutter contre le stress induit par les NP. Le dosage des niveaux de glutathion intracellulaire s'avère donc intéressant ici, afin de confirmer ces données.

De plus, on observe également la répression d'une forme de la protéine DJ-1 (ratio de 0,622 avec CuO, $p = 0,05$), protéine largement étudiée dans le cas des maladies neurodégénératives de Parkinson et d'Alzheimer (Baulac, S., *et al.*, 2009). En effet, cette protéine, qui possède des propriétés de chaperonne et de peptidase, a surtout un rôle important dans les défenses anti-oxydantes, qu'elle renforce par plusieurs mécanismes directs ou indirects : (1) de façon directe, elle peut agir comme les peroxyrédoxines, et s'oxyder pour éliminer l' H_2O_2 ; (2) par voie indirecte, elle participe d'une part à la stimulation du protéasome pour l'élimination des protéines oxydées, et d'autre part à l'augmentation de la synthèse de glutathion, notamment par l'induction de la glutamate-cystéine ligase (Taira, T., *et al.*, 2004 ; Zhou, W., *and*

C.R. Freed, 2005 ; Yokota, T., *et al.*, 2003). L'identification de cette protéine renforce donc les résultats précédents (GCLM). Cependant, compte tenu de ses fonctions, cette protéine est plutôt induite lors de stress oxydants, et, à l'inverse, sa sous-expression mettrait en péril la survie cellulaire. La répression observée ici semble donc surprenante. Néanmoins, elle concerne une forme oxydée de la protéine, et l'on peut supposer que la forme réduite, nécessaire aux mécanismes antioxydants, reste inchangée ou est augmentée de façon non significative dans l'analyse protéomique, ce qui expliquerait qu'elle n'ait pas été identifiée ici.

Par ailleurs, le CuO induit également la chaîne légère de la ferritine (ratio 1,654, $p = 0,03$), protéine de stockage intracellulaire des métaux de transition, et en particulier du fer, traduisant des perturbations de l'homéostasie des métaux, et donc de l'équilibre redox des cellules. Une telle induction a déjà été observée sur des cellules pulmonaires de rats exposés à des particules contenant des métaux (Ghio, A.J., Carter, J.D., *et al.*, 1998 ; Ghio, A.J., Richards, J.H., *et al.*, 1998), et suggère que les cellules tentent de renforcer leur capacité de stockage des métaux en vue de leur détoxification.

iv. Analyse de la réponse mitochondriale

Concernant la réponse mitochondriale de la lignée J774A.1, on constate que celle-ci est très limitée par rapport à celle de la lignée RAW 264.7, et marquée uniquement par une légère répression du facteur d'élongation Tu (mit EF-Tu) avec le Cu (ratio 0,836, $p = 0,01$). Ce résultat est surprenant, puisque la modification est contraire à celle observée sur la lignée précédente (augmentation de 1,6 avec CuO). Ceci pourrait suggérer là encore une toxicité plus importante des NP sur la lignée J774A.1, empêchant les cellules de mettre en place les mécanismes leur permettant de compenser les déséquilibres induits, comme cela a été observé sur RAW 264.7.

Néanmoins, la répression de ce facteur n'est pas non plus suffisante pour induire des modifications détectables au niveau d'autres protéines mitochondriales, telles que les sous-unités des complexes membranaires, suggérant que le métabolisme mitochondrial et la chaîne respiratoire ne sont que très légèrement affectés par les NP, et que les cellules concentrent leurs efforts sur d'autres processus plus

touchés. Toutefois, il peut être intéressant d'étudier les éventuelles modifications du potentiel transmembranaire mitochondrial, afin de confirmer ou non ces observations.

En outre, la modification observée pour la protéine DJ-1 dans le cadre de la réponse au stress oxydant, justifie également la réalisation de ce test ciblé. En effet, il a déjà été montré que, lors de ce type de stress, cette protéine est aussi impliquée dans le contrôle du métabolisme mitochondrial. En particulier, la sous-expression ou l'absence de DJ-1 peut conduire à une réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial (McCoy, M.K., and M.R. Cookson, 2011). L'étude de ce paramètre reste donc intéressante dans ce contexte.

v. Analyse des effets sur le cytosquelette

En revanche, sur cette lignée, les protéines du cytosquelette sont beaucoup plus affectées, et sont également différentes de celles observées sur la lignée RAW 264.7. De plus, elles n'appartiennent pas non plus à la liste de protéines classiquement identifiées dans le « déjà vu en protéomique » (Petрак, J., et al., 2008 ; Wang, P., et al., 2009). Ici, on observe en effet la répression de plusieurs isoformes de la stathmine (ratio jusqu'à 0,335 avec CuO, $p = 0,02$), et de protéines de la famille RP/EB (ratio jusqu'à 0,297 avec CuO, $p = 0,00$), impliquées dans la régulation des microtubules, ainsi que la répression d'une sous-unité du complexe Arp-2/3 et de la tropomoduline-3 (ratios avec CuO jusqu'à 0,281, $p = 0,00$, et 0,540, $p = 0,03$, respectivement), protéines permettant et inhibant l'assemblage des filaments d'actine, respectivement. On note également des modifications légères (une répression et une induction) de certaines sous-unités du complexe T (TCP1), complexe de chaperonnes impliqué dans le repliement des actines et des tubulines.

Ces modifications affectent directement les éléments impliqués dans les mécanismes de phagocytose (cf. Synthèse bibliographique, § 1.2.3, page 45). On peut donc également s'attendre ici à des perturbations de ces mécanismes, en particulier avec le CuO. En effet, le blocage de la polymérisation d'actine (répression d'Arp-2/3) empêcherait de façon évidente la formation des pseudopodes membranaires nécessaires à la phagocytose. A l'inverse, la polymérisation non contrôlée de ces filaments (tropomoduline réprimée) pourrait induire la formation de « fibres de stress », pouvant conduire à une baisse de la capacité

phagocytaire des cellules, comme cela a été montré par O'Reilly *et coll.* dans le cas de macrophages soumis à un stress oxydant (O'Reilly, P.J., *et al.*, 2003).

Enfin, des protéines intervenant dans ces mécanismes de façon indirecte sont également affectées, mais dans une moindre mesure. En effet, on observe aussi la répression d'une forme modifiée d'une des protéines Rho-GDI (ratio de 0,782 avec CuO, $p = 0,02$), dont certaines étaient également modifiées sur la lignée RAW 264.7. Cependant, dans de dernier cas, les formes majoritaires des Rho-GDI restent inchangées. Il s'agit donc ici d'une modification mineure, dont les effets seuls ne suffiraient pas à induire des perturbations de la phagocytose, mais pourraient éventuellement s'ajouter à ceux des modifications des protéines citées précédemment (Arp-2/3, tropomoduline...).

Compte tenu de l'ensemble de ces observations, la phagocytose a été évaluée sur cette lignée après traitement aux NP, de même que sur la lignée RAW 264.7. Les résultats de ces tests seront présentés plus tard, dans le cadre de la validation fonctionnelle des données de l'analyse protéomique.

vi. Effets sur les processus de dégradation des protéines

Contrairement à la lignée RAW 264.7, l'analyse protéomique sur J774A.1 a également montré des modifications pour des protéines impliquées dans la dégradation protéique. En particulier, on note la répression de deux sous-unités du protéasome par l'une ou l'autre des NP (ratio jusqu'à 0,618 avec CuO, $p = 0,05$), dont une sous-unité régulatrice du protéasome 26S. Or, celui-ci participe habituellement aux mécanismes de détoxification lors de stress oxydants, notamment par l'élimination ubiquitine/ATP-dépendante des protéines oxydées, pouvant être toxiques pour la cellule (Aiken, C.T., *et al.*, 2011). La répression de certaines sous-unités de ce complexe observée ici semble donc surprenante, puisqu'elle pourrait mettre en péril la défense anti-oxydante des cellules. Cependant, d'autres groupes ont déjà observé le même type de répression en réponse à un stress oxydant, induit notamment par des métaux, et l'on suppose désormais que l'inhibition des sous-unités régulatrices du protéasome 26S favorise en fait la dégradation des protéines oxydées par les sous-unités catalytiques (Aiken, C.T., *et al.*, 2011 ; Yu, X., R.A. Ponce, *and* E.M. Faustman, 2011). Ainsi, nos résultats semblent cohérents avec ce modèle, et traduisent la

sur-activation des défenses anti-oxydantes mettant en jeu le protéasome afin de compenser le stress induit par les NP. L'absence de modifications similaires sur la lignée RAW 264.7 pourrait alors s'expliquer à nouveau par la sensibilité accrue de la lignée J774A.1 vis-à-vis des NP. Par ailleurs, il serait intéressant ici de tester les effets des NP sur les cellules après avoir préalablement traité celles-ci par des inhibiteurs du protéasome. On pourrait alors s'attendre à une mortalité cellulaire plus élevée pour les mêmes doses de NP, liée aux capacités détoxifiantes et anti-oxydantes limitées des cellules.

1.4. Validations fonctionnelles sur les lignées cellulaires

Afin d'approfondir et de valider les hypothèses établies à partir des données de l'analyse protéomique, plusieurs types de tests ciblés ont été réalisés. L'objectif est ici de tenter d'établir des corrélations entre les variations observées à l'échelle moléculaire, et des événements fonctionnels. Ces tests mettent en jeu majoritairement des techniques de cytométrie en flux, mais aussi de biochimie.

1.4.1. Etude de la capacité phagocytaire des cellules

L'analyse protéomique a montré que les NP de cuivre affectent un nombre important de protéines du cytosquelette, impliquées de façon plus ou moins directe dans les mécanismes de phagocytose. C'est pourquoi, afin de valider ces observations moléculaires, la phagocytose a été évaluée après traitement ou non des macrophages par les NP et les ions cuivre, puis mise en contact avec des billes fluorescentes de 1 µm de diamètre, soit du même ordre de grandeur que la taille des bactéries. La question qui se pose ici est de déterminer si les macrophages sont toujours aptes à phagocyter des composés exogènes après avoir été exposés au cuivre. Le taux de phagocytose a ensuite été évalué par cytométrie en flux (FACScalibur). La réalisation de ce test a tout d'abord nécessité la mise au point d'une étape de désorption, permettant de s'affranchir des éventuels faux positifs liés à l'adsorption de billes en surface des cellules.

i. Optimisation de l'étape de désorption des billes

Plusieurs agents de désorption ont été testés ici : le D-sorbitol, l'urée, la butylurée, le PEG 200, le PEG 400, et l'hexylène glycol. Dans un premier temps, la toxicité de chacun des différents agents a été évaluée, par un test de viabilité au rouge neutre. Ce colorant vital cationique pénètre dans les cellules où il s'accumule dans les lysosomes. Si les membranes sont altérées, il est libéré dans le milieu de culture. Généralement, après élimination du surnageant de culture et lavage des cellules, le colorant contenu dans les cellules vivantes est élué pour être dosé par spectrophotométrie à 540 nm, l'absorbance mesurée étant alors directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Dans les tests réalisés ici, le colorant n'a pas été élué, et les cellules ont été observées directement après lavage en microscopie optique afin de déterminer de façon rapide quels agents de désorption étaient les moins toxiques.

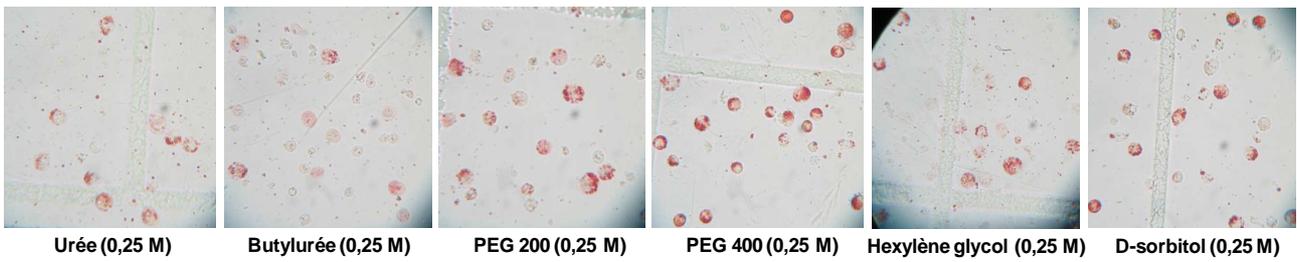


Figure 53 : Toxicité de différents agents de désorption sur les lignées de macrophages. Les cellules J774A.1 ont été colorées au rouge neutre pendant 2h à 37°C, puis incubées pendant 5 minutes sur glace avec les différents agents de désorption, rincées au PBS, et enfin observées en microscopie optique.

Les résultats montrent clairement que l'urée, la butylurée, le PEG 200 et l'hexylène glycol ont une toxicité élevée : les échantillons correspondants contiennent de nombreux débris cellulaires, et peu de cellules vivantes (rouges) sont observables par rapport à ce qu'il est possible d'obtenir dans les deux autres conditions (PEG 400 et D-sorbitol) (Figure 53). Seule l'efficacité de désorption de ces deux composés a donc été mesurée par cytométrie en flux. La Figure 54 montre que le bruit de fond observé à 4°C est plus élevé avec le PEG 400 qu'avec le D-sorbitol, que l'on retrouve dans un taux plus élevé de phagocytose à 37°C (faux positifs). Compte tenu de ces résultats, le D-sorbitol a été retenu pour l'ensemble des tests.

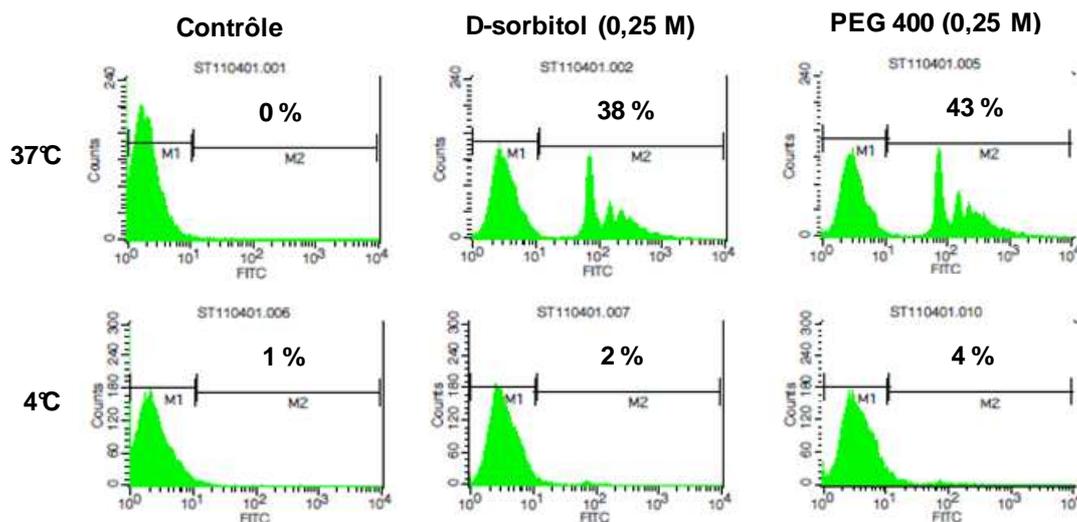


Figure 54 : Efficacité de 2 agents de désorption. Les cellules J774A.1 ont été exposées ou non (contrôle) aux billes fluorescentes pendant 2 à 4h à 37°C ou à 4°C, puis récoltées, rincées et incubées pendant 5 minutes sur glace avec chacun des agents à tester, avant d'être analysées par FACS (filtres FITC). La proportion de cellules phagocytaires (zone M2) est indiquée dans chaque condition.

ii. Effets du cuivre sur la phagocytose

Les effets des NP de Cu/CuO ainsi que des ions Cu^{2+} ont été évalués sur les deux lignées de macrophages, à leurs DL20 respectives. La fluorescence des billes phagocytées a été mesurée par cytométrie en flux, en utilisant les paramètres d'excitation/émission du FITC (495 nm/520 nm). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 55.

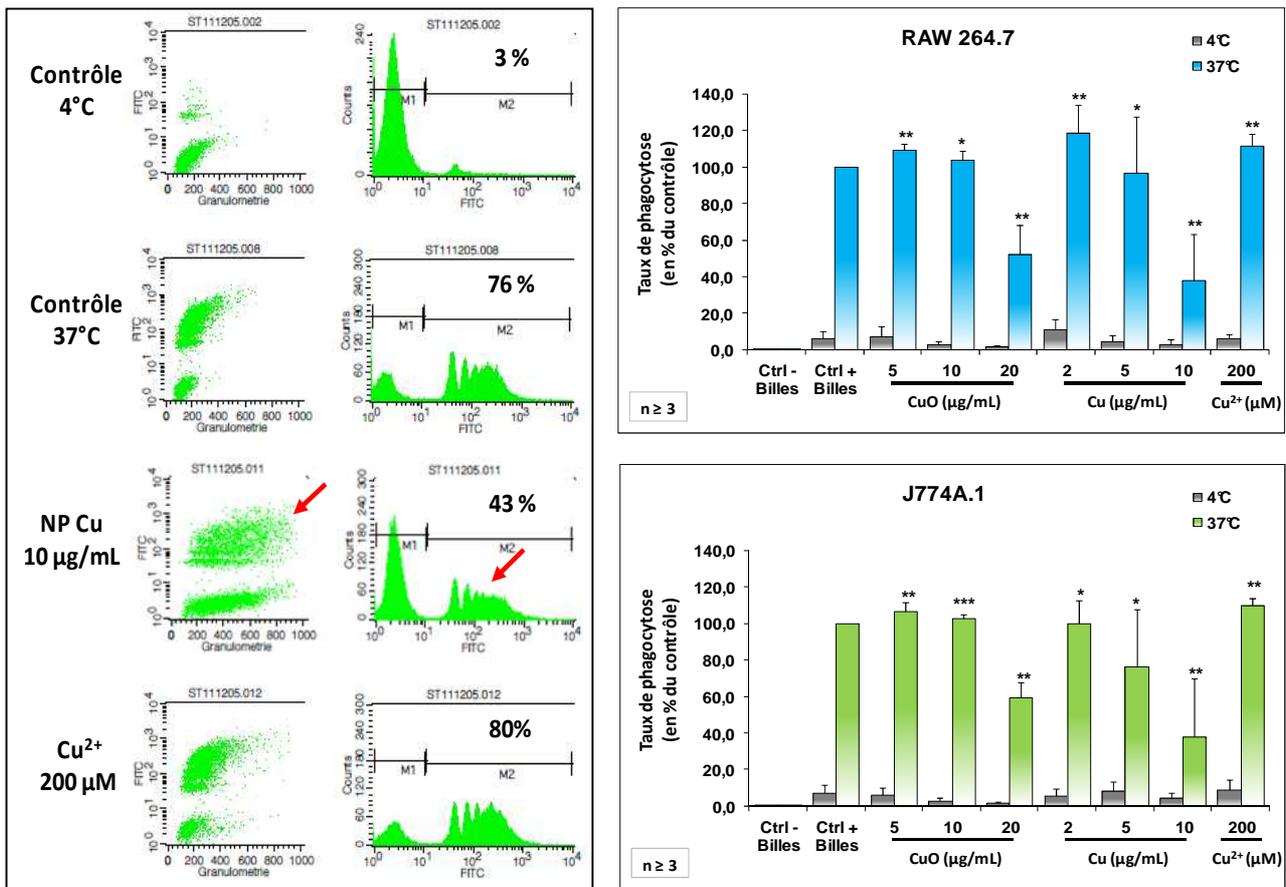


Figure 55 : Effets du cuivre sur la capacité phagocytaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis mises en présence de billes fluorescentes pendant 2h à 37°C ou à 4°C. La fluorescence des billes internalisées (cellules vivantes uniquement) a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). A gauche : Dot-plots et histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Taux de phagocytose moyen dans les différentes conditions, exprimé en pourcentage du contrôle à 37°C. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Tout d'abord, avec les conditions expérimentales choisies, notamment pour l'étape de désorption, on constate que le bruit de fond à 4°C (adsorption des billes en surface des cellules), est faible (3% dans l'exemple présenté ci-dessus, Figure 55, gauche), le pic principal observé entre 10^0 et 10^1 d'intensité correspondant ici à l'auto-fluorescence des cellules. Ceci permet d'affirmer que la fluorescence mesurée dans les conditions testées est bien uniquement celle des billes internalisées par les cellules. Par ailleurs, les résultats ont montré que, en l'absence de traitement au cuivre, 70 à 90 % des cellules sont phagocytaires : le nombre de pics d'intensité correspondant ici au nombre de billes phagocytées, on constate que la plupart des cellules sont capables d'internaliser au moins une et jusqu'à 4 billes ou plus. Cette internalisation des billes s'accompagne alors, de manière logique, d'une légère augmentation de granulosité des cellules (cf. contrôle 37°C, Figure 55, gauche). Ces observations mettent en évidence le fait que la phagocytose est effectivement une fonction majeure des macrophages.

Dans le cas des cellules traitées aux NP, en particulier avec le Cu, deux phénomènes sont observés : (1) l'exposition aux NP induit une augmentation très marquée de la granulosité des cellules, suggérant que les particules ont été internalisées par celles-ci (Figure 55, gauche, indiqué par une flèche rouge) ; (2) la capacité phagocytaire des cellules est diminuée de façon dose-dépendante en présence des deux NP (Figure 55, droite), de façon plus marquée avec le Cu qu'avec le CuO. En effet, à la DL20 de 10 µg/mL, le Cu induit une diminution d'un facteur ≥ 2 de la capacité phagocytaire (Figure 55, gauche, indiqué par une flèche rouge), ce qui suggère que la moitié des cellules ayant ingéré des NP de Cu deviennent ensuite incapables d'internaliser d'autres éléments.

On pourrait ici supposer que cette inhibition de la capacité phagocytaire n'est due qu'à un phénomène de saturation des cellules par les NP internalisées. Cependant, d'autres tests réalisés par ailleurs au laboratoire avec des NP de TiO₂ montrent que, même après traitement aux NP à des doses de l'ordre de 100 µg/mL, les macrophages sont toujours capables d'internaliser des billes fluorescentes (données non présentées dans le cadre de ces travaux). Les résultats obtenus ici sont donc parfaitement en accord avec les données de l'analyse protéomique, qui suggéraient de fortes perturbations des mécanismes de phagocytose, liées à l'atteinte de protéines impliquées directement (Arp-2/3, tropomoduline) ou indirectement (Rho-GDI) dans

ces derniers. En revanche, pour le CuO, la diminution de la phagocytose n'est observée qu'au-delà de la DL20 (ici à 20 µg/mL), ce qui est surprenant, compte tenu du fait que le CuO avait généralement des effets plus forts que le Cu dans l'analyse protéomique. Il est ici difficile d'expliquer cette différence, et l'approfondissement de ces observations sur des cellules primaires s'avère indispensable pour conclure de façon définitive sur les effets du CuO sur la phagocytose.

A l'inverse, lorsque les cellules sont exposées aux ions Cu²⁺ à la DL20 correspondante (200 µM), les profils obtenus (Figure 55, gauche) sont proches de ceux des cellules non traitées (pas d'augmentation marquée de la granulosité, ni de diminution de la phagocytose) et le taux moyen de phagocytose (Figure 55, droite) est également similaire au contrôle, voire légèrement supérieur. Ces observations sont également cohérentes avec celles de l'analyse protéomique, dans laquelle les ions n'avaient que très peu d'effets ou pas du tout (aucune variation induite sur les protéines précédemment citées).

En outre, on constate ici que les deux lignées de macrophages répondent de la même manière à la fois aux ions et aux NP, ce qui renforce la validité des effets observés. L'ensemble de ces données permet donc ici de conclure que les NP de cuivre, en particulier le Cu, affectent les éléments du cytosquelette impliqués dans les mécanismes de phagocytose, affectant ainsi la capacité des lignées de macrophages à internaliser d'autres éléments, dont la taille était ici proche de celle de bactéries. Or, ceci constitue la perte d'une fonction essentielle de ce type cellulaire dans leur rôle de défenses immunitaires innées. De telles altérations ne sont pas induites par les ions correspondants, suggérant ici des effets spécifiquement liés à la forme nanoparticulaire du cuivre.

1.4.2. Effets du cuivre sur le glutathion

Les données de l'analyse protéomique sur les deux lignées suggèrent l'induction d'un stress oxydant par les NP de cuivre, auquel les cellules répondraient majoritairement par des mécanismes mettant en jeu le glutathion. C'est pourquoi nous avons réalisé ici le dosage de ce marqueur du stress oxydant sur les deux lignées, en présence ou non de cuivre (NP et ions). La méthode choisie emploie le monochlorobimane (MCB), composé formant un complexe covalent spécifique avec la forme réduite du glutathion

intracellulaire (GSH), dont on peut ensuite détecter la fluorescence par cytométrie en flux. Les cellules des deux lignées ont donc été exposées aux NP et aux ions de cuivre, puis marquées au MCB, avant d'être analysées sur une plateforme de type MoFlo en utilisant des filtres d'excitation dans l'UV et d'émission à 450 nm. Les résultats obtenus dans les différentes conditions sont présentés sur la Figure 56.

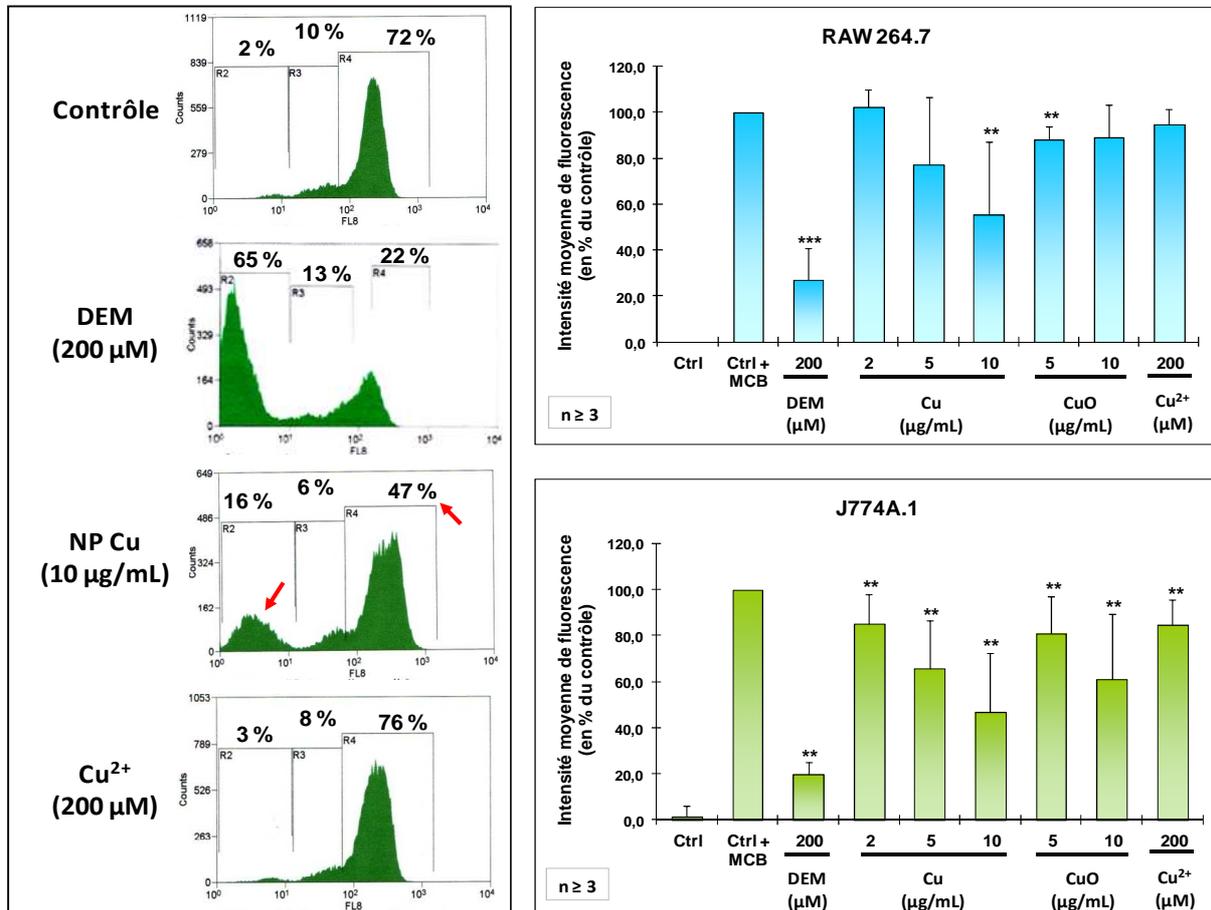


Figure 56 : Effets du cuivre sur le glutathion réduit intracellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis marquées au MCB pendant 5 minutes à 37°C. Un témoin négatif a été fait par traitement au diéthylmaléate (DEM). La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au MoFlo (Excitation/Emission : 350/450 nm). A gauche : Histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Intensité de fluorescence moyenne dans les différentes conditions, exprimée en pourcentage du contrôle. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : ** p<0,01 ; *** p<0,001.

Tout d'abord, pour des cellules non traitées, on observe un pic principal de fluorescence entre 10² et 10³, correspondant ici aux cellules dites « positives », c'est-à-dire celles contenant une quantité élevée de GSH, auquel le MCB s'est lié (Figure 56, gauche). Or, il existe au sein des cellules un équilibre permanent entre

les espèces réduite et oxydée du glutathion (GSH/GSSG). Ainsi, on suppose ici que la fixation covalente du MCB sur le GSH stimule la régénération de celui-ci à partir de la forme oxydée, jusqu'à ce que celle-ci soit épuisée. Dans ces conditions, ce pic principal correspond donc aussi globalement à la quantité totale maximale de GSH dans les cellules en conditions normales. Malgré la présence de populations minoritaires contenant des niveaux plus faibles de GSH (12% des cellules totales dans l'exemple présenté), la majorité des cellules sont détectées dans ce pic principal. Ceci signifie que la majorité des cellules contiennent des quantités élevées de glutathion, disponibles pour lutter contre d'éventuels stress oxydants.

Lorsque les cellules sont traitées au diéthylmaléate (DEM), connu pour induire la déplétion irréversible du glutathion intracellulaire, la population du pic principal est diminuée d'un facteur 3, et la majorité des cellules sont détectées entre 10^0 et 10^1 d'intensité, zone correspondant normalement à l'auto-fluorescence des cellules (non montrée ici). Ainsi, avec ce composé, la majorité des cellules ont effectivement perdu la quasi-totalité du glutathion qu'elles contenaient, et sont incapables de le régénérer. Ceci représente donc l'effet délétère le plus fort qu'il serait possible d'observer sur ces lignées.

L'exposition des cellules aux NP, et en particulier au Cu, induit une diminution de la population principale (d'un facteur ≈ 2 dans l'exemple présenté, Figure 56, gauche), suggérant la diminution du niveau de GSH intracellulaire total pour la moitié des cellules traitées. De plus, sur les deux lignées, et en particulier sur J774A.1 qui apparaît une fois encore plus sensible que RAW 264.7, cette diminution est dose-dépendante avec les deux NP, de façon plus marquée avec le Cu (perte de 45 à 55% à la DL20 de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) qu'avec le CuO (perte de 10 à 40% à la DL20) (Figure 56, droite). Cette diminution est aussi associée à l'augmentation des populations entre 10^0 et 10^2 d'intensité (dans l'exemple présenté : 22% avec Cu, contre 12% dans les cellules non traitées, Figure 56, gauche), contenant des niveaux faibles ou nuls de GSH, et/ou incapables de régénérer cette espèce à partir du GSSG.

Ainsi, les observations faites ici suggèrent une toxicité directe des NP de Cu sur le glutathion. De la même manière que pour le DEM, on peut envisager ici une fixation du Cu empêchant la régénération des espèces du glutathion nécessaires à la lutte contre le stress oxydant, et forçant ainsi les cellules à mettre en place des mécanismes de synthèse *de novo* de glutathion. Ceux-ci nécessiteraient alors la sur-activation des

enzymes de synthèse correspondantes, et en particulier de la glutamate-cystéine ligase (GCL), et la répression d'enzymes consommant le glutathion pour d'autres mécanismes que la réponse oxydante. Or, l'analyse protéomique a effectivement montré une forte induction de la sous-unité régulatrice de la GCL (GCLM), ainsi que la répression de la glutathion S-transférase (GST) dans le cas de J774A.1, qui suggérait un effort supplémentaire des cellules pour lutter contre le stress induit. Ainsi, les résultats de ce dosage corroborent ceux de l'analyse protéomique.

En revanche, lorsque les cellules sont exposées aux ions Cu^{2+} à la DL20 de 200 μM , les profils obtenus au MoFlo sont proches de ceux des cellules non traitées, montrant une population principale d'intensité élevée correspondant à la quantité totale maximale de GSH intracellulaire, et des populations très minoritaires contenant des niveaux plus faibles de glutathion (Figure 56, gauche). L'ensemble des dosages effectués montre que les ions n'ont effectivement pas d'effet marqué sur le niveau de glutathion des lignées (perte de 5 à 10%). Or, l'analyse protéomique montre que les ions ont des effets limités sur les protéines de réponse au stress oxydant par la voie du glutathion : ceux-ci sont restreints essentiellement à l'induction de la GCLM sur les deux lignées, qui pourrait donc être liée à la diminution modérée du GSH observée ici. Ainsi, les données des deux approches sont également en accord.

Les résultats obtenus ici montrent de façon globale que les NP de cuivre induisent un stress oxydant, auxquelles les cellules tentent de répondre en augmentant la synthèse *de novo* de glutathion, tandis que les effets des ions correspondants à dose équivalente sont faibles. Cependant, cette augmentation reste insuffisante pour revenir à un état redox normal. Or, l'analyse protéomique montre également que plusieurs autres protéines de réponse au stress oxydant sont affectées par les NP, en particulier des peroxyrédoxines, mais aussi l'hème oxygénase, ou encore la ferritine, qui interviennent notamment dans le cas de stress induits par les métaux lourds. L'ensemble de ces modifications traduisent donc un stress intense pour les cellules, que les mécanismes classiques de réponse ne leur permettent pas de contrôler, ce qui est ici confirmé par les effets directs observés sur le glutathion. Afin de confirmer encore ces résultats et de conclure de façon définitive sur ce point, la réalisation du même type de dosages sur des cellules primaires s'avère ici intéressante.

1.4.3. Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

L'analyse protéomique montre que les NP de cuivre induisent une réponse mitochondriale importante, en particulier sur la lignée RAW 264.7, qui se traduit par l'induction de facteurs d'élongation impliqués dans la synthèse de protéines des complexes de la chaîne respiratoire membranaire, dont certaines sous-unités sont également induites. La chaîne respiratoire étant couplée à un gradient transmembranaire de protons, ces modifications moléculaires suggèrent de possibles variations du potentiel transmembranaire associé. Sur la lignée J774A.1, la répression de la protéine DJ-1, pourrait aussi être associée à une diminution de ce potentiel. Afin de valider ces modifications, les variations de ce potentiel ont donc été mesurées par cytométrie en flux sur les deux lignées, après traitement ou non de cellules au cuivre, grâce à une méthode basée sur l'internalisation mitochondriale de rhodamine 123. Les résultats sont présentés sur la Figure 57.

Tout d'abord, en l'absence de traitement, la majorité des cellules sont concentrées dans un pic principal, dont l'intensité moyenne est de l'ordre de 650 (Figure 57, gauche). On considère ici que ce pic correspond également au potentiel transmembranaire maximal des cellules en conditions normales. Le traitement à l'azide de sodium (NaN_3), connu pour altérer la fonction mitochondriale, induit un déplacement de la totalité du pic principal vers une intensité moyenne de fluorescence inférieure (jusqu'à environ 200 en moyenne, Figure 57, gauche), qui traduit une diminution globale de l'internalisation de la rhodamine par les mitochondries, liée elle-même à une diminution du potentiel transmembranaire. Cette diminution est de l'ordre de 65 à 75% par rapport aux conditions normales (Figure 57, droite).

Concernant les effets des NP de cuivre, compte tenu de difficultés liées à la dispersion du Cu au moment de la réalisation de ces tests, seul le CuO a pu être utilisé ici. L'exposition des cellules au CuO , à la DL20 de 10 $\mu\text{g/mL}$, montre une forte augmentation de taille et de granulosité (Figure 57, gauche, indiqué en rouge), que l'on associe une fois encore à l'internalisation des NP par les cellules. Cette internalisation semble induire l'augmentation de populations cellulaires dont l'intensité de fluorescence, et donc le potentiel transmembranaire mitochondrial, sont très inférieurs à ceux observés en l'absence de traitement (intensité moyenne de l'ordre de 50 dans l'exemple présenté, Figure 57, gauche, indiqué en rouge). De plus, la sélection des cellules de taille et de granulosité les plus élevées (paramètres FSC/SSC) a confirmé que

celles-ci correspondent bien aux populations de faible intensité de fluorescence (données non montrées). L'analyse sur les deux lignées montre que, du fait de l'apparition de ces populations, l'intensité moyenne de fluorescence sur la population cellulaire totale est diminuée, et ce de manière dose-dépendante : la réduction est de l'ordre de 15 à 20% à la DL20, et peut atteindre jusqu'à 50% au-delà de cette dose (Figure 57, droite). Il semble donc ici que les NP de CuO perturbent fortement la fonction mitochondriale, induisant une diminution du potentiel transmembranaire associé. Ces données sont donc en accord avec celles de l'analyse protéomique, qui suggérait de tels effets.

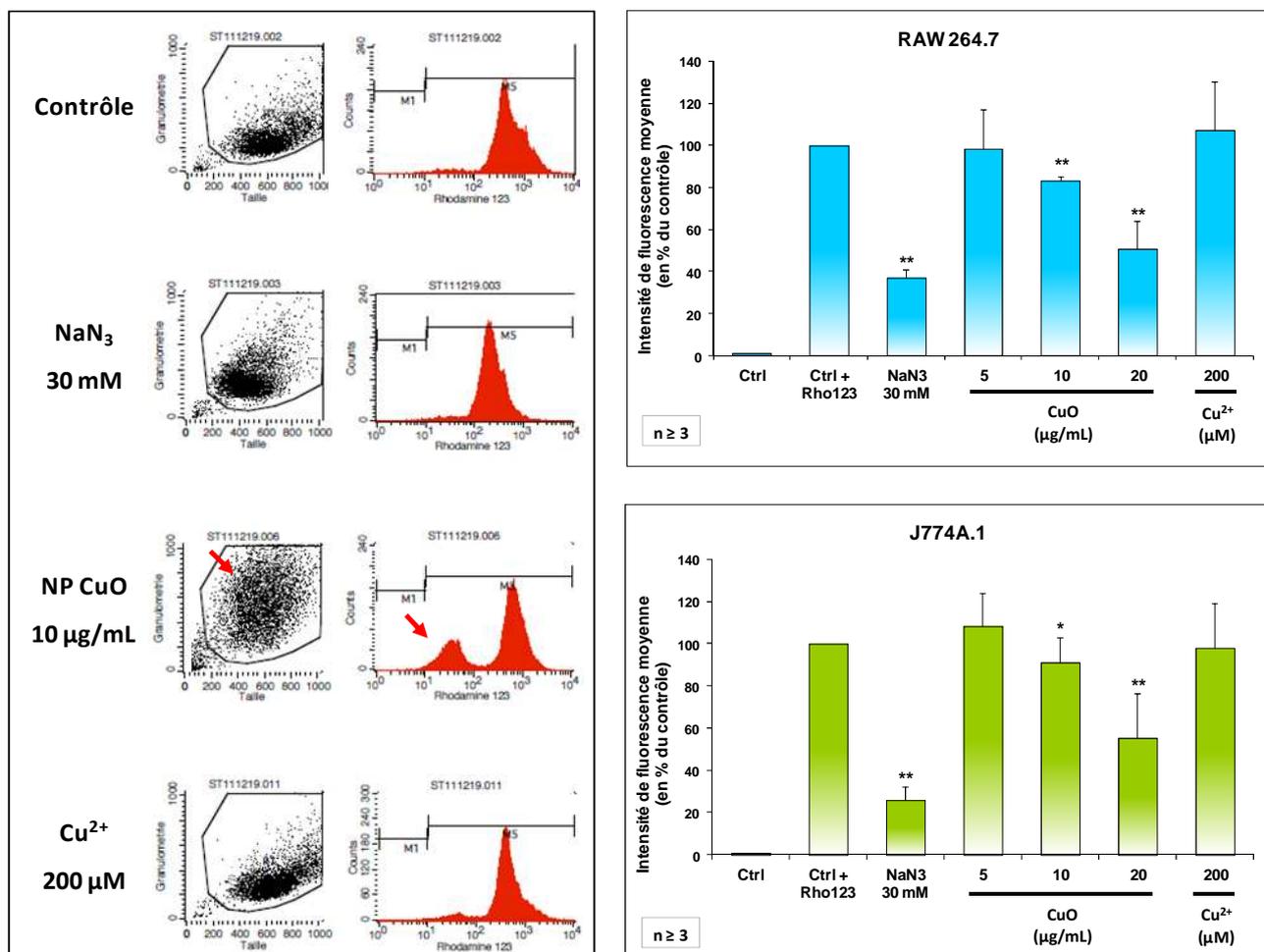


Figure 57 : Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h au CuO ou aux ions à différentes doses, puis marquées à la rhodamine 123 pendant 30 minutes à 37°C. Un contrôle négatif a aussi été réalisé par traitement à l'azide de sodium (NaN₃) pendant 2h à 37°C, puis marquage à la rhodamine 123. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). A gauche : Dot-plots et histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Intensité moyenne de fluorescence dans les différentes conditions, exprimée en pourcentage du contrôle. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * p<0,05 ; ** p<0,01.

A l'inverse, lorsque les cellules sont exposées aux ions, les profils obtenus (Figure 57, gauche) sont identiques à ceux de cellules non traitées (pas d'augmentation de taille/granulosité, ni apparition de populations d'intensité de fluorescence réduite). L'analyse sur les deux lignées confirme également que le niveau de fluorescence global, et donc le potentiel transmembranaire mitochondrial, sont stables en présence de cuivre ionique. Ces résultats sont également cohérents avec ceux de l'analyse protéomique sur les deux lignées, dans laquelle les ions n'induisent aucune modification significative au niveau des protéines mitochondriales.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats, dont la validité est renforcée par la réponse similaire des deux lignées, confirment les hypothèses générées lors de l'analyse protéomique : les NP de CuO, une fois phagocytées par les macrophages, perturbent le métabolisme mitochondrial, induisant la surproduction de sous-unités des complexes membranaires, et par suite la dérégulation du gradient transmembranaire de protons. Il s'ensuit une diminution du potentiel associé. L'analyse protéomique et les tests ciblés montrent que ces effets sont spécifiques de la forme nanoparticulaire du cuivre. La confirmation de ces observations sur des cellules primaires permettra ici de renforcer l'ensemble de ces données.

1.4.4. Effets du cuivre sur la production de NO

L'analyse protéomique sur la lignée RAW 264.7 a montré que les NP de Cu affectent également une protéine impliquée dans le maintien des propriétés pro-inflammatoires des cellules (adénylhomocystéinase). Ceci suggère une possible perte de la capacité des macrophages à produire certains médiateurs de l'inflammation. Or, celle-ci constitue, comme la phagocytose, une fonction majeure des macrophages, essentielles à leur rôle dans les défenses immunitaires. Afin de confirmer ou non les effets du cuivre sur ces propriétés, nous avons ici réalisé le dosage de l'oxyde nitreux (NO), en présence ou non de cuivre (NP et ions). Ce médiateur chimique, essentiel dans les fonctions pro-inflammatoires des macrophages, est sécrété par les cellules et peut ainsi être dosé de façon simple dans le surnageant de culture par la méthode de Griess, dans laquelle le réactif principal forme avec le NO un complexe détectable à 540 nm.

Deux stratégies peuvent ici être employées pour étudier les effets du cuivre : (1) exposer les cellules au cuivre après les avoir stimulées au lipopolysaccharide bactérien (LPS), afin de voir si la production en cours de NO est bloquée ou réduite par le cuivre ; (2) exposer les cellules au cuivre avant stimulation, afin de voir si les mécanismes permettant aux cellules d'activer la production de NO sont altérés, ou si, au contraire, les cellules sont capables de compenser les effets du cuivre et de produire quand même du NO. C'est cette seconde stratégie que nous avons appliquée ici, afin de confirmer ou non les observations faites en protéomique. De plus, la production de NO par les cellules non stimulées au LPS, traitées ou non aux NP et aux ions a aussi été évaluée, afin d'estimer la part intrinsèque éventuelle de NO liée uniquement à ceux-ci.

Les cellules des deux lignées ont donc été traitées ou non avec les ions et les NP de cuivre, puis stimulées ou non au LPS, en présence d'un excès d'arginine dans tous les cas (substrat des enzymes de synthèse du NO). Le NO produit dans les différentes conditions a ensuite été dosé dans le surnageant de culture avec le réactif de Griess. Les résultats de ces tests sont présentés sur la Figure 58.

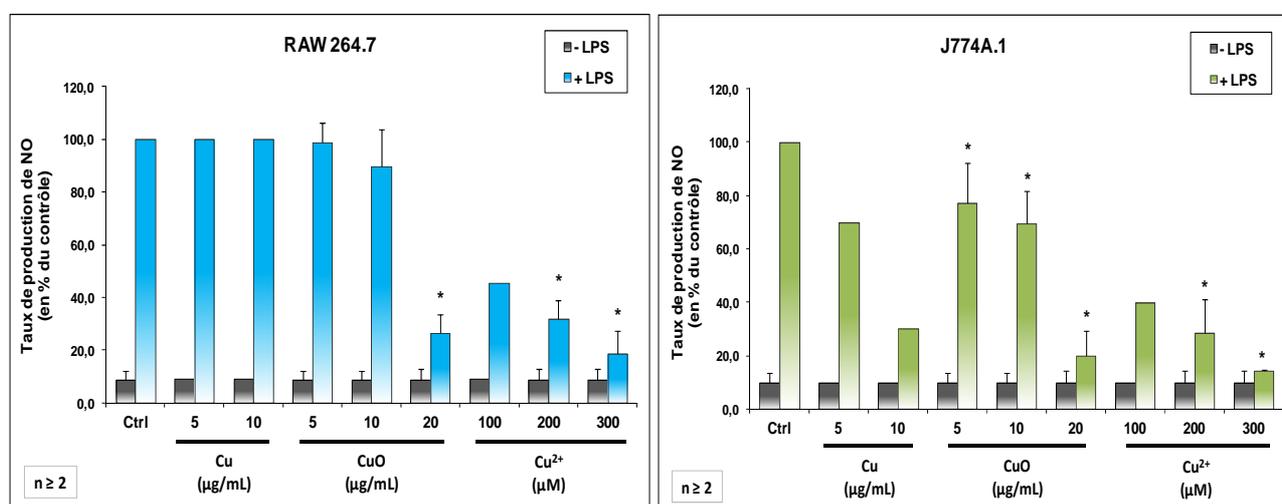


Figure 58 : Effets du cuivre sur la production de NO par les lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées ou non pendant 24h à 37°C aux NP ou aux ions à différentes doses, puis stimulées ou non pendant 24h à 37°C au LPS (1 µg/mL) en présence d'arginine (5 mM). Le NO sécrété dans le milieu de culture a été dosé par incubation du surnageant avec un volume équivalent de réactif de Griess pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe formé a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm, contre une gamme de nitrite de sodium (NaNO₂). Le taux de production de NO dans les différentes conditions est exprimé en pourcentage du contrôle stimulé. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Tout d'abord, pour les deux lignées, on constate qu'aucune production de NO n'est observée en l'absence de stimulation au LPS, que les cellules aient été traitées au cuivre ou non. Cette stimulation artificielle, reproduisant *in vitro* les conditions d'une attaque pathogène, est donc nécessaire pour activer les fonctions inflammatoires des macrophages, et le cuivre seul (NP ou ions) n'active pas non plus la production de NO.

L'exposition des cellules RAW 264.7 aux NP de Cu, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, ne semblent induire de diminution de la production de NO après stimulation au LPS, y compris à la DL20 de 10 µg/mL. En revanche, un effet beaucoup plus fort est observé sur la lignée J774A.1, sur laquelle ce type de NP induit une diminution dose-dépendante de la capacité de production de NO, pouvant atteindre jusqu'à 70% de perte à la DL20 (Figure 58, droite). Une fois encore, ces résultats traduisent la sensibilité accrue de la lignée J774A.1 par rapport à RAW 264.7. Cependant, ceci semble surprenant puisqu'aucun effet moléculaire n'avait été observé lors de l'analyse protéomique sur cette lignée, alors que l'analyse sur RAW 264.7 montrait une modification suggérant des effets sur ce paramètre. On peut ici supposer que l'effet moléculaire observé en protéomique sur RAW 264.7 n'est peut-être pas suffisant pour altérer la production de NO par les cellules, celle-ci étant effectivement plus résistante que J774A.1, et que, dans le cas de cette seconde lignée, l'absence d'effets observés en protéomique pourrait être liée à la non-significativité statistique des modifications responsables de la baisse de production de NO. Néanmoins, il reste difficile de conclure à ce stade quant à l'effet du Cu sur la production de NO.

En outre, les deux lignées montrent une baisse de la production de NO avec les NP de CuO, de manière dose-dépendante, et également plus marquée sur la lignée J774A.1, ce qui serait ici cohérent avec les effets du Cu. Ainsi, sur RAW 264.7, qui s'avère plus résistante, une diminution forte de la capacité de production de NO (de l'ordre de 70%) n'est observée qu'aux doses supérieures à la DL20. En revanche, la diminution de cette capacité sur la lignée J774A.1 est significative dès 5 µg/mL, soit une dose deux fois inférieure à la DL20, dose à laquelle la diminution atteint 30% environ (Figure 58).

Les résultats obtenus avec CuO renforcent ceux obtenus avec Cu, et on peut donc supposer que les NP de cuivre, de manière générale, ont effectivement des effets négatifs sur la production de ce médiateur inflammatoire. Cependant, la réalisation du même dosage sur des cellules primaires s'avère ici nécessaire,

et devrait permettre de conclure de manière définitive sur l'existence ou non de ces effets, les cellules primaires étant généralement plus sensibles que les lignées, et plus proches de la réalité physiologique des macrophages.

Par ailleurs, ce test montre également, pour la première fois, que les ions Cu^{2+} ont des effets sur le paramètre évalué (production de NO), et ce de manière plus intense que les NP. Ceux-ci induisent en effet sur les deux lignées une diminution dose-dépendante de la capacité des macrophages à produire du NO, pouvant atteindre 70% à la DL20 de 200 μM , les NP de CuO n'induisant que 30% de perte de cette fonction à dose équivalente sur la lignée J774A.1 (effet le plus intense des NP) (Figure 58). De tels effets sont inattendus, dans la mesure où l'analyse protéomique et les analyses ciblées précédentes démontrent que les ions n'ont généralement que peu d'effets, ou aucun effet, par rapport aux deux NP.

Afin de tenter d'expliquer ces effets, on peut ici se référer au modèle proposé par Plane *et coll.* (Plane, F., *et al.*, 1997). Celui-ci suggère qu'un excès de Cu^{2+} libre serait à la fois capable d'activer la production de NO par les enzymes de synthèse correspondantes (NOS) et de catalyser la formation d' O_2^- , espèce réagissant elle-même avec le NO pour former du ONOO \cdot . Or, ce dernier réagit à son tour avec la céruloplasmine pour libérer à nouveau du Cu^{2+} . Il s'installerait alors un cycle délétère, au cours duquel le NO produit serait constamment consommé. Dans ce contexte, nos résultats semblent cohérents avec ce modèle. Néanmoins, afin de confirmer ou non ces observations, le même dosage a été réalisé sur des cellules primaires.

1.5. Validation sur des macrophages primaires murins

Les cellules primaires sont largement utilisées en recherche, dans la mesure où elles représentent le plus souvent le modèle le plus proche de la réalité sur le plan physiologique. Cependant, compte tenu des difficultés liées à l'établissement de cultures primaires, et de la faible quantité de matériel biologique qu'il est possible d'obtenir dans ces conditions, le recours à de tels modèles n'est pas envisageable pour tous les types de stratégies expérimentales. En particulier, l'analyse protéomique telle qu'elle a été menée jusqu'ici sur les lignées, peut difficilement être réalisée sur des cultures primaires, puisqu'elle requiert des quantités importantes de cellules. Néanmoins, les cellules primaires peuvent être utilisées pour la réalisation de tests ciblés à plus petite échelle, comme nous avons choisi de le faire dans ces travaux, dans le but de confirmer les données obtenues sur les lignées, et de valider celles de l'analyse protéomique.

Des cultures primaires de macrophages ont été établies à partir de moelle osseuse de tibias et de fémurs de souris C57BL/6. Après dix jours de différenciation et de maturation, les macrophages obtenus sont caractérisés (typage des marqueurs de surface), et peuvent être entretenus et utilisés sur une période de 2 à 3 semaines maximum.

1.5.1. Caractérisation des macrophages primaires

Le typage des macrophages primaires est réalisé par cytométrie en flux, après marquage par des anticorps permettant la détection spécifique de marqueurs de surface caractéristiques des macrophages différenciés, tels que le CD11b et le CD14. La Figure 59 présente un exemple de typage, dans lequel un double marquage a été réalisé : le CD11b a été marqué par un anticorps lié au fluorochrome FITC, et le CD14 à un anticorps lié à la phycoérythrine (PE). Le typage a été réalisé lors de la mise en culture primaire initiale (J-0), puis après dix jours de différenciation en présence de M-CSF (« *macrophage colony stimulating factor* ») contenu dans le surnageant de cultures de cellules L929 ajouté au milieu (J-10). Après 10 jours de différenciation, on constate que 98% environ de la population cellulaire totale est effectivement constituée de macrophages matures possédant les caractères spécifiques de ce type cellulaire.

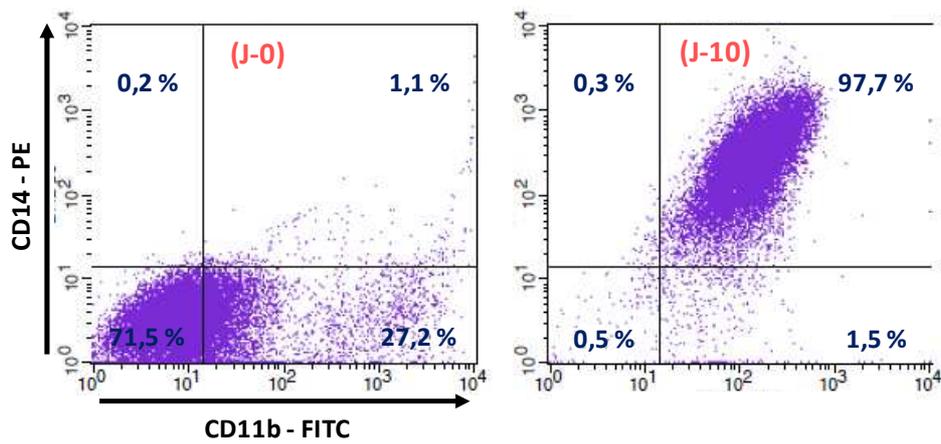


Figure 59 : Typage de macrophages primaires à J-0 et à J-10 par cytométrie en flux. Les cellules ont été doublement marquées anti-CD14-PE/anti-CD11b-FITC, et la fluorescence des deux fluorochromes a été mesurée au FACScalibur selon leurs filtres d'excitation/émission respectifs (PE : 488nm/585nm ; FITC : 488nm/530nm).

1.5.2. Cytotoxicité des NP de Cu et CuO

Afin d'étudier les effets des NP de Cu/CuO et des ions Cu²⁺ sur les macrophages primaires, il était nécessaire, dans un premier temps, d'évaluer leur toxicité sur ces cellules, et de déterminer la DL20 à employer dans les différents tests ciblés à suivre. Pour cela, le taux de mortalité cellulaire en présence des NP et des ions a été estimé par le test d'exclusion de colorant comme précédemment sur les lignées.

Les résultats (Figure 60) montrent que les cellules primaires sont plus sensibles au cuivre que les lignées : la DL20 des deux NP semble se situer vers la dose de 5 µg/mL ici, soit deux fois moins élevée que celle obtenues sur les deux lignées. Ces cellules sont également plus sensibles aux ions Cu²⁺ : la DL20 se situe ici à la dose de 200 µM, qui n'induisait qu'un faible taux de mortalité sur les lignées, bien qu'elle soit équivalente à la quantité de cuivre ionique qui pourrait être libérée par dissolution totale des NP à la dose de 10 µg/mL. Ainsi, sur des cellules primaires, il semble qu'à dose équivalente, les NP et les ions de cuivre aient le même degré de cytotoxicité. Cette sensibilité accrue peut s'expliquer par le fait que les lignées, au fur et à mesure des passages, perdent certains caractères qu'ont encore les cellules primaires. Ceci est d'autant plus vrai que les deux lignées utilisées précédemment sont issues de tumeurs, ce qui implique certaines variations, notamment au niveau génétique, ainsi qu'une résistance généralement accrue.

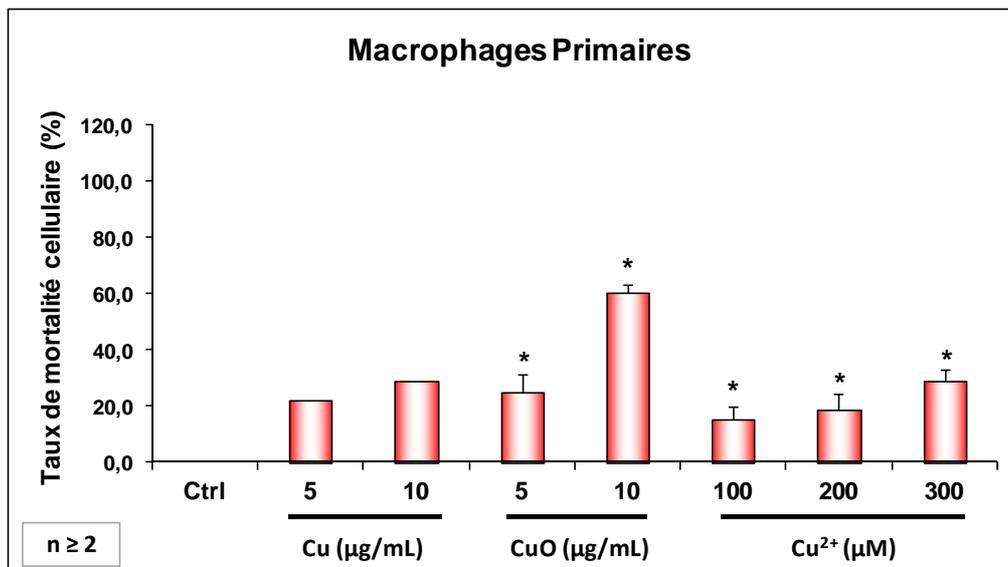


Figure 60 : Cytotoxicité du cuivre (NP et ions) sur les macrophages primaires de souris. Les cellules ont été exposées pendant 24h à différentes doses de Cu, CuO et ions Cu²⁺. Le taux de mortalité a ensuite été déterminé par test d'exclusion au Bleu de Trypan. Significativité statistique : * pour $p \leq 0,05$, selon le test non paramétrique de Mann et Whitney.

1.5.3. Evaluation de la capacité phagocytaire

De même que sur les lignées, la capacité phagocytaire des cellules en présence de cuivre a été analysée par cytométrie en flux. Pour cela, les macrophages primaires ont été exposés aux NP et aux ions, puis mis en présence de billes de 1 µm, dont la fluorescence a ensuite été mesurée. Ces tests ont été réalisés selon les mêmes conditions expérimentales que pour les lignées (avec désorption au D-sorbitol pour limiter le bruit de fond). Les résultats de ces tests sont présentés sur la Figure 61.

Comme pour les lignées RAW 264.7 et J774A.1, on constate tout d'abord que les conditions expérimentales choisies permettent de limiter le bruit de fond (8% d'adsorption dans l'exemple présenté, Figure 61, haut), bien que celui-ci soit légèrement plus élevé que sur les lignées. Ceci pourrait être lié aux fortes capacités d'adhésion des cellules primaires, observées lors de l'entretien des cultures, et qui pourraient favoriser les interactions entre les cellules et les billes pré-incubées dans du sérum. Néanmoins, on peut considérer que cette valeur reste raisonnable, d'autant plus que le taux de phagocytose des cellules non traitées est lui aussi plus élevé (généralement supérieur à 80 %).

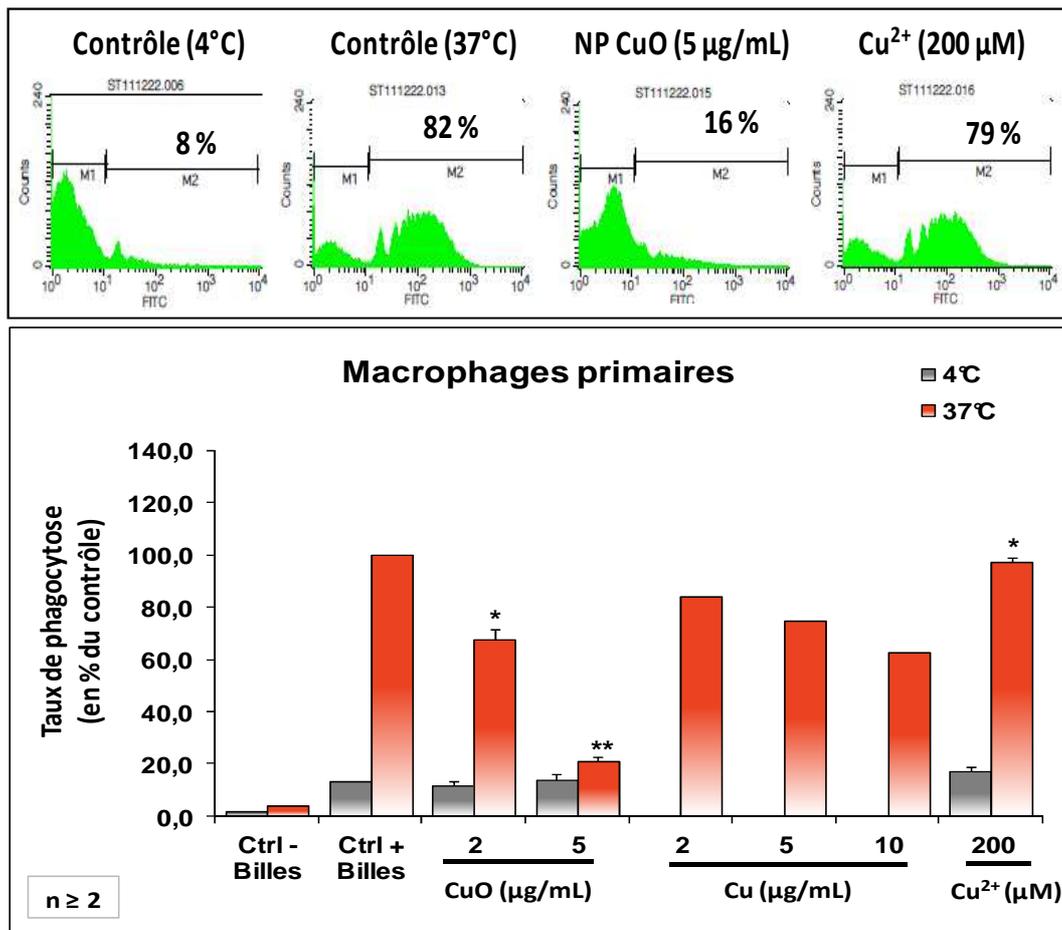


Figure 61 : Effets du cuivre sur la capacité phagocytaire des macrophages primaires. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis mises en présence de billes fluorescentes pendant 2h à 37°C ou à 4°C. La fluorescence des billes internalisées (cellules vivantes uniquement) a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). En haut : Histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. En bas : Taux de phagocytose moyen dans les différentes conditions, exprimé en pourcentage du contrôle à 37°C. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Comme observé sur les lignées, l'exposition des cellules aux deux NP induit une diminution dose-dépendante de la capacité phagocytaire des cellules (Figure 61, bas). En revanche, contrairement aux lignées, l'effet du CuO est ici beaucoup plus marqué : à la DL20 de 5 µg/mL, les cellules perdent jusqu'à 80% de leurs capacités phagocytaires, tandis que le Cu n'induit qu'une perte de 40% de ces capacités à une dose deux fois supérieure à la DL20 (10 µg/mL). Par ailleurs, ces résultats confirment également l'absence d'effets des ions Cu²⁺ sur la phagocytose à la DL20 de 200 µM, dose équivalente à 10 µg/mL de NP.

L'ensemble de ces résultats confirment donc ceux obtenus sur les lignées, et valident ainsi les observations de l'analyse protéomique : on peut désormais conclure que les deux types de NP de cuivre peuvent fortement affecter les éléments du cytosquelette nécessaires à la phagocytose par les macrophages, qui constitue l'une des fonctions majeures de ce type cellulaire, cette altération passant essentiellement par la répression de protéines impliquées dans ces mécanismes d'internalisation, telles que les complexes Arp-2/3, la tropomoduline, ou encore certaines formes de Rho-GDI. A l'inverse, on peut également conclure que les ions cuivre, à dose équivalente, n'affectent pas du tout cette fonction, ce qui traduit ici des effets liés de façon spécifique à la forme nanoparticulaire du cuivre.

1.5.4. Effets du cuivre sur le glutathion

De même que sur les lignées, le niveau de glutathion réduit intracellulaire en présence de cuivre a été analysé par cytométrie en flux. Pour cela, les macrophages primaires ont été exposés aux NP et aux ions, puis marqués au monochlorobimane (MCB). La fluorescence du complexe GSH-MCB a ensuite été mesurée au MoFlo, avec les mêmes filtres que précédemment. Les résultats de ces tests sont présentés sur la Figure 62.

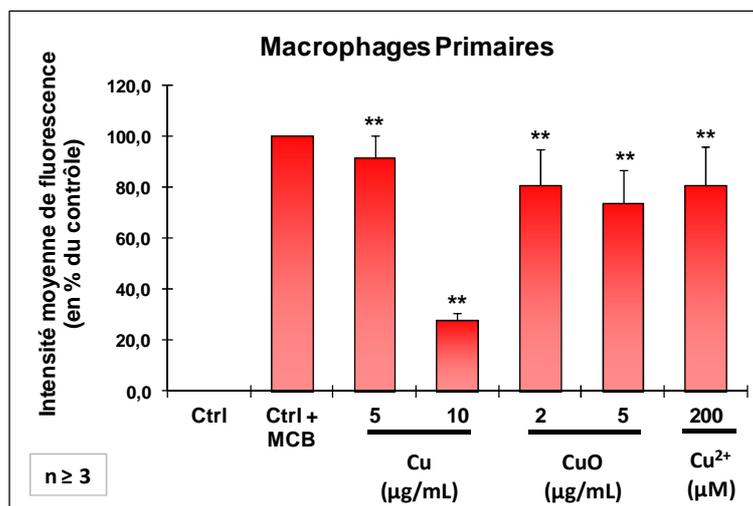


Figure 62 : Effets du cuivre sur le glutathion réduit intracellulaire des macrophages primaires. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis marquées au MCB pendant 5 minutes à 37°C. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au MoFlo (Excitation/Emission : 350/450 nm). L'intensité de fluorescence moyenne dans les différentes conditions est exprimée en pourcentage du contrôle. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : ** $p \leq 0,01$.

Tout d'abord, en conditions normales, on observe comme sur les lignées un pic principal de fluorescence entre 10^2 et 10^3 , correspondant globalement à la quantité totale maximale de GSH dans les cellules (données non montrées).

De même que sur les lignées, l'exposition des cellules aux NP à leur DL20 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induit une diminution du niveau de GSH intracellulaire total, mais de façon moins marquée (perte de l'ordre de 10 à 30%), une diminution forte pouvant néanmoins être observée au-delà de la DL20 (dans le cas du Cu, Figure 62). Cette diminution est également dose-dépendante avec les deux NP (Figure 62), et est aussi associée à l'augmentation des populations contenant des niveaux faibles ou nuls de GSH, et incapables de le régénérer à partir du GSSG (non montré). Les ions Cu^{2+} à la DL20 de 200 μM induisent, quant à eux, une diminution du GSH de l'ordre de 20%, donc du même ordre de grandeur qu'avec les NP, et plus importante que celle observée sur les lignées.

Ici, il semble donc que les cellules primaires soient légèrement plus sensibles aux ions que les lignées, mais moins sensibles aux NP. Néanmoins, les mêmes tendances étant observées entre les deux séries de tests, on peut tout de même considérer que les données sont cohérentes. Ainsi, l'ensemble de ces tests permet ici de conclure que la toxicité du cuivre sous forme de NP induit un état de stress oxydant pour les cellules, au cours duquel il affecterait directement le glutathion (principalement la forme réduite, mais également la forme oxydée, du fait de l'équilibre entre les deux), empêchant la régénération de ce constituant essentiel des défenses anti-oxydantes. Pour lutter contre ce stress, les cellules activeraient plusieurs mécanismes de réponse mettant en jeu différents types de protéines (Prx, HO...), et tenteraient en parallèle de produire des quantités supérieures de glutathion par synthèse *de novo*, nécessitant l'augmentation de la quantité des enzymes de synthèse (GCLM notamment) observée à l'échelle moléculaire au cours de l'analyse protéomique. A l'inverse, les effets des ions sur ce paramètre restent très limités, induisant des effets moléculaires restreints, associés à de faibles variations des niveaux de glutathion intracellulaire. Une fois encore, il s'agit donc ici d'effets spécifiquement liés aux NP de cuivre.

1.5.5. Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

De même que sur les lignées, les variations de potentiel transmembranaire mitochondrial ont été évaluées sur les macrophages primaires en présence de cuivre. Pour cela, les cellules ont été exposées aux NP de CuO et aux ions Cu^{2+} , puis marquées à la rhodamine 123, dont la fluorescence a ensuite été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats de ce test sont présentés sur la Figure 63.

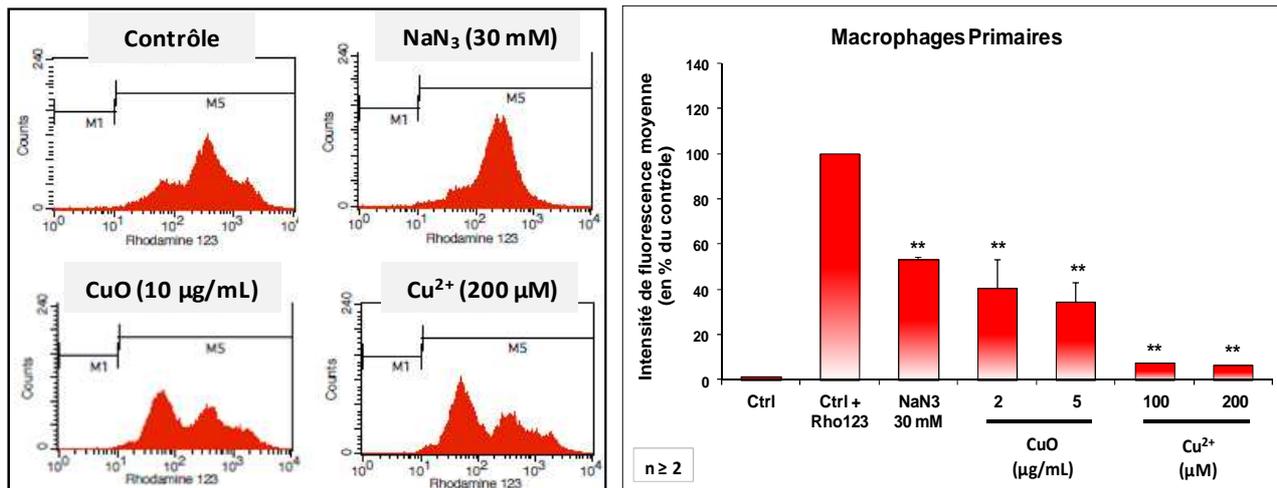


Figure 63 : Effets du cuivre sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des macrophages primaires.

Les cellules ont été traitées pendant 24h au CuO ou aux ions à différentes doses, puis marquées à la rhodamine 123 pendant 30 minutes à 37°C. Un contrôle négatif a aussi été réalisé par traitement à l'azide de sodium (NaN_3) pendant 2h à 37°C, puis marquage à la rhodamine 123. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). A gauche : Histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Intensité moyenne de fluorescence dans les différentes conditions, exprimée en pourcentage du contrôle. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : ** $p \leq 0,01$.

En l'absence de traitement, on constate que la population cellulaire totale est plus hétérogène que dans le cas des lignées (Figure 63, gauche) : plusieurs sous-populations de niveaux de potentiel transmembranaire mitochondrial différents coexistent, ce qui peut s'expliquer par le caractère primaire de ces cellules. En effet, celles-ci sont issues de la différenciation induite de précurseurs de la moelle osseuse. Il se peut donc que toutes les cellules ne soient pas exactement identiques comme c'est le cas pour des lignées cellulaires. Néanmoins, malgré la présence de populations de potentiel inférieur et supérieur, on distingue tout de même un pic principal dont l'intensité moyenne de fluorescence est de l'ordre de 500. Sur ces cellules, le traitement à l'azide de sodium (NaN_3) induit un déplacement des populations d'intensité de fluorescence

élevée vers des valeurs plus faibles (de l'ordre de 200 en moyenne), suggérant une diminution de potentiel transmembranaire mitochondrial, comme c'est le cas sur les lignées, les populations dont le potentiel est déjà faible restant inchangées (Figure 63, gauche). Ce composé est donc capable d'altérer la fonction mitochondriale des cellules primaires de la même façon que sur les lignées. Cependant, contrairement à ce qu'on pourrait attendre, il semble ici que les macrophages primaires soient moins sensibles à ce composé que les lignées, la diminution de potentiel n'atteignant ici que 50% (contre 75% pour les lignées).

Comme dans le cas des lignées, l'exposition des cellules primaires aux NP de CuO induit l'augmentation des populations de faible intensité, mais également la diminution de celles d'intensité plus élevée (Figure 63, gauche). Il en résulte une forte diminution de l'intensité de fluorescence moyenne, et donc du potentiel transmembranaire mitochondrial, de façon dose-dépendante, y compris à des doses inférieures à la DL20 (dès 2 µg/mL, et jusqu'à 70% de diminution à la DL20 de 5 µg/mL) (Figure 63, droite). Les cellules primaires sont donc plus sensibles aux NP que les lignées, comme cela avait déjà été observé auparavant (phagocytose notamment).

Enfin, une différence marquante entre ces cellules et les lignées, est la réponse aux ions : tandis que le Cu²⁺ n'avait pas d'effet sur le potentiel mitochondrial des lignées, il induit ici une très forte diminution de ce potentiel, de façon beaucoup plus intense que les NP, et ce même à des doses inférieures à la DL20 (dès 100 µM) (Figure 63, droite). Les effets observés avec le CuO sur les profils de cytométrie en flux sont également accentués avec les ions. Ceci traduit une fois encore la sensibilité accrue des cellules primaires, et met pour la première fois en évidence des effets des ions.

L'ensemble des résultats obtenus sur les lignées et les macrophages primaires permettent ici de conclure que les NP de cuivre, et en particulier le CuO, affectent directement des protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire membranaire. Celle-ci étant associée à un gradient transmembranaire de protons, il en résulte une diminution du potentiel associé. Ces mécanismes contribuent donc à la forte toxicité du cuivre. Les analyses protéomiques et ciblées sur les lignées suggèrent qu'il s'agit là encore d'effets spécifiques de la forme nanoparticulaire. Néanmoins, des effets potentiels des ions étant également observés sur des

cellules primaires, il reste difficile d'étendre ces conclusions aux effets réels pouvant survenir dans l'organisme.

1.5.6. Effets du cuivre sur la production de NO

Afin de valider les observations faites sur les lignées, les effets du cuivre sur la production de NO par des macrophages primaires ont été analysés. Pour cela, les cellules ont été exposées aux NP ou aux ions, puis stimulées au LPS en présence d'un excès d'arginine. Le NO sécrété dans le milieu de culture a ensuite été dosé par la méthode de Griess selon les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Compte tenu de difficultés liées à la dispersion des NP de Cu au moment de la réalisation de ce test, seuls les effets du CuO et des ions ont pu être évalués ici. La Figure 64 présente les résultats obtenus.

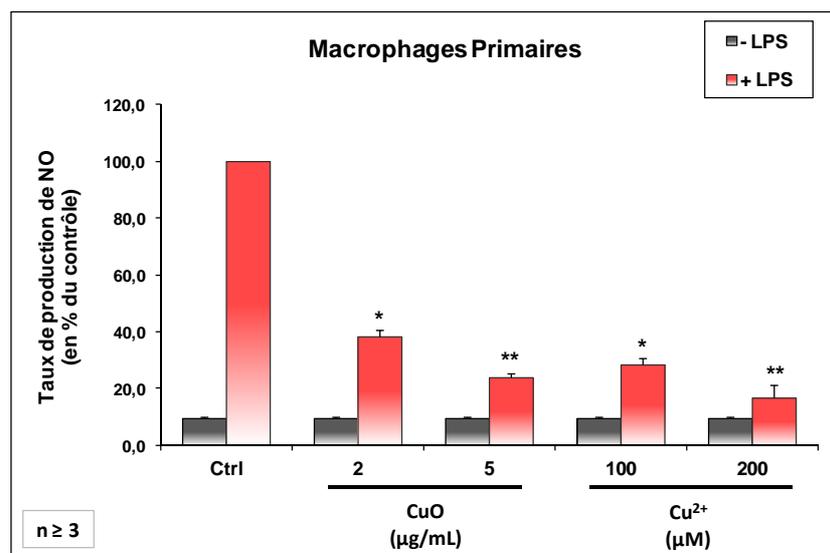


Figure 64 : Effets du cuivre sur la production de NO par les macrophages primaires. Les cellules ont été traitées ou non pendant 24h à 37°C au CuO ou au Cu²⁺ à différentes doses, puis stimulées ou non pendant 24h à 37°C au LPS (1 µg/mL) en présence d'arginine (5 mM). Le NO sécrété dans le milieu de culture a été dosé par incubation du surnageant avec un volume équivalent de réactif de Griess pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe formé a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm, contre une gamme de nitrite de sodium (NaNO₂). Le taux de production de NO dans les différentes conditions est exprimé en pourcentage du contrôle stimulé. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Comme dans le cas des lignées, en l'absence de stimulation au LPS, les cellules ne produisent pas de NO. La stimulation est donc nécessaire pour activer la production de médiateurs inflammatoires par les macrophages primaires.

Par ailleurs, les NP de CuO induisent, comme sur les lignées, une diminution dose-dépendante et significative de la capacité de production du NO, mais ici de manière beaucoup plus intense : une diminution de l'ordre de 60% est déjà observable aux doses inférieures à la DL20 (dès 2 µg/mL), elle-même deux fois inférieure à la DL20 observée sur les lignées, et les effets induits par le CuO aux DL20 relatives sont plus marqués sur les macrophages primaires. Ceci traduit une fois encore la sensibilité accrue de ces cellules. Ainsi, ces résultats confirment les effets observés sur RAW 264.7 et J774A.1, et l'on peut désormais conclure que les macrophages, après exposition aux NP de CuO, perdent leur capacité à produire du NO, même après stimulation par le LPS bactérien. En revanche, il reste difficile de conclure sur les effets des NP de Cu, celui-ci n'ayant pas pu être utilisé dans ces tests.

Concernant les ions Cu^{2+} , on observe également une diminution très marquée de la production de NO, de manière significative et dose-dépendante, comme cela a été observé sur les lignées. Cependant, cette diminution reste ici du même ordre de grandeur (70 à 75 %) pour des quantités équivalentes d'ions et de CuO, dont la DL20 de 5 µg/mL est équivalente à 100 µM de Cu^{2+} , alors que, sur les lignées, les effets des ions étaient plus marqués que ceux des NP. Les effets délétères des ions sur la capacité des macrophages à produire du NO après stimulation sont donc également confirmés par ces tests, et l'ensemble de ces observations semblent cohérentes avec le modèle de Plane *et coll.* suggérant que le Cu^{2+} induit non pas une diminution de la production de NO, mais plutôt une surconsommation du NO produit, conduisant à une diminution globale de la quantité de ce médiateur (Plane, F., *et al.*, 1997).

De façon globale, l'ensemble des données de l'analyse protéomique et de ce dosage ciblé sur les lignées et les macrophages primaires, permet ici de conclure que les NP de cuivre (CuO notamment) pourraient affecter la capacité des macrophages à produire certains médiateurs pro-inflammatoires tels que le NO, en induisant des modifications à l'échelle moléculaire sur certaines protéines impliquées dans l'activation de cette réponse inflammatoire. Les ions, quant à eux, activeraient la synthèse du NO, mais induiraient en

parallèle sa consommation par d'autres réactions chimiques, conduisant *in fine* à la perte de ce médiateur. De plus, compte tenu de la dissolution des NP après internalisation par les cellules, on peut également envisager qu'une partie des effets des NP pourrait également être liée à la fraction ionique issue de cette dissolution. Enfin, le NO étant essentiel dans l'activité défensive des macrophages, on peut donc envisager que le cuivre, qu'il soit sous forme ionique ou nanoparticulaire, par des mécanismes différents, altère cette fonction défensive, mettant en péril la lutte contre d'éventuelles attaques pathogènes.

1.6. Bilan sur le cuivre et l'oxyde de cuivre

Au cours de cette étude, nous avons montré que les NP de cuivre (Cu et CuO), obtenues sous forme de poudre dont la dispersion en solution aqueuse nécessite la présence d'un agent d'enrobage (PVP40), forment des agrégats de l'ordre de 200 à 250 nm, que les macrophages sont capables d'internaliser, et de dissoudre par des voies de dégradation intracellulaire, jusqu'à atteindre des particules de l'ordre de 10 nm. Ces NP présentent alors une toxicité à des doses relativement faibles (10 µg/mL), notamment par rapport à d'autres types de NP métalliques telles que TiO₂ (peu toxiques même à 100 µg/mL).

L'approche protéomique choisie ici a permis d'élucider quelques uns des mécanismes moléculaires expliquant cette toxicité. En particulier, nous avons montré que ce type de NP induit un stress oxydant intense pour les cellules, conduisant à une réduction des niveaux de glutathion intracellulaire nécessaire aux défenses anti-oxydantes. Plusieurs sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire membranaire sont également affectées, induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial qui traduit également un stress intense. En outre, ces NP modifient un nombre important de protéines du cytosquelette impliquées de façon directe dans les mécanismes de phagocytose, induisant ainsi une réduction importante des capacités phagocytaires, fonction essentielle des macrophages. De même, les capacités des cellules à produire du NO, médiateur inflammatoire majeur dans la réponse immunitaire, sont également fortement diminuées par les NP. De plus, les effets observés ici sont spécifiques des deux NP étudiées, dans la mesure où, d'une part, les protéines identifiées ne font pas partie de celles classiquement identifiées en protéomique, et d'autre part, les ions Cu²⁺ correspondants, à l'exception d'une réduction de la production de NO, n'ont que très peu ou pas d'effets du tout à dose équivalente (200 µM).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les stress induits par les NP de Cu et de CuO sont essentiellement liés aux propriétés redox de ce métal. De plus, ces NP altèrent fortement les fonctions principales des macrophages, indispensables à leur rôle dans les défenses immunitaires innées. Ainsi, la problématique d'une exposition chronique à ce type de NP est soulevée de manière légitime, compte tenu d'exemples historiques tels que l'asbestose ou la silicose, associées à une inflammation chronique des macrophages, et pouvant conduire au développement d'autres pathologies telles que des cancers.

2. EFFETS DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC

2.1. Préparation et caractérisation des nanoparticules de ZnO

Pour cette seconde partie des travaux de thèse, deux types de NP de ZnO ont été étudiées : d'une part une dispersion commerciale contenant des NP ZnO en suspension à 50% (p/v) dans une solution aqueuse contenant un agent dispersant de type cationique (3-aminopropyl triéthoxysilane), et qui sera nommée dans la suite de ce travail « ZnO cationique », et d'autre part des NP sous forme de nanopoudre d'environ 50 nm de diamètre moyen. Ainsi, dans le premier cas, la dispersion a uniquement été caractérisée par DLS et microscopie électronique, puis été utilisée comme telle, diluée aux concentrations de travail dans le milieu de culture. Dans le cas de la nanopoudre, il a été nécessaire d'optimiser les conditions de dispersion des NP en suspension, comme dans le cas du cuivre.

2.1.1. Optimisation de la dispersion des NP et caractérisation par DLS

Compte tenu des optimisations déjà réalisées sur les NP de cuivre, et en particulier le CuO, nous avons ici émis l'hypothèse que le comportement du ZnO serait semblable. Des suspensions ont donc été réalisées à concentration élevée (5% (p/v), soit 50 mg/mL). Plusieurs agents stabilisateurs similaires ont été testés afin d'obtenir une dispersion optimale des NP de ZnO commercialisées sous forme de poudre : l'eau seule, les protéines (BSA et gélatine), le dextran et le PVP40. De plus, l'oxyde de cuivre ayant donné de meilleures dispersions lorsque les NP sont soniquées (cup-horn) avant ajout du stabilisateur, nous avons ici supposé qu'il en serait de même pour le ZnO. Les différents agents ont donc été rajoutés après sonication au cup-horn, puis les suspensions finales ont été soniquées pendant 1 heure en bain à ultrasons. De même que pour le cuivre, la dispersion des NP dans les différentes conditions a également été analysée par DLS après dilution à 10 µg/mL de NP, à la fois dans l'eau et dans le milieu de culture avec sérum, puisque ce dernier semble améliorer la distribution de tailles des NP. Enfin, la stabilité des dispersions testées a été évaluée après 24 heures, puis sur une période de plusieurs semaines. Les diamètres mesurés par DLS pour la nanopoudre dispersée en présence des différents agents d'enrobage, ainsi que pour la dispersion commerciale, sont présentés dans le Tableau X.

Comme dans le cas des nanopoudres de cuivre, on constate qu'aucun des différents agents de dispersion ne permet d'obtenir des NP de zinc de diamètre inférieur à 100 nm : les NP forment généralement des agrégats de diamètre minimal de l'ordre de 250 nm. Ce facteur sera donc là encore à prendre en compte lors de l'analyse des résultats de l'étude. On peut également noter que, comme précédemment, la présence de SVF dans le milieu de culture améliore la dispersion, à l'exception des NP sans agent stabilisateur, pour lesquelles on n'observe pas de différence de taille significative entre les mesures faites en eau et en milieu avec sérum. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux de l'étude faite sur le cuivre et avec les données de la littérature.

Suspension / Agent de dispersion		Diamètre en H ₂ O (nm)	Diamètre en DMEM + SVF 1% (nm)	Stabilité après 24h
ZnO cationique 50%		146	217	Aucune agrégation
ZnO poudre 5%	H ₂ O stérile	247	251	Aucune agrégation
	PVP40 1%	252	231	En partie sédimenté
	BSA 1 mg/mL	1815	175	Entièrement sédimenté
	Gélatine 1 mg/mL	419	266	Entièrement sédimenté
	Dextran 2%	310	258	Aucune agrégation

Tableau X : Diamètres maximaux des NP de ZnO mesurés par DLS en eau ou en milieu de culture, en présence de différents agents de dispersion.

Contrairement au cuivre, la littérature montre en particulier que la dispersion des NP de ZnO et les dimensions obtenues dépendent de nombreux paramètres : la forme, le milieu de dispersion, la présence ou non de sérum..., mais également la méthode de mesure employée, voire même éventuellement le fournisseur d'origine (procédés de fabrication différents). On peut ainsi trouver des valeurs très variables : Song *et coll.* ont travaillé avec des NP sphériques de 10-30 nm de diamètre d'après le fournisseur, qui ne montrent pas d'agglomération et conservent un diamètre moyen d'environ 20 nm après mise en suspension dans du milieu de culture complet. En revanche, des NP en forme de bâtonnets de longueurs 30

et 100 nm obtenues auprès d'un fournisseur différent et dispersées dans le même milieu complet, ont tendance à former des agrégats allant jusqu'à 150 et 500 nm de diamètre respectivement (Song, W., *et al.*, 2010). Xia *et coll.* ont synthétisé et étudié des NP de ZnO de 13 nm de diamètre initial, dont la dispersion en H₂O, DMEM avec 10% de SVF ou BEGM sans sérum (milieu de culture de cellules épithéliales bronchiques) induit la formation d'agrégats de 413, 36 et 184 nm respectivement, soulignant ici l'importance du milieu de dispersion choisi et du sérum (Xia, T., *et al.*, 2008). D'autres exemples proposent cependant des dimensions proches de celles obtenues dans ces travaux : des NP de ZnO obtenues sous forme de poudre de 100 nm de diamètre et formant des agglomérats allant jusqu'à 300 nm après dispersion en présence de BSA (Hackenberg, S., *et al.*, 2011), ou encore des NP dispersées en eau et formant des agrégats de 30 à 165 nm selon la méthode de mesure utilisée (Sharma, V., *et al.*, 2011). La taille initiale des NP n'est cependant pas précisée dans cette dernière étude.

Par ailleurs, le Tableau X montre également que, dans le cas du zinc, la sonication en eau semble suffire à obtenir une dispersion satisfaisante, puisque les agents d'enrobage testés ne permettent pas de réduire la taille minimale des agrégats, bien que le PVP40 donne des résultats proches de ceux obtenus en eau seule. Cependant, cette suspension, ainsi que celles contenant les protéines BSA et gélatine, qui induisent une forte agglomération des NP, sédimentent partiellement ou entièrement après 24h, et ne s'avèrent donc pas utilisables pour l'étude. Le dextran, quant à lui, donne des diamètres satisfaisants en milieu avec sérum, mais la pertinence de ce type d'enrobage pouvant être remise en cause, il n'a pas été choisi pour la suite des travaux. Il apparaît donc ici que la simple sonication des NP de ZnO en eau seule soit la meilleure condition de dispersion de ces particules, et également la plus stable dans le temps. De plus, l'absence de stabilisateur permettra d'évaluer les effets réels des NP de zinc en tant que telles.

Concernant la dispersion commerciale (ZnO cationique), la dilution de la suspension initiale en vue des mesures DLS semble induire la formation d'agrégats de l'ordre de 150 nm de diamètre en eau, et 217 nm en milieu avec SVF (Tableau X et Figure 65). Cette augmentation de taille en milieu de culture, malgré la présence de sérum, n'a pas réellement pu être expliquée. Elle pourrait cependant être liée non pas aux particules mais aux agents stabilisateurs introduits dans la suspension par le fournisseur, et à leurs

interactions avec les composants du milieu et/ou du sérum, puisque ce phénomène n'est pas observé dans le cas de nanopoudres de métaux ou oxydes de métaux brutes. Cependant, les dimensions observées pour cette dispersion restent du même ordre de grandeur que celles obtenues pour la nanopoudre dispersée en eau, et sont également stables dans le temps.

Par ailleurs, qu'il s'agisse du ZnO/H₂O ou du ZnO cationique, les histogrammes de dispersion obtenus par DLS montrent également que les deux types de suspensions sont assez homogènes (distributions étroites), bien que dans le cas de la poudre, la dilution en milieu avec sérum induise une légère perte d'homogénéité (Figure 65). Ces histogrammes confirment également les dimensions des NP dans ces suspensions : environ 150 nm en eau et 300 nm en milieu avec SVF pour le ZnO cationique d'une part, et environ 200 à 250 nm pour les NP de ZnO/H₂O en eau et en milieu + SVF.

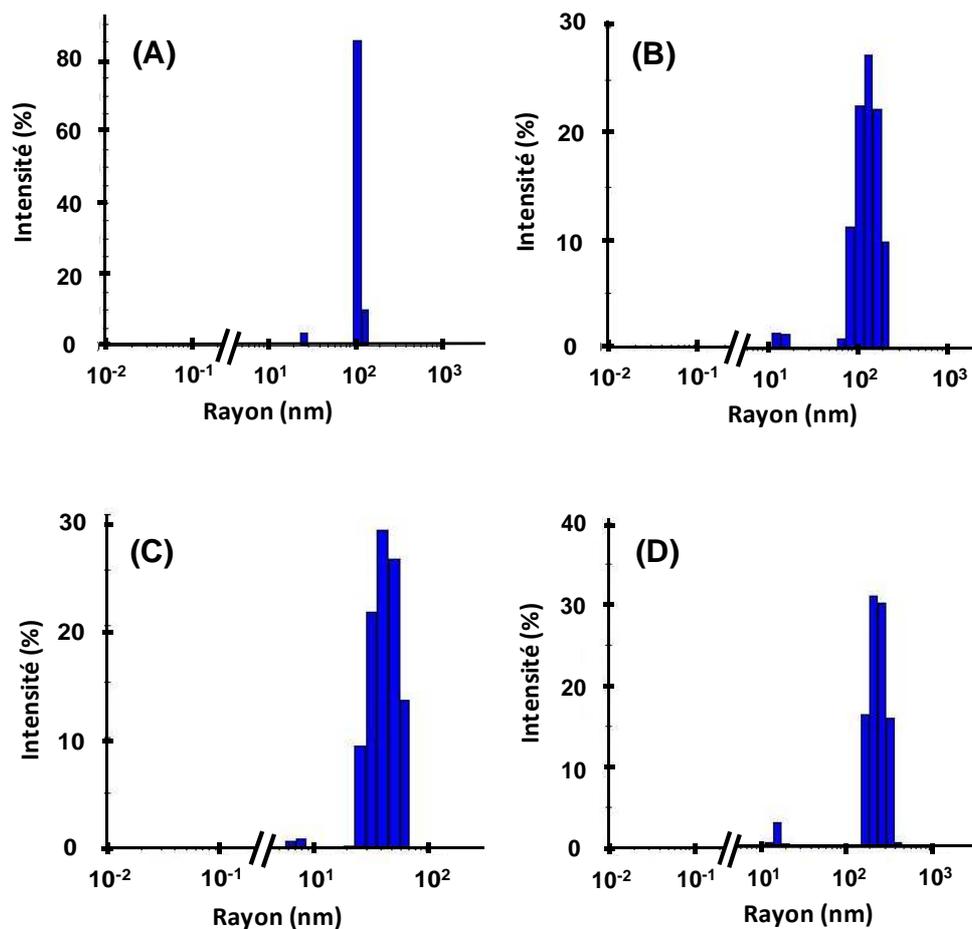


Figure 65 : Histogrammes de dispersion de tailles des NP de ZnO obtenus par DLS. (A) ZnO/H₂O mesuré en eau ; (B) ZnO/H₂O mesuré en DMEM+SVF 1% ; (C) ZnO cationique mesuré en eau ; (D) ZnO cationique mesuré en DMEM+SVF 1%.

Enfin, des mesures régulières par DLS ont été réalisées sur une période de plusieurs semaines, et ont montré que les suspensions ZnO/H₂O sont stables pendant 6 à 7 semaines (résultats non présentés ici). Au-delà de cette période, les particules ont tendance à s'agglomérer. De nouvelles suspensions doivent donc être préparées et caractérisées afin d'assurer la reproductibilité des conditions d'exposition des cellules à des éléments de dimensions toujours nanométriques.

2.1.2. Caractérisation des suspensions de ZnO par microscopie électronique

Afin de compléter les données obtenues par DLS, nous nous sommes intéressés ici à la caractérisation des NP après leur internalisation par les cellules. Celles-ci ont été exposées aux NP ZnO/H₂O et ZnO cationique, puis fixées au glutaraldéhyde et analysées par microscopie électronique à transmission (MET). Les résultats présentés sont ceux obtenus sur la lignée J774A.1.

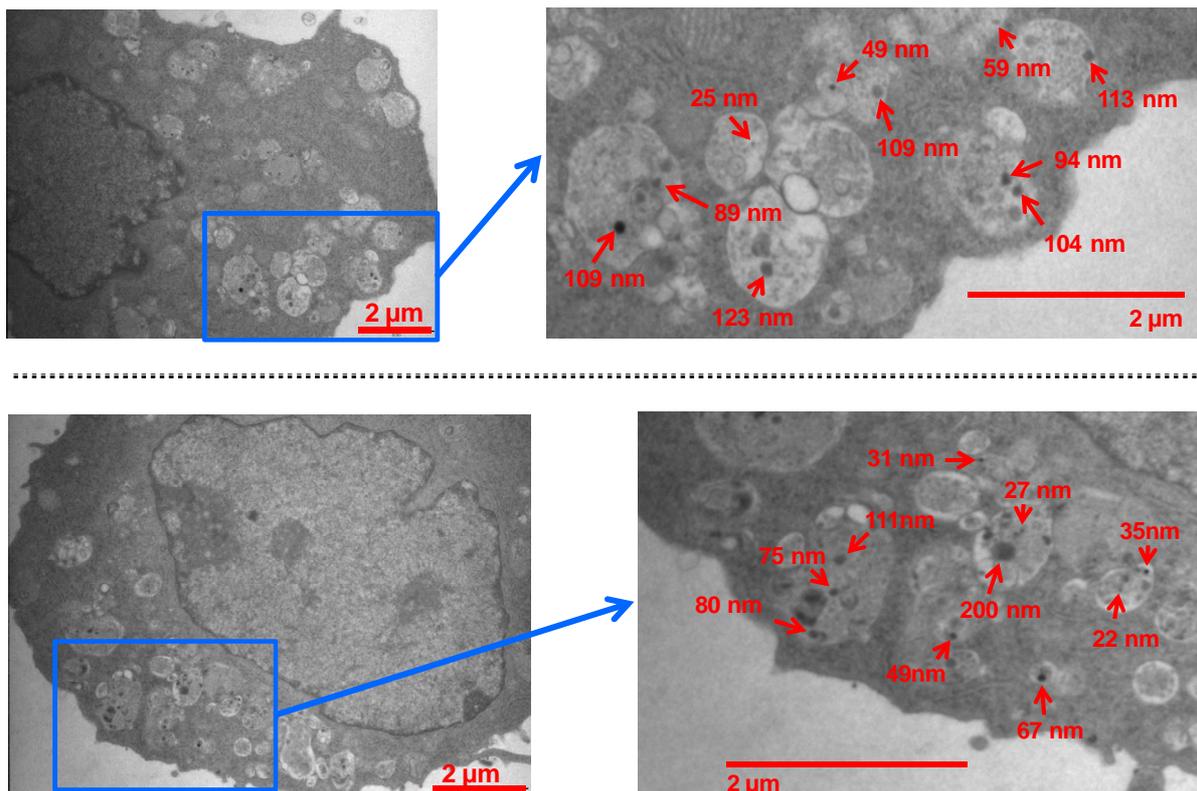


Figure 66 : Caractérisation des NP de ZnO cationique (haut) et ZnO/H₂O (bas) par MET. Les cellules ont été traitées avec 4 µg/mL de ZnO cationique ou 8 µg/mL de ZnO/H₂O, puis fixées, et contre colorées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle avant d'être visualisées par MET. Les micrographies de droite correspondent aux agrandissements des zones encadrées en bleu à gauche. Les flèches indiquent les NP observables dans les vésicules intracellulaires, ainsi que leur taille calculée à partir de la barre d'échelle correspondante.

Comme le montre la Figure 66, les NP internalisées par les cellules sont essentiellement observées dans des vésicules intracellulaires sous forme de granules sphériques de couleur sombre. Les NP de ZnO cationique et de ZnO/H₂O ont des diamètres allant jusqu'à 125 nm et 200 nm environ, respectivement, ce qui est inférieur à leurs dimensions en suspension. On peut également observer des particules de taille beaucoup plus petite (jusqu'à 25 nm environ), en particulier dans les vésicules les plus éloignées de la périphérie cellulaire. On peut supposer ici que la mise en contact des NP avec les cellules a permis la désagrégation d'une partie des NP des suspensions initiales, ou encore qu'une partie des particules (en surface) a pu être dissoute sous forme ionique, soit directement dans le milieu, soit sous l'action des cellules elles-mêmes.

2.1.3. Evaluation du degré de dissolution du ZnO dans les milieux de culture

Compte tenu des observations précédentes, et des résultats obtenus pour les NP de cuivre, la fraction ionique libérée dans le milieu de culture cellulaire à partir des NP de ZnO a aussi été estimée. Les NP ont été introduites pendant 24 heures dans du milieu RPMI contenant 10 % de SVF (conditions de culture et d'exposition des lignées cellulaires utilisées dans ces travaux). Aucune différence significative n'ayant été observée dans le cas du cuivre entre les milieux conditionné et non conditionné, ce dosage n'a ici été réalisé que dans le milieu non conditionné. Après élimination des NP par ultracentrifugation, les ions Zn²⁺ ont été dosés grâce à l'orange de xylénol, un autre indicateur formant des complexes avec certains ions métalliques, en particulier le fer (Fe²⁺ ou Fe³⁺), mais aussi le zinc (Zn²⁺), et permettant ainsi leur détection par colorimétrie (Gay, C., *et al.*, 1999).

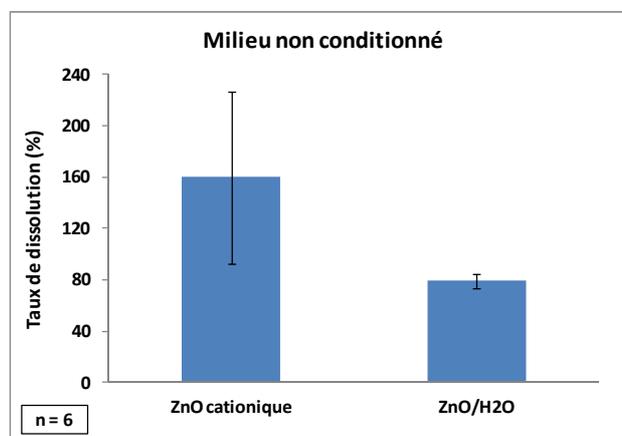


Figure 67 : Dosage de la fraction dissoute sous forme ionique à partir des NP de ZnO dans le milieu de culture cellulaire.

Après 24 heures d'incubation en milieu de culture (RPMI+SVF 10%), on constate que les NP de ZnO/H₂O sont en moyenne dissoutes à 80 % sous forme ionique. Ce taux de dissolution élevé a aussi été observé par d'autres groupes : Hackenberg *et coll.* ont estimé que des NP de ZnO de 100 nm, agrégées jusqu'à 300 nm dans le milieu de culture, libèrent une fraction ionique correspondant à environ 75 à 80 % de la dose initiale en NP, soit deux fois plus que la fraction libérée par des particules de taille micrométrique à dose équivalente, et ont également montré que la dissolution augmente de façon linéaire avec la dose de NP appliquée jusqu'à 50 µg/mL (Hackenberg, S., *et al.*, 2011). De même, Xia *et coll.* observent une dissolution du même ordre de grandeur dans les milieux DMEM et BEGM (Xia, T., *et al.*, 2008). Cette étude met également en évidence le fait que si la concentration en NP de ZnO est supérieure à la limite de dissolution, les cellules sont essentiellement exposées à la forme nanoparticulaire, alors que dans le cas contraire, elles sont essentiellement confrontées à la fraction dissoute. Cet aspect est également abordé par Song *et coll.*, dont l'étude de NP de ZnO montre que le taux de dissolution dans le milieu diminue lorsque la concentration en NP augmente : 30% de dissolution sont observés pour 40 µg/mL de ZnO, et 10% seulement pour 100 µg/mL, suggérant que cette dernière concentration se rapproche de la limite de solubilité du ZnO dans le milieu (Song, W, *et al.*, 2010). Or, dans les travaux présentés ici, nous avons utilisé des concentrations assez faibles (de l'ordre de 8 µg/mL), ce qui pourrait expliquer le fort taux de dissolution observé.

Comme pour le cuivre, la contribution de cette fraction ionique importante pourrait être à prendre en compte lors de l'évaluation des effets toxiques des NP (cf. Synthèse bibliographique, § 3.6, page 85). En effet, la comparaison des effets des NP de ZnO avec ceux d'ions Zn²⁺ sous forme de ZnCl₂ par Song *et coll.* montre que, à concentrations équivalentes, les NP induisent des taux de mortalité cellulaire plus élevés que ceux liés aux ions seuls, suggérant un effet lié à la forme nanoparticulaire et/ou une contribution liée à la fraction ionique issue de la dissolution des NP. A l'inverse, la comparaison entre ZnO et ZnSO₄ par Xia *et coll.* montre que, malgré la dissolution importante des NP aux faibles concentrations, les effets de la fraction ionique restent négligeables, les NP ayant une cytotoxicité beaucoup plus faible que les ions seuls. Les différences observées entre les deux études pourraient en partie s'expliquer par le fait que les NP sont de taille et de forme différentes, de même que les tests de viabilité utilisés.

Par ailleurs, les images précédentes de MET montrent des NP de taille encore importante à l'intérieur des cellules. Ceci suggère que les NP sont internalisées relativement rapidement par les cellules, évitant ainsi leur dissolution importante au contact des constituants du milieu. Cependant, il semble ici intéressant de doser également la fraction dissoute intracellulaire.

Concernant le ZnO cationique, les résultats obtenus n'ont pas permis de statuer sur la dissolution des NP. Les taux observés et les écarts-types très élevés pourraient dans ce cas s'expliquer par la présence des agents de dispersion cationiques introduits par le fournisseur, que l'on suppose être à l'origine d'interférences avec le dosage. Aucune information complémentaire ne pouvant être obtenue auprès du fournisseur à ce sujet, les informations sur la dissolution de ce type de NP restent inaccessibles.

2.2. Evaluation de la cytotoxicité sur les lignées RAW264.7 et J774A.1

La cytotoxicité des NP de ZnO cationique et ZnO/H₂O, ainsi que celle des ions Zn²⁺, a été évaluée sur les deux lignées de macrophages, après exposition des cellules à différentes concentrations de NP ou d'une solution d'acétate de zinc ((CH₃CO₂)₂Zn). Les résultats des tests de viabilité cellulaire après 24 heures sont présentés sur la Figure 68.

Ces tests ont permis de déterminer pour les deux lignées la DL20 à employer pour la suite de l'étude. Celle-ci s'élève à 4 µg/mL dans le cas du ZnO cationique, et 8 µg/mL dans le cas du ZnO/H₂O, et on ne note aucune différence de réponse significative entre les deux lignées (Figure 68). Comme dans le cas des NP de Cu et CuO, rappelons que ces doses sont relativement faibles par rapport à celles employées pour d'autres oxydes métalliques, telles que TiO₂ (Osman, I.F., *et al.*, 2010 ; Kim, I-S., *et al.*, 2010). Au-delà, le taux de mortalité cellulaire augmente très fortement, en particulier avec la forme cationique, atteignant presque 100 % à 10 µg/mL sur les deux lignées, alors qu'une dose équivalente de la forme nanopoudre induit 35 à 50 % de mortalité. On peut supposer ici que cette différence de réponse vis-à-vis des deux types NP pourrait provenir de l'enrobage cationique, qui pourrait présenter une toxicité en soi ou exacerber celle des NP. En effet, ce type de modification peut induire des changements dans la charge globale de surface des NP. Or, l'augmentation des charges positives peut favoriser non seulement les interactions entre les NP et

les constituants biologiques, pouvant ainsi altérer ces derniers, mais aussi l'internalisation des NP par les cellules, ou encore la dissolution des NP sous forme d'ions pouvant à leur tour pénétrer dans les cellules et avoir une toxicité qui leur est propre (Chang, Y.N., *et al.*, 2012).

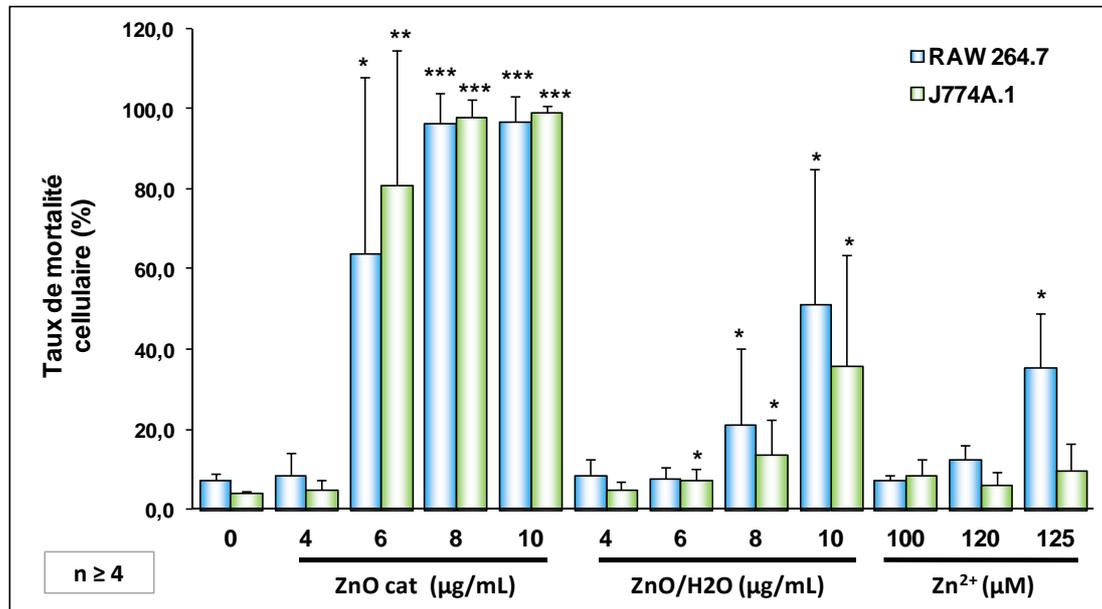


Figure 68 : Taux de mortalité cellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1 en présence de NP et d'ions zinc. Les cellules ont été exposées pendant 24h à différentes doses de ZnO cationique, ZnO/H₂O et ions Zn²⁺. Le taux de mortalité a ensuite été déterminé par test d'exclusion au Bleu de Trypan. Significativité statistique : * pour $p \leq 0,05$, ** pour $p \leq 0,01$ et *** pour $p \leq 0,001$ selon le test non paramétrique de Mann et Whitney.

Par ailleurs, la valeur de DL20 retenue pour le ZnO/H₂O semble cohérente avec la majorité de celles trouvées dans la littérature. En effet, Song *et coll.* obtiennent une DL20 de l'ordre de 10 µg/mL sur des macrophages péritonéaux Ana-1 exposés pendant 24h à différentes concentrations de NP, et ce quelle que soit leur taille (entre 10 et 100 nm) (Song, W., *et al.*, 2010). Hackenberg *et coll.* observent également 15 % environ de mortalité sur des cellules de la muqueuse nasale humaine exposées à 10 µg/mL de ZnO pendant 24h, dose au-delà de laquelle la mortalité cellulaire augmente brutalement (Hackenberg, S., *et al.*, 2011). De même, les études de Roy *et coll.* sur des macrophages murins, et de Yin *et coll.* sur une lignée lymphoblastoïde, suggèrent que la DL20 à 24h des NP de ZnO testées se situe entre 1 et 10 µg/mL ou entre 2 et 10 µg/mL respectivement (Roy, R., *et al.*, 2011 ; Yin, H., *et al.*, 2010). L'ensemble de ces travaux confirme que la DL20 pour des NP de ZnO se situe aux alentours de 10 µg/mL, voire y est légèrement

inférieure. Cependant, d'autres études montrent une cytotoxicité supérieure ou inférieure : Palomäki *et coll.* obtiennent 30 % de mortalité sur des RAW 264.7 traitées pendant 24h avec 3 µg/mL de ZnO, tandis que Heng *et coll.* n'observent pas d'effet significatif pour des concentrations en ZnO inférieures à 25 µg/mL (Palomäki, J., *et al.*, 2010 ; Heng, B.C., *et al.*, 2011). Dans le premier cas, la différence de toxicité observée par rapport à notre étude pourrait être liée à la nature des NP utilisées, et en particulier à leur taille très inférieure (20 nm), seule différence notable entre les deux conditions d'exposition des cellules. Dans la seconde étude, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire (cellules BEAS-2B) pourrait expliquer les différences de réponses aux NP.

Concernant les ions Zn^{2+} , la lignée RAW 264.7 s'avère plus sensible que la lignée J774A.1. Comme évoqué précédemment, ceci peut s'expliquer en partie par les différences morphologiques existant entre les cellules. Ainsi, afin de conserver des conditions d'exposition équivalentes pour les deux lignées, la DL20 choisie pour la suite de l'étude correspondra à celle observée sur RAW 264.7, soit 120 µM de Zn^{2+} . Or, cette concentration correspond à une quantité totale de zinc de 7,8 µg/mL. Les DL20 d'ions et de NP sont donc du même ordre de grandeur, ce qui suggère ici une toxicité équivalente. Kao *et coll.* ont observé les mêmes phénomènes sur des cellules issues de carcinome pulmonaire humain H1355 exposées pendant 24h à des doses équivalentes de NP ou d'ions (Kao, Y.Y., *et al.*, 2012). Des observations similaires ont aussi été faites par Heng *et coll.* : lorsque les doses appliquées sont inférieures à 200 µM de zinc total, la mortalité de cellules BEAS-2B induite après 24h par les NP est identique ou proche de celle obtenue avec les ions à concentration équivalente. En revanche, au-delà de cette dose, les ions s'avèrent plus toxiques (Heng, B.C., *et al.*, 2011). Néanmoins, d'autres études, telles que celle de Xia *et coll.* sur le même modèle cellulaire ainsi que sur des macrophages RAW 264.7, mettent en évidence une toxicité plus importante avec les ions qu'avec les NP, y compris aux faibles doses de zinc (Xia, T., *et al.*, 2008). Cependant, les deux modèles cellulaires ont ici été exposés pendant 6h au lieu de 24h. Il est donc possible que cette durée d'exposition ne soit pas suffisante pour visualiser les effets cytotoxiques des NP, puisque ceux-ci nécessitent potentiellement l'internalisation préalable par les cellules, tandis que les ions peuvent diffuser à travers les membranes cellulaires, et agir ainsi beaucoup plus rapidement. Il serait donc intéressant ici de connaître les résultats de tests équivalents réalisés après 24h.

Compte tenu de nos résultats, et des données de la littérature, on peut cependant conclure ici que, contrairement aux NP de cuivre, la forme nanoparticulaire du ZnO (nanopoudre uniquement) ne présente pas une toxicité significativement supérieure à celle de la forme ionique du zinc. On peut donc s'attendre ici à observer des effets similaires entre ZnO/H₂O et Zn²⁺ au cours de l'analyse protéomique et des tests ciblés fonctionnels. En revanche, on peut également supposer que les effets de la dispersion ZnO cationique seront différents, soit par la quantité de modifications observées, soit par la nature des protéines et des procédés cellulaires affectés.

2.3. Analyse protéomique sur la lignée RAW 264.7

L'analyse protéomique des effets des NP de cuivre a montré que la réponse des deux lignées de macrophages était globalement similaire, les processus et compartiments cellulaires affectés étant sensiblement les mêmes à quelques différences près (quelques protéines spécifiques de l'une ou l'autre des deux lignées). C'est pourquoi, compte tenu du temps disponible, nous avons choisi d'étudier les effets des NP de ZnO et des ions Zn^{2+} uniquement sur le protéome de la lignée RAW 264.7. Comme dans le cas du cuivre, les hypothèses générées par cette analyse ont ensuite été approfondies et validées par des tests ciblés et fonctionnels complémentaires permettant de mieux élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité de l'oxyde de zinc et des ions zinc.

Pour cela, les cellules ont été exposées comme précédemment pendant 24 heures aux NP ou aux ions aux DL20 correspondantes (ZnO cationique à 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ZnO/H₂O à 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Zn^{2+} à 120 μM), puis les protéines totales ont été analysées par électrophorèse 2D. L'expérience complète a été renouvelée 4 fois sur des cultures indépendantes. L'analyse d'images, la détection et la quantification des spots ont été faites à l'aide du logiciel Delta2D. Les spots montrant des variations statistiquement significatives par rapport aux conditions contrôles (mêmes critères de sélection que pour le cuivre), ont été analysés par nanoLC-MS/MS afin d'identifier les protéines correspondantes contre la banque de données UniprotKb/SwissProt. La Figure 69 présente les gels types obtenus au cours de cette analyse pour les différentes conditions, et dont une zone a également été agrandie pour améliorer la visibilité et est présentée sur la Figure 70. Les résultats de l'identification par spectrométrie de masse sont détaillés dans le Tableau XI.

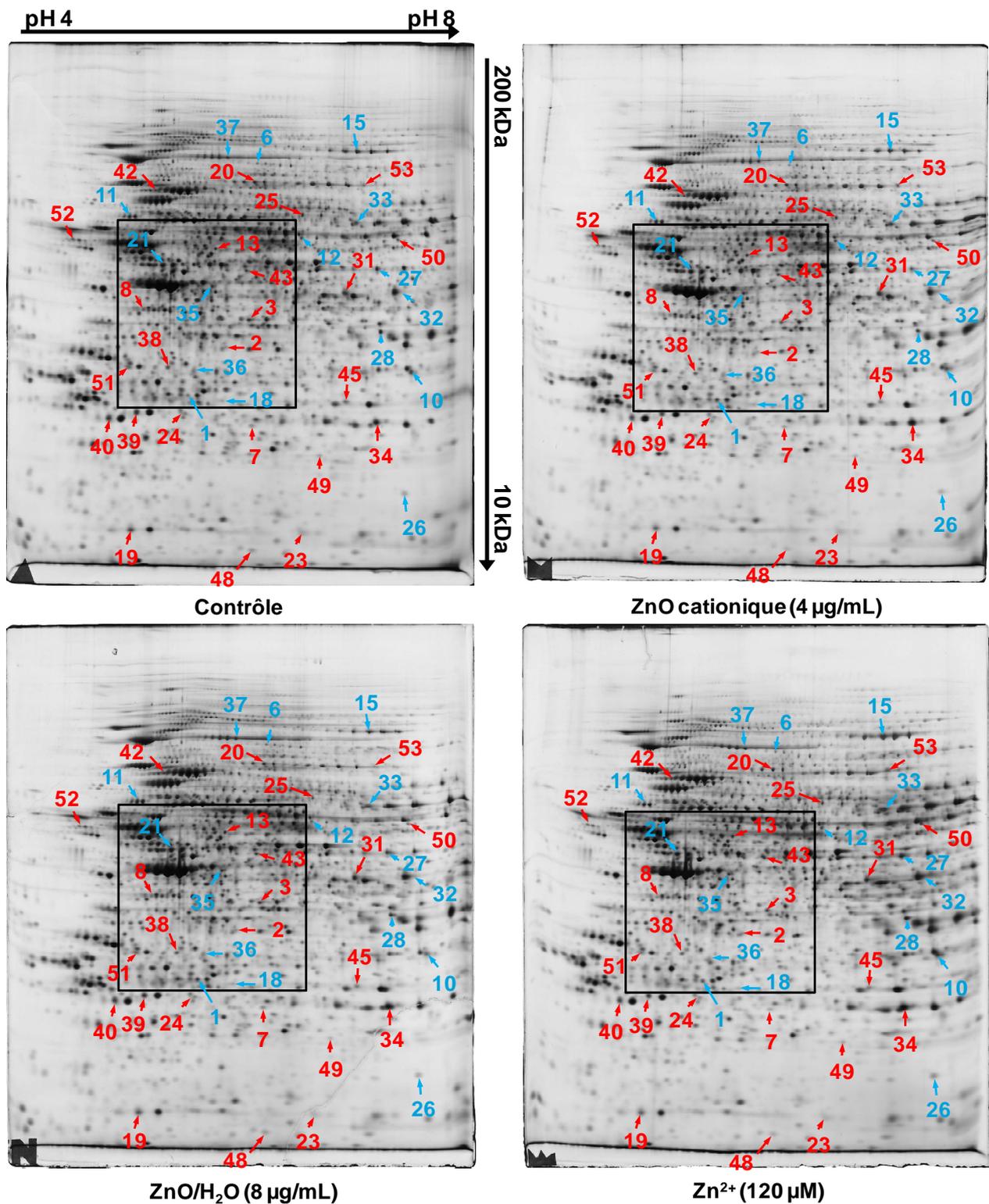


Figure 69 : Gels 2D obtenus pour la lignée RAW 264.7 traitée au zinc. Les cellules ont été exposées aux NP et aux ions, puis 150 µg de protéines totales ont été analysées par électrophorèse 2D : IEF sur gradient linéaire de pH 4-8 ; 2^{ème} dimension (SDS-PAGE) de 10 à 200 kDa ; coloration au nitrate d'argent rapide. L'analyse quantitative des spots a été faite à l'aide du logiciel Delta2D. Flèches rouges : protéines réprimées dans au moins une condition ; flèches bleues : protéines induites dans au moins une condition. Les numéros correspondent à ceux du tableau d'identification (Tableau XI). La zone centrale des gels a été agrandie pour des raisons de clarté (voir Figure 70).

N°	Nom de la protéine (anglais)	Numéro d'accèsion UniProtKb	Poids moléculaire (Da)	Nombre de peptides uniques	ZnO /contrôle		ZnO/H ₂ O /contrôle		Zn ²⁺ /contrôle	
					ratio	p-value	ratio	p-value	ratio	p-value

Réponse au stress oxydant

1	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	O09172	30 535,2	5	1,631	0,07	1,644	0,02	1,837	0,03
2	Heme oxygenase 2	O70252	35 739,4	2	0,979	0,77	0,492	0,02	1,055	0,83
3	Neutrophil cytosol factor 4	P97369	38 709,0	7	0,991	0,95	1,061	0,72	0,530	0,03

Mitochondrie

4	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P47738	56 652,7	3	0,825	0,07	0,678	0,01	0,879	0,38
5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (forme modifiée)	P06576	56 560,6	4	0,472	0,06	0,478	0,05	0,355	0,02
6	Mitochondrial inner membrane protein (forme modifiée)	Q8CAQ8	83 901,1	3	1,100	0,45	1,645	0,01	1,544	0,05

Signalisation cellulaire

7	Growth factor receptor-bound protein 2	Q60631	26 383,0	5	0,806	0,02	0,985	0,90	0,803	0,19
8	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P08752	40 452,0	5	0,878	0,19	0,848	0,12	0,712	0,02
9	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	P62880	37 331,8	4	0,886	0,34	0,892	0,13	0,638	0,02
10	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P68040	35 077,0	12	1,719	0,03	1,674	0,08	1,540	0,08
11	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoforme (forme modifiée)	Q76MZ3	65 291,6	2	1,087	0,52	1,246	0,03	1,177	0,15

Synthèse et repliement protéique

12	Aspartate--tRNA ligase cytoplasmic	Q922B2	57 147,7	6	1,624	0,01	1,391	0,11	1,549	0,05
13	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	Q8VDW0	49 067,3	8	1,259	0,25	0,976	0,88	0,575	0,05
14	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	O54734	49 029,3	6	1,391	0,03	1,271	0,03	1,427	0,23
15	Elongation factor 2 (forme modifiée)	P58252	95 316,0	18	0,837	0,09	0,861	0,27	1,869	0,00
16	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P57759	28 824,9	6	1,003	0,97	1,008	0,92	0,808	0,04
17	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	Q9Z1D1	34 460,7	2	1,085	0,35	0,947	0,62	0,399	0,02
18	Eukaryotic translation initiation factor 4E	P63073	25 053,6	2	1,408	0,09	1,342	0,04	1,007	0,95
19	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (forme modifiée)	P63242	16 832,7	5	0,860	0,23	0,797	0,04	0,827	0,12
20	Glycine--tRNA ligase (forme modifiée)	Q9CZD3	81 879,1	2	1,010	0,94	1,185	0,20	0,618	0,04
21	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (forme modifiée)	Q9Z2X1	45 730,0	9	1,112	0,28	1,242	0,02	1,265	0,02
22	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	Q9CQT1	39 410,6	5	1,097	0,30	0,823	0,22	0,462	0,01
23	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (forme modifiée)	P17742	17 971,8	4	0,780	0,37	0,448	0,03	0,653	0,19
24	Sepiapterin reductase	Q64105	27 883,8	3	0,920	0,27	0,814	0,04	0,661	0,01
25	T-complex protein 1 subunit gamma (forme modifiée)	P80318	60 587,2	6	1,022	0,84	0,998	1,00	0,618	0,02
26	Transcription factor BTF3	Q64152	22 168,3	4	1,442	0,26	1,336	0,21	1,568	0,05

Métabolisme central										
27	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Q9DCD0	53 248,8	8	1,135	0,47	1,258	0,08	1,305	0,04
28	Aldose reductase	P45376	35 732,7	7	1,054	0,57	1,206	0,01	1,306	0,09
29	Alpha-enolase (forme modifiée)	P17182	47 141,7	24	1,233	0,01	1,323	0,04	1,201	0,01
30	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (forme modifiée)	P14152	36 512,1	3	0,922	0,32	0,820	0,01	0,702	0,10
31	Phosphoglycerate kinase 1 (forme modifiée)	P09411	44 563,2	10	1,113	0,17	1,153	0,24	0,791	0,04
32	Phosphoglycerate kinase 1 (forme modifiée)	P09411	44 538,2	4	1,373	0,03	1,456	0,21	1,492	0,06
33	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (forme modifiée)	P52480	57 845,6	9	1,466	0,00	1,458	0,18	0,857	0,54
34	Triosephosphate isomerase (forme modifiée)	P17751	32 191,3	12	0,832	0,05	1,096	0,40	1,124	0,50

Cytosquelette, trafic intracellulaire, et macropinocytose										
35	Actin, cytoplasmic 1 (forme modifiée)	P60710	41 796,6	6	1,289	0,24	1,270	0,03	1,167	0,39
36	F-actin-capping protein subunit beta	Q5XI32	33 742,2	8	1,427	0,02	1,298	0,33	0,794	0,74
37	Gelsolin	P13020	85 941,9	6	1,724	0,25	2,307	0,04	1,699	0,22
38	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q61166	30 016,7	7	0,969	0,73	0,872	0,14	0,809	0,03
39	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (forme modifiée)	Q99PT1	23 408,0	4	0,950	0,36	0,927	0,29	0,866	0,01
40	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (forme modifiée)	Q61599	22 851,5	5	0,878	0,09	0,752	0,04	0,769	0,01
41	Alpha-soluble NSF attachment protein	Q9DB05	33 225,8	4	1,017	0,93	1,060	0,34	0,711	0,03
42	Sorting nexin-2 (forme modifiée)	Q9CWX8	58 472,3	11	0,861	0,00	1,050	0,63	0,839	0,02

Dégradation protéique										
43	26S protease regulatory subunit 7	P46471	48 635,6	3	0,761	0,13	0,762	0,11	0,518	0,02
44	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9WVJ2	42 810,0	4	0,894	0,34	1,010	0,91	0,726	0,01
45	Calcyclin-binding protein	Q9CXW3	26 510,7	7	1,111	0,67	1,072	0,22	0,892	0,05
46	Proteasome activator complex subunit 2	P97372	27 058,1	6	0,943	0,33	0,982	0,85	0,832	0,01
47	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	Q9WUP7	37 617,3	8	0,972	0,73	0,906	0,08	0,495	0,02
48	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	P61089	17 138,6	3	0,734	0,19	0,600	0,03	0,741	0,01

Divers										
49	Adenine phosphoribosyltransferase	P47957	19 725,0	2	0,974	0,84	0,662	0,05	0,913	0,42
50	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P24547	55 816,5	3	0,676	0,01	0,784	0,03	0,752	0,18
51	EF-hand domain-containing protein D2	Q4FZY0	26 760,2	6	0,904	0,32	0,882	0,26	0,716	0,04
52	Lymphocyte-specific protein 1	P19973	36 713,7	5	0,815	0,09	0,824	0,05	0,755	0,03
53	ATP-dependent RNA helicase DDX3X (forme modifiée)	Q62167	73 103,7	5	0,658	0,04	1,106	0,52	1,340	0,20

Tableau XI : Identification des protéines de la lignée RAW 264.7 affectées par les NP ou les ions zinc. Les numéros des spots renvoient à ceux indiqués sur les figures Figure 69 et Figure 70.

i. Analyse globale des résultats

Sur le plan quantitatif, l'analyse par Delta2D a conduit ici à la détection d'environ 2200 spots, parmi lesquels 53 variations significatives ont été identifiées, soit environ 2,5% du protéome observable sur les gels types. Comme expliqué dans le cas du cuivre, cette proportion relativement faible renforce la fiabilité des résultats et suggère que les effets observés sont bien ceux liés aux NP ou aux ions, et pas uniquement aux processus de mort cellulaire. Ceci renforce également le choix de travailler à la DL20 pour conduire l'analyse protéomique, puisqu'elle est suffisante pour permettre de visualiser des effets significatifs, sans pour autant induire une mortalité trop élevée. Par ailleurs, un tiers environ des modifications observées correspondent ici à des protéines dont l'expression est induite par le traitement aux NP et/ou aux ions, suggérant l'activation de certaines voies métaboliques en réponse aux stress générés. En outre, on constate également qu'un tiers de l'ensemble des modifications concernent des formes modifiées de protéines dont la/les formes majoritaires restent inchangées. Ceci suggère des effets relativement modérés des variations correspondantes.

Sur le plan qualitatif, plusieurs grandes voies métaboliques et compartiments cellulaires ont été mis en évidence par cette analyse : le métabolisme central, la signalisation cellulaire, et la synthèse et le repliement des protéines, correspondant le plus souvent à une réponse générale des cellules au stress, mais aussi la réponse au stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, le cytosquelette et le transport intracellulaire, ou encore la dégradation protéique, plus spécifiques de la réponse des macrophages à des NP ou des ions métalliques (Tableau XI).

La comparaison globale des effets des ions et des NP à ce stade montre que, dans le cas du zinc, les ions ont des effets considérables : 19 formes protéiques ne sont affectées que par le traitement aux ions Zn^{2+} (répressions essentiellement, une seule induction), et 18 sont affectées en commun avec les NP, soit environ les deux tiers des modifications totales observées. Ces protéines sont surtout impliquées dans la synthèse, le repliement et la dégradation protéique, et dans une moindre mesure dans le métabolisme central, le cytosquelette et la signalisation cellulaire (Tableau XI). Ceci peut s'expliquer par les fonctions étendues du zinc dans l'organisme. En effet, cet élément essentiel intervient souvent en tant qu'ion

constitutif (protéines à doigts de zinc) ou de cofacteur pour de nombreuses protéines structurales ou enzymatiques (Prasad, A.S., 2008). Il n'est donc pas surprenant que les ions zinc aient ici des effets très étendus. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que les NP de ZnO n'ont pas forcément une toxicité supérieure à celle des ions à dose équivalente, puisqu'elles n'induisent pas plus de modifications en quantité absolue. Cependant, seule l'analyse en détail des protéines affectées par l'un ou l'autre des traitements permettra de conclure sur ce point, les protéines concernées pouvant être différentes.

Parmi les 16 autres formes protéiques identifiées, seules 4 sont affectées de façon commune par les deux NP : une aldéhyde déshydrogénase mitochondriale (ALDH), protéine impliquée dans le métabolisme des alcools (réprimée, ratio jusqu'à 0,678 avec ZnO/H₂O, $p = 0,01$), une glycosyltransférase (DDOST 48kDa) ainsi qu'un facteur d'initiation de la traduction (eIF-4E), impliqués dans la biosynthèse protéique (induits, ratio jusqu'à 1,391 avec ZnO cationique, $p = 0,03$, et jusqu'à 1,408 avec ZnO cationique, $p = 0,04$ avec ZnO/H₂O, respectivement), et une inosine-5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH-2), impliquée dans le métabolisme des purines (réprimée, ratio jusqu'à 0,676 avec ZnO cationique, $p = 0,01$). Ce dernier résultat suggère également des effets toxiques des NP de ZnO au niveau de la synthèse des acides nucléiques. Les autres protéines affectées, qui concernent essentiellement les processus de réponse générale au stress, mais aussi le stress oxydant et le cytosquelette, sont réparties de manière équivalente entre les deux NP (5 protéines modifiées uniquement par ZnO cationique, et 7 par ZnO/H₂O), ce qui suggère une toxicité équivalente des deux types de particules aux DL20 respectives.

Ces données sont globalement en accord avec celles des tests de viabilité présentés auparavant : lorsque les cellules sont exposées à des doses induisant le même degré de mortalité (DL20), les réponses observées entre ions et NP d'une part, et entre ZnO cationique et ZnO/H₂O d'autre part, sont de même ampleur, bien que la nature et les fonctions des protéines touchées puissent être différentes. Les réponses des cellules vis-à-vis du zinc ionique et nanoparticulaire seront donc présentées successivement en fonction des grandes voies métaboliques affectées.

ii. Analyse de la réponse générale au stress

La réponse générale des cellules aux stress se caractérise le plus souvent par des modifications de certaines protéines impliquées dans le métabolisme central, la biosynthèse et le repliement protéique, la signalisation cellulaire, ainsi que le cytosquelette, processus que nous avons aussi mis en évidence dans cette analyse. La comparaison des protéines identifiées ici avec celles de la liste de protéines classiquement identifiées, ou « déjà vu en protéomique », fait apparaître quelques protéines communes : l' α -énolase (ENO-1), la triosephosphate isomérase (TPI-1), la pyruvate kinase (PKM), la phosphoglycérate kinase 1 (PGK-1) et la malate déshydrogénase (MDH-1) (métabolisme central), mais aussi des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction (eIF-5A-1 et EF-2) et la peptidyl-prolyl isomérase A (ou cyclophiline A) (synthèse protéique), ainsi que l'actine et certaines formes de Rho-GDI (cytosquelette) (Petрак, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009). Ces protéines représentent ici environ un quart de l'ensemble des formes identifiées dans ces différents processus réunis. En revanche, les autres protéines identifiées n'apparaissent pas dans le « déjà vu », et de même, de nombreuses autres protéines de cette liste classique n'ont pas été identifiées ici (notamment les protéines HSP de réponse aux stress, ou encore les protéines de la famille 14-3-3, les tubulines...). On peut donc considérer que les protéines identifiées dans cette analyse représentent globalement la réponse des cellules RAW 264.7 au traitement par le zinc (NP ou ions).

En particulier, concernant le métabolisme central, on observe l'induction par les ions et les NP, notamment le ZnO cationique, de formes modifiées de plusieurs enzymes de la voie de la glycolyse : une forme de la PGK-1 (ratio jusqu'à 1,492, $p = 0,03$ avec ZnO cationique), catalysant la formation du 3-phosphoglycérate à partir du 1,3-biphosphoglycérate (étape 6), une forme de la PKM (ratio jusqu'à 1,466 avec ZnO cationique, $p = 0,00$), catalysant la formation de pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate (étape 9 finale) (Dang, C.V., 2013), ainsi qu'une forme de l' α -énolase (ratio jusqu'à 1,323 avec ZnO/H₂O, $p = 0,04$), enzyme de l'étape précédant celle catalysée par la PKM. A l'exception de cette dernière, il s'agit aussi principalement ici de formes modifiées minoritaires pour lesquelles la/les formes majoritaires restent pour la plupart inchangées. Il est donc difficile à ce stade de conclure de façon définitive sur les effets de ces variations, que l'on pourrait ici supposer modérés. Toutefois, et bien que ces protéines appartiennent individuellement au

« déjà vu », leur induction simultanée par le zinc, associée à l'induction de l'ensemble des formes de l'énolase, pourraient tout de même suggérer ici une sur-activation, même non spécifique, de la voie de la glycolyse et donc de la production de pyruvate, lui-même nécessaire à la production d'ATP au niveau des mitochondries.

Par ailleurs, les ions Zn^{2+} induisent également la diminution d'une autre forme modifiée de la PGK-1 (ratio de 0,791, $p = 0,04$), simultanément à l'augmentation de la forme citée précédemment, à la limite de la significativité statistique. Dans ce dernier cas, la somme globale de l'intensité de ces deux formes ne variant pas de façon significative, et la forme majoritaire n'étant pas non plus affectée par les ions, on peut supposer qu'il n'existe ici qu'une redistribution des formes modifiées de cette enzyme, dont l'effet sur le métabolisme est difficilement prédictible à ce stade.

En parallèle, les NP et les ions conduisent également à l'augmentation d'une aldose réductase (ratio de 1,206 avec ZnO/H₂O, $p = 0,01$), enzyme permettant la formation de fructose à partir du glucose par la voie des polyols, dont l'intermédiaire est le sorbitol, sans consommation d'énergie comme c'est le cas dans les phases précoces de la glycolyse. Cette activation pourrait donc être un moyen pour les cellules de renforcer la glycolyse en produisant les métabolites nécessaires par des voies alternatives nécessitant moins d'énergie. De plus, il semblerait que cette enzyme joue également un rôle dans la mise en place de la réponse inflammatoire de certains types cellulaires (Ramana, K. V., and S. K. Srivastava, 2010). Ainsi, l'induction observée ici pourrait aussi être liée à des mécanismes d'inflammation induits par les NP.

Enfin, la légère répression par les NP et les ions d'une forme de la MDH-1 cytoplasmique (ratio de 0,820 avec ZnO/H₂O, $p = 0,01$), impliquée dans la conversion de malate issu de la mitochondrie en oxaloacétate destiné dans ce cas à la néoglucogénèse, voie inverse de la glycolyse (Kalhan, S.C., *et al.*, 2008 ; Hanspers, K., *et al.*, 2013), ainsi que celle d'une forme de la TPI-1 par le ZnO cationique (ratio jusqu'à 0,832, $p = 0,05$), enzyme catalysant l'interconversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate sortant de la voie de la glycolyse, pourraient suggérer que les cellules tentent également de limiter la consommation des produits intermédiaires et finaux de la glycolyse, afin d'assurer son fonctionnement à haut régime. Néanmoins, il s'agit là encore de formes modifiées des deux enzymes, dont les formes

majoritaires ne sont pas affectées par le zinc. Ainsi, il reste difficile à ce stade de conclure de façon définitive sur la réponse associée.

L'ensemble de ces résultats suggère une réorientation des voies métaboliques classiques par plusieurs moyens, dans le but de favoriser la voie glycolytique. Cette réponse, qui n'est pas réellement spécifique de l'exposition au zinc (essentiellement « déjà vu ») permettrait aux cellules de compenser l'augmentation des besoins énergétiques leur permettant de lutter contre le stress induit par les NP et, dans une moindre mesure, les ions (souvent à la limite de la significativité statistique dans ce cas). Cependant, à l'exception de l'énolase pour laquelle toutes les formes sont induites, l'absence de modifications observées sur les formes majoritaires des protéines concernées ne permet pas de conclure de façon définitive. Il semble donc nécessaire et pertinent ici de valider ou non cette hypothèse par un test ciblé mettant en jeu le dosage enzymatique et colorimétrique du produit final de la glycolyse : le pyruvate.

De plus, les ions, et dans une moindre mesure le ZnO/H₂O, induisent également l'augmentation de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) (ratio de 1,305 avec Zn²⁺, $p = 0,04$). Cette dernière est la 3^{ème} enzyme de la voie des pentoses phosphates, voie alternative à la glycolyse pour le métabolisme carboné, qui permet également la production d'équivalents redox sous forme de NADPH, participant à la régulation de l'équilibre redox des cellules (Stover, N.A., *et al.*, 2011 ; Hanspers, K., *et al.*, 2013). Il semblerait donc que, dans le cas des ions, cette voie soit induite prioritairement à la voie classique, à la fois dans le cadre d'une réponse générale au stress induit, mais aussi pour lutter contre un éventuel stress oxydant. Cette dernière hypothèse pourrait être testée par le dosage de l'activité enzymatique de la 6-PGDH.

Enfin, concernant les autres voies constituant la réponse générale des cellules au stress, les protéines sont majoritairement affectées par les ions d'une part, et réprimées d'autre part. Dans le cas de la signalisation cellulaire, il s'agit essentiellement de sous-unités de protéines G (« *guanine nucleotide-binding proteins* ») ainsi que d'une forme modifiée d'une phosphatase dont la forme majoritaire reste là encore inchangée. Les voies de biosynthèse et de repliement protéique sont quant à elles affectées au niveau de plusieurs facteurs de transcription, d'initiation de la traduction, et d'élongation, mais aussi de ligases d'acides aminés et d'ARNt, d'une protéine ribosomale (n°21), de chaperonnes (n°16, 23), ou encore de protéines impliquées

dans la synthèse d'acides aminés (n°22, 24) ou la maturation des protéines (n°14, 16). Ceci traduit soit une toxicité des ions Zn^{2+} , et dans une moindre mesure des NP de ZnO, que les cellules n'arriveraient pas à compenser, soit le fait que, comme précédemment, les cellules concentrent leurs efforts sur les processus nécessaires à la lutte contre le stress, induisant ainsi une légère baisse de régime des autres processus cellulaires.

iii. Analyse de la réponse au stress oxydant

La réponse des cellules RAW 264.7 au stress oxydant est spécifique des traitements appliqués sur les cellules, puisque les modifications observées ne font pas partie des protéines classiquement identifiées en protéomique (« déjà vu ») (Petraik, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009). Cependant, cette réponse est ici très limitée, bien que nous ayons étudié des NP métalliques et des ions zinc, connus pour interagir avec un grand nombre d'éléments au sein de la cellule. En effet, elle est principalement marquée par une très forte induction de la sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase (GCLM), à la fois avec les NP et les ions (ratio jusqu'à 1,837 avec Zn^{2+} , $p = 0,03$). Cette enzyme intervenant dans la première étape de la synthèse du glutathion (étape limitante), ce résultat suggère une production accrue de glutathion dans les cellules, afin de compenser le stress induit. Afin de valider cette hypothèse, le niveau de glutathion intracellulaire a été dosé par un test ciblé.

Si les effets des NP de ZnO sur le glutathion ou les enzymes participant à sa synthèse sont peu décrits, ceux des ions, en revanche, sont plus documentés. Il a ainsi déjà été montré, sur différents modèles cellulaires, qu'un déficit en zinc peut réduire les quantités de GCLM et de glutathion (Omata, Y., *et al.*, 2013), ce qui pourrait suggérer qu'à l'inverse, une augmentation de la quantité en zinc peut en effet induire une augmentation de l'enzyme de synthèse et du produit final, phénomène également observé par certains groupes (Ha, K.N., *et al.*, 2006). Cependant, d'autres études suggèrent que cette augmentation n'est que transitoire, et que les quantités de glutathion et de GCLM diminuent ensuite au cours du temps, de même que l'activité de la glutathion réductase, enzyme clé de régénération du GSH (Wilhelm, B., *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats pourrait s'interpréter de la façon suivante : (1) un déficit en zinc réduit la production du glutathion, rendant les cellules plus sensibles à d'éventuels stress oxydants ; (2) à dose physiologique normale, le zinc stimule la synthèse du glutathion, et semble donc avoir un effet protecteur et, de manière indirecte, antioxydant, nécessaires à la cellule pour maintenir son équilibre redox et lutter contre les stress éventuels ; (3) à l'inverse, si le zinc est présent en excès, il conserve dans un premier temps son rôle antioxydant, sur-activant la synthèse du glutathion. Cependant, si la dose de zinc devient excessive, celui-ci devient réellement toxique, et finit par induire dans un second temps la mort des cellules, associée à une diminution de la production de GSH.

Par ailleurs, deux autres modifications ont été observées dans le cadre de cette réponse. Tout d'abord, l'isoforme 2 de l'hème oxygénase (HO-2), réprimée de façon significative uniquement par les NP de ZnO/H₂O (ratio de 0,492, $p = 0,02$). Les hèmes oxygénases catalysent la dégradation des hèmes dans les microsomes, libérant ainsi du fer, du monoxyde de carbone (CO) et de la biliverdine, qui peut être convertie ensuite en bilirubine. Elles sont généralement associées à la réponse au stress oxydant, ce qui peut s'expliquer par le fait que, d'une part, la bilirubine et la biliverdine présentent des propriétés antioxydantes potentielles, et d'autre part, que le CO pourrait agir de façon similaire au NO, capable d'activer les cascades de signalisation impliquées dans ce type de réponse (Kikuchi, G., *et al.*, 2005). L'observation de cette modification semble donc cohérente avec la littérature.

En revanche, la réponse la plus fréquente, qui n'a pas été observée ici, consiste en une induction de l'HO-1, en particulier par les métaux lourds, tandis que l'HO-2 est exprimée de façon constitutive, et ne peut donc qu'être réprimée si elle doit être affectée. Dans ce contexte, on pourrait donc supposer que le ZnO présente des effets toxiques forçant la cellule soit à réprimer l'HO-2, par interaction directe avec le zinc ou afin de limiter la libération de métaux à partir des hèmes, qui pourraient perturber encore l'équilibre redox, soit à inhiber cette voie anti-oxydante potentielle pour favoriser la voie principale mettant en jeu le glutathion. Or, une étude plus ancienne semble corroborer le fait que le zinc soit toxique et puisse diminuer la capacité d'induction des HO (Drummond, G.S., and A. Kappas, 1979).

Enfin, les ions répriment quant à eux le « *neutrophil cytosol factor 4* » (NCF-4) (ratio de 0,530, $p = 0,03$), protéine régulatrice contribuant à l'assemblage du complexe NADPH-oxydase, responsable de la poussée oxydante par la formation de ROS (en particulier ions superoxydes) (Lee, R., *et al.*, 2012). La répression de ce facteur pourrait ici être liée au couplage entre les effets toxiques et antioxydants des ions zinc, et aurait pour objectif de limiter le *burst* oxydant afin de protéger les cellules contre un stress trop intense. Ce mécanisme viendrait alors compléter la surproduction de glutathion mise en évidence ci-dessus.

iv. Analyse de la réponse mitochondriale

De façon générale, les effets du zinc sur la mitochondrie restent limités puisqu'ils se caractérisent uniquement par trois modifications. De plus, deux de ces modifications sont fréquemment observées en analyse protéomique : l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) et la sous-unité β d'une ATP synthase (ATP-5 β) (fréquences d'environ 15% et 20% respectivement) (Petрак, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009). La réponse observée n'est donc pas spécifiquement liée aux NP de ZnO et aux ions zinc. Néanmoins, la compréhension des mécanismes mis en jeu reste nécessaire et intéressante.

Tout d'abord, on observe la répression de l'ALDH par les deux NP (ratio jusqu'à 0,678 avec ZnO/H₂O, $p = 0,01$). Cette protéine de la matrice mitochondriale est impliquée dans le métabolisme des alcools : l'acétaldéhyde produit à partir de l'éthanol dans le cytosol, est pris en charge par l'ALDH dans la mitochondrie et converti en acétate, utilisé ensuite pour former l'acétyl-coA qui entre dans le cycle de Krebs. Or, la formation d'acétate s'accompagne de la production d'équivalents réduits sous forme de NADH, qui, au niveau de la mitochondrie, peuvent conduire à la production de ROS (Brocardo, P.S., *et al.*, 2011). Ici, la répression de l'ALDH pourrait donc être interprétée comme une tentative supplémentaire des cellules pour réduire la production de ROS et lutter contre le stress oxydant.

Par ailleurs, deux protéines de la membrane mitochondriale interne sont également modifiées, à la fois par les ions et les NP : une forme modifiée de l'ATP-5 β (réprimée, ratio jusqu'à 0,355 avec Zn²⁺, $p = 0,02$), impliquée dans la production d'énergie sous forme d'ATP en présence d'un gradient transmembranaire de protons, et une forme modifiée de la « *mitochondrial inner membrane protein* », également connue sous le

nom de mitofiline (induite, ratio jusqu'à 1,645 avec ZnO/H₂O, $p = 0,01$), impliquée dans le maintien structural des membranes mitochondriales, en particulier de la structure des crêtes de la membrane interne (von der Malsburg, K., *et al.*, 2011 ; Zerbes, R.M., *et al.*, 2012). Bien que ces modifications soient très intenses, il s'agit une fois encore de variations affectant des formes modifiées, la forme majoritaire de la protéine restant inchangée dans les deux cas. Ceci suggère que les effets des variations observées seront probablement très modérés. Toutefois, si des effets sont visibles, on pourrait ici envisager qu'il s'agisse de changements structuraux des mitochondries sous l'effet du zinc (NP et ions), associés à d'éventuelles variations du potentiel transmembranaire, fortement lié au gradient de protons. Nous avons donc tout de même étudié cette hypothèse, par la mesure des variations du potentiel transmembranaire par une technique ciblée basée sur la cytométrie en flux. Par ailleurs, la répression de sous-unités d'ATP synthases pouvant par extension conduire à une diminution de la production d'ATP, ces résultats seraient aussi en accord avec l'éventuelle sur-activation du métabolisme central, qui traduirait alors l'effort fourni par les cellules pour compenser les pertes énergétiques et lutter contre le stress.

v. Effets du zinc sur le cytosquelette et le transport intracellulaire

Le cytosquelette est également affecté par le zinc (NP et ions), à la fois sur un plan structural et sur un plan fonctionnel. Par ailleurs, parmi les 8 modifications observées, 2 font partie du « déjà vu en protéomique » : une forme d'actine (légèrement augmentée avec ZnO/H₂O, ratio de 1,270, $p = 0,03$), et une forme modifiée de la Rho-GDI-1, contrôlant le désassemblage des filaments d'actine (légèrement réprimée avec Zn²⁺, ratio de 0,866, $p = 0,01$), pour lesquelles les formes majoritaires sont inchangées (Pettrak, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009). Ces modifications pourraient tout de même suggérer des changements structuraux modérés des cellules, non spécifiques de l'exposition au zinc, tandis que les autres protéines modifiées correspondent à la réponse spécifique des cellules au ZnO ou aux ions Zn²⁺.

En particulier, on note l'induction par les NP de la gelsoline, également appelée « *actin-depolymerizing factor* » (ADF) (ratio de 2,307 avec ZnO/H₂O, $p = 0,04$) et d'une sous-unité de la « *F-actin-capping protein* » (ratio de 1,427 avec ZnO cationique, $p = 0,02$). Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine, qui est Ca²⁺-dépendante dans le cas de la gelsoline. De plus, pour

cette dernière, tous les spots correspondants aux formes modifiées de la protéine sont induits de la même manière, à la limite de la significativité statistique (données vérifiées mais non présentées). Ceci suggère là encore l'induction de changements structuraux des cellules par les NP.

De plus, on observe la répression d'une forme modifiée de la Rho-GDI-2, à la fois par les NP et les ions (ratio jusqu'à 0,752 avec ZnO/H₂O, $p = 0,04$), que l'on peut associer à la répression de la forme de Rho-GDI-1 citée ci-dessus. Cependant, les formes majoritaires de ces deux protéines Rho-GDI étant inchangées, il reste difficile de conclure définitivement sur les effets de ces modifications. Néanmoins, associées à celles des protéines structurales ou régulatrices de l'assemblage et du désassemblage des filaments d'actine, elles pourraient tout de même suggérer un impact potentiel sur les processus de phagocytose, qui mettent en jeu ces filaments. En effet, l'inhibition des Rho-GDI empêcherait la régulation de la dépolymérisation des filaments d'actine, pouvant conduire à la formation de fibres de stress et à une réduction des capacités phagocytaires des cellules (O'Reilly, P.J., *et al.*, 2003). Nous avons donc choisi d'évaluer ces effets potentiels par un test fonctionnel ciblé afin de valider ou non cette hypothèse.

En outre, nos résultats suggèrent que les ions induisent également des changements structuraux, mais par des mécanismes différents. En effet, tandis que les protéines constituant ou régulant les filaments d'actine ne sont pas affectées de façon significative par le Zn²⁺, on observe une légère répression d'une protéine de la famille RP/EB, régulant cette fois l'assemblage des microtubules (ratio de 0,809, $p = 0,03$). Or, les effets toxiques du zinc ionique, ainsi que son interaction avec la tubuline mais pas avec l'actine, sont déjà documentés depuis plusieurs années (Kress, Y., *et al.*, 1981 ; Rudolf, E., *et al.*, 2008 ; Mackenzie, G.G., and P.I. Oteiza, 2007). Ces résultats semblent donc cohérents avec les données de la littérature.

De façon intéressante, nous avons également observé ici des modifications (répressions) de certaines protéines impliquées dans le trafic intracellulaire, en particulier sous l'effet des ions. Tout d'abord, la protéine SNAP- α (« *α -soluble NSF attachment protein* »), nécessaire au transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, est réprimée par l'ion Zn²⁺ uniquement (ratio de 0,711, $p = 0,03$). Ce résultat suggère une inhibition potentielle des voies de transport protéique intracellulaire.

Par ailleurs, les NP de ZnO cationique et les ions affectent également la protéine SNX-2 (« *sorting nexin-2* ») (répression d'une forme modifiée avec ratio jusqu'à 0,839 avec Zn^{2+} , $p = 0,02$, et répression similaire mais non significative des autres formes). Or, les protéines SNX jouent un rôle dans les mécanismes d'endocytose, en participant au contrôle de la destination des composés contenus dans les endosomes précoces (Carlton, J., *et al.*, 2004). En effet, ceux-ci peuvent : (1) être conservés dans ces vésicules jusqu'à leur maturation en endosomes tardifs puis en corps multivésiculaires, suivie de leur fusion avec les lysosomes (voie de dégradation) ; (2) être réorientés vers la membrane cellulaire après leur récupération par le « compartiment endocytaire de recyclage » (voie de recyclage) ; (3) être orientés transitoirement vers le compartiment de recyclage puis pris en charge par un complexe de transport régulé par les protéines SNX (Gullapalli, A., *et al.*, 2004 ; Carlton, J.G., *et al.*, 2005), et qui les amène ensuite vers l'appareil de Golgi (voie de non-dégradation).

Les macrophages peuvent mettre en jeu des mécanismes d'endocytose classique, mais aussi de macropinocytose, forme d'endocytose non spécifique et actine-dépendante permettant l'internalisation de composés de taille comprise entre quelques centaines de nanomètres et 1 micromètre en solution dans un fluide extracellulaire (Lim, J.P., *and* P.A. Gleeson, 2011). Comme la phagocytose, elle joue un rôle clé dans leur fonction d'élimination de pathogènes ou de corps étrangers. Le choix de l'une ou l'autre des voies dépend essentiellement de la taille de l'élément à internaliser.

Ces résultats, associés à ceux impliquant éventuellement la phagocytose, suggèrent des perturbations, mêmes modérées, de plusieurs voies d'internalisation sous l'effet du zinc, à la fois nanoparticulaire et ionique. Plus particulièrement, dans le cas de la macropinocytose, qui peut être envisagée pour les NP étudiées ici compte tenu de leur taille (environ 200 à 250 nm), l'inhibition du contrôle de la voie de non-dégradation pourrait être interprétée comme un mécanisme mis en place par les cellules pour orienter préférentiellement les NP vers une dégradation par voie lysosomale. De tels mécanismes de réorientation des voies d'internalisation ont déjà été mis en évidence dans le cas de NP non métalliques (Kadiu, I., *et al.*, 2011). Par ailleurs, ce résultat serait cohérent avec les analyses par microscopie électronique présentées auparavant (Figure 66), dans lesquelles on peut voir que certaines des NP internalisées sont de taille très

inférieure à celle des agrégats de la suspension utilisée initialement pour traiter les cellules, suggérant une dégradation intracellulaire.

vi. Effets sur les processus de dégradation des protéines

L'analyse protéomique sur la lignée RAW 264.7 a également montré des modifications pour des protéines impliquées dans la dégradation protéique, majoritairement sous l'effet des ions Zn^{2+} , et aucune d'entre elles n'étant répertoriée dans le « déjà vu » classique. En particulier, on note la répression de deux sous-unités régulatrices du protéasome 26S (ratio jusqu'à 0,518, $p = 0,02$), qui participe habituellement aux mécanismes de détoxification lors de stress oxydants (Aiken, C.T., *et al.*, 2011). Ce type de répression a déjà été observé en réponse à un stress oxydant, induit notamment par des métaux, et les modèles actuels proposent que l'inhibition des sous-unités régulatrices (tête 19S) du protéasome 26S favoriserait la dégradation des protéines oxydées par les sous-unités catalytiques du complexe (cœur 20S) (Aiken, C.T., *et al.*, 2011 ; Yu, X., R.A. Ponce, *and* E.M. Faustman, 2011). Ainsi, nos résultats semblent cohérents avec ce modèle, et traduisent la sur-activation des défenses anti-oxydantes mettant en jeu le protéasome afin de compenser le stress induit par les ions Zn^{2+} en excès. Comme proposé lors de l'étude du cuivre, il serait intéressant ici de tester les effets des ions aux mêmes doses après avoir préalablement traité les cellules par des inhibiteurs du protéasome, qui limiteraient alors leurs capacités détoxifiantes et anti-oxydantes.

On observe également la légère répression de la sous-unité 2 du complexe d'activation du protéasome (ratio de 0,832, $p = 0,01$), également appelée PA28- β ou encore 11S-REG- β . Il s'agit d'une sous-unité régulatrice, qui participe à l'activation du protéasome 20S, et joue notamment un rôle important dans la prise en charge des pathogènes et la présentation des antigènes issus de leur dégradation par le CMH I (activation de « l'immunoprotéasome » sous l'effet de cytokines, telles que l'IFN- γ) (Mott, J.D., *et al.*, 1994 ; Rechsteiner, M., *et al.*, 2000 ; Sijts, A., *et al.*, 2002 ; Ossendorp, F., *et al.*, 2005). Compte tenu de l'activité régulatrice de cette protéine, on peut ici envisager que sa répression corresponde à un mécanisme similaire à celui évoqué ci-dessus, ayant pour objectif la sur-activation du protéasome et de ses propriétés anti-oxydantes, et/ou de l'immunoprotéasome, en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires dont la production aurait été induite par les ions.

Par ailleurs, plusieurs protéines impliquées dans les mécanismes de polyubiquitylation sont également réprimées par les ions Zn^{2+} , et dans une moindre mesure par les deux NP : la « *calcyclin-binding protein* », qui participe à l'ubiquitination Ca^{2+} -dépendante (ratio de 0,892 avec Zn^{2+} , $p = 0,05$), une isoforme d'une hydrolase UCH (« *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* »), impliquée dans le clivage des chaînes polyubiquitines, et qui est associée au protéasome régulateur 19S (ratio jusqu'à 0,495 avec Zn^{2+} , $p = 0,02$), et enfin une enzyme de synthèse des chaînes polyubiquitines (E2 N) (ratio de 0,600 avec ZnO/H_2O , $p = 0,03$). Une telle inhibition des voies ubiquitine-dépendantes du protéasome par le zinc a déjà été observée par certains groupes (Kim, I., *et al.*, 2004). Cependant, ces données ne sont pas en accord avec l'augmentation de l'activité du protéasome supposée ci-dessus. Elles suggèrent plutôt des mécanismes de toxicité des ions et des NP, que les cellules ne seraient pas en mesure de compenser, ou au contraire, des mécanismes mis en place par les cellules pour limiter une dégradation protéique trop importante, qui réduirait leurs capacités à lutter contre le stress induit.

vii. Autres protéines affectées par le zinc

Pour terminer, quelques autres protéines ont aussi montré des variations quantitatives sous l'effet des ions et/ou des NP. Parmi celles-ci, il semble intéressant de mentionner l'adénine phosphoribosyltransférase, réprimée avec le ZnO/H_2O (ratio de 0,662, $p = 0,05$) et l'inosine-5'-monophosphate déshydrogénase 2, (IMPDH-2) réprimée avec les deux NP (ratio jusqu'à 0,676 avec ZnO cationique, $p = 0,01$). Ces deux protéines sont impliquées dans le métabolisme des purines (synthèse d'AMP et de guanine, respectivement). Ce résultat suggère que les NP de ZnO pourraient avoir des effets néfastes sur les acides nucléiques, que les cellules ne seraient plus en mesure de réparer. Ces effets pourraient être évalués par des tests ciblés tels que le test des comètes.

2.4. Validations fonctionnelles sur les lignées cellulaires

Comme lors de l'étude des effets du cuivre, plusieurs types de tests ciblés ont été réalisés, dans le but d'établir des corrélations entre les variations moléculaires observées et des événements fonctionnels, afin d'approfondir et de valider les hypothèses établies à partir des données de l'analyse protéomique. Il s'agit essentiellement de tests basés sur des techniques de cytométrie en flux, mais également de biochimie, et d'enzymologie.

2.4.1. Effets du zinc sur la capacité phagocytaire des cellules

L'analyse protéomique montre que le zinc, en particulier sous forme ionique, affecte quelques protéines du cytosquelette, souvent impliquées de façon indirecte dans les mécanismes de phagocytose. Comme dans le cas du cuivre, celle-ci a donc été évaluée après traitement ou non des cellules par le zinc, puis mise en contact avec des billes fluorescentes de 1 μm . L'objectif est ici de déterminer si les macrophages sont toujours aptes à phagocyter des composés exogènes après avoir été exposés au zinc. Les effets des NP de ZnO cationique et ZnO/H₂O, ainsi que des ions Zn²⁺ ont été évalués sur les deux lignées de macrophages, à leurs DL20 respectives. Ce test a été réalisé selon les conditions expérimentales mises au point lors de l'étude du cuivre (étape de désorption au D-sorbitol notamment). Le taux de phagocytose (fluorescence des billes internalisées) a ensuite été évalué par cytométrie en flux (FACScalibur) en utilisant les paramètres d'excitation/émission du FITC (495 nm/520 nm). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 71.

Tout d'abord, il est à noter que le bruit de fond (taux d'adsorption des billes en surface des cellules à 4°C) est relativement faible ($\leq 5\%$ dans tous les tests), le pic principal observé entre 10⁰ et 10¹ d'intensité correspondant comme précédemment à l'auto-fluorescence des cellules. Ainsi, la fluorescence mesurée dans les conditions testées est bien uniquement celle des billes internalisées. Par ailleurs, ces tests ont montré que, en l'absence de traitement au zinc, 70 à 90 % des cellules sont phagocytaires, la plupart étant capables d'internaliser au moins une et jusqu'à 4 billes ou plus, ce qui se traduit par un nombre correspondant de pics d'intensité. Cette internalisation des billes s'accompagne également d'une légère augmentation de granulosité des cellules (cf. contrôle 37°C, Figure 71, gauche). La forte proportion de cellules phagocytaires observée met l'accent sur l'importance de cette fonction chez les macrophages.

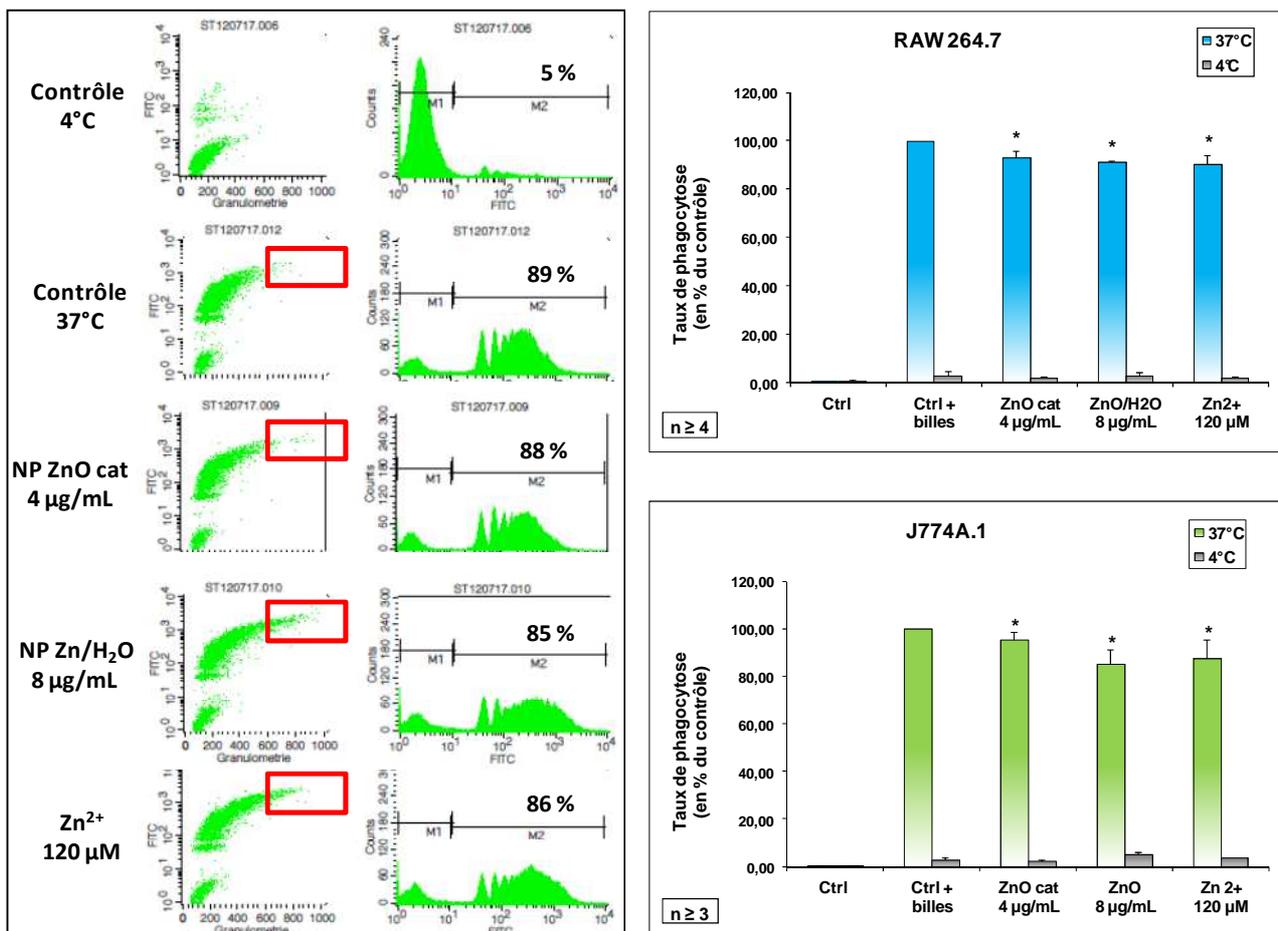


Figure 71 : Effets du zinc sur la capacité phagocytaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à leur DL20, puis mises en présence de billes fluorescentes pendant 2h à 37°C ou à 4°C. La fluorescence des billes internalisées (cellules vivantes uniquement) a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). A gauche : Dot-plots et histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Taux de phagocytose moyen dans les différentes conditions, exprimé en pourcentage du contrôle à 37°C. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Dans le cas des cellules traitées aux NP à leur DL20 respective, on observe une augmentation légère de la granulosité des cellules, plus marquée avec le ZnO/H₂O qu’avec le ZnO cationique, suggérant que les particules ont été internalisées par celles-ci (Figure 71, gauche, encadré en rouge). Cependant, cette internalisation n’induit pas de diminution marquée de la phagocytose (Figure 71, droite). En effet, bien que la légère diminution observée soit statistiquement significative ($p \leq 0,05$), elle ne correspond qu’à une perte de 5 à 10 % de la capacité phagocytaire totale. Ceci suggère que les cellules ayant ingéré des NP de ZnO sont toujours capables d’internaliser d’autres éléments. Ceci semble être en accord avec les données de l’analyse protéomique, qui montraient des variations légères de quelques formes modifiées, souvent

minoritaires, de protéines impliquées de façon plus ou moins directe sur les mécanismes de la phagocytose, suggérant ainsi de possibles perturbations de ces mécanismes, mais de façon très modérée.

Par ailleurs, lorsque les cellules sont exposées aux ions Zn^{2+} à la DL20 correspondante (120 μM), une légère augmentation de la granulosité est aussi observée (Figure 71, gauche, encadré en rouge), sans effets importants sur la phagocytose, comme dans le cas des NP. Ces observations sont également cohérentes avec celles de l'analyse protéomique, dans laquelle les ions avaient souvent des effets proches de ceux des NP. De plus, l'augmentation de la granulosité étant liée à une augmentation de la complexité cellulaire globale, on pourrait ici penser que cette augmentation est liée aux perturbations des mécanismes de trafic intracellulaire suggérées par l'analyse protéomique (endocytose, macropinocytose), mécanismes qui mettent également en jeu des mouvements de vésicules intracellulaires.

En outre, on constate ici que les deux lignées de macrophages répondent de la même manière à la fois aux ions et aux NP, ce qui renforce la validité des effets observés. L'ensemble de ces données permet donc ici de conclure que lorsque les lignées de macrophages sont exposées au zinc, elles subissent un nombre restreint d'atteintes moléculaires au niveau du cytosquelette, principalement sur des formes protéiques modifiées non majoritaires, qui ne sont pas suffisantes pour perturber la capacité des cellules à phagocyter d'autres éléments. De plus, la taille des billes étant proche de celle des bactéries, on peut aussi envisager ici que le zinc, qu'il soit sous forme nanoparticulaire ou ionique, n'altère pas les défenses immunitaires innées.

2.4.2. Effets du zinc sur le glutathion

L'analyse protéomique a montré que le zinc (NP et ions) induit une réponse oxydante relativement modérée : les protéines classiques de réponse au stress oxydant ne sont pas affectées (péroxyrédoxines, hème oxygénase 1, ...), et seule une forte induction de la GCLM est observée, à la fois avec les NP et les ions, suggérant une sur-activation de la production de glutathion dans le but de revenir à un état redox normal. Il paraissait donc pertinent ici de doser les niveaux de glutathion intracellulaire, comme cela a été fait dans le cas du cuivre, en employant la même méthode, basée sur l'utilisation de monochlorobimane (MCB).

Les cellules ont donc été exposées aux NP et aux ions zinc, puis marquées au MCB, qui permet de détecter spécifiquement le glutathion réduit (GSH). La fluorescence du complexe formé a été mesurée par cytométrie en flux (MoFlo), et les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 72.

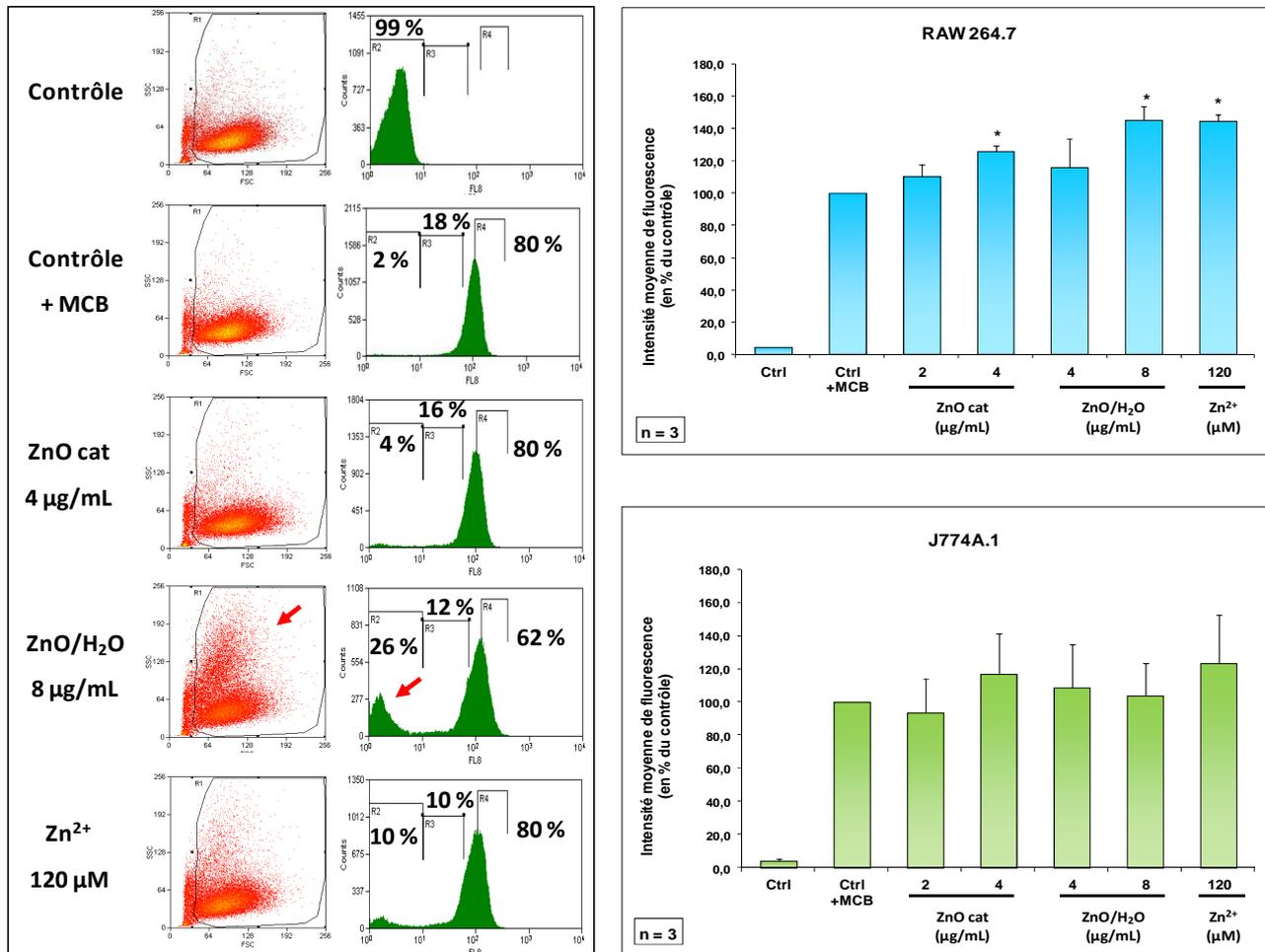


Figure 72 : Effets du zinc sur le glutathion réduit intracellulaire des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis marquées au MCB pendant 5 minutes à 37°C. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au MoFlo (Excitation/Emission : 350/450 nm). A gauche : Dot-plots et histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Intensité de fluorescence moyenne dans les différentes conditions, exprimée en pourcentage du contrôle. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Tout d’abord, en l’absence de traitement au zinc et au MCB, les cellules sont majoritairement détectées dans un pic principal de faible intensité (entre 10^0 et 10^1), correspondant à l’auto-fluorescence des cellules. Le traitement au MCB induit le déplacement de ce pic principal vers une intensité de 10^2 , correspondant à la majorité des cellules (80% dans l’exemple présenté, Figure 72, gauche), mais également à la quantité

totale maximale de GSH présent dans les cellules en conditions normales. On détecte également des populations minoritaires contenant des niveaux plus faibles de glutathion.

Lorsque les cellules sont exposées au ZnO cationique à des doses inférieures ou égales à la DL20 (4 µg/mL) puis marquées au MCB, on obtient les mêmes profils que dans le cas de cellules non traitées, avec une très légère augmentation de la population cellulaire de plus faible niveau de glutathion (Figure 72, gauche). Ceci suggère que les effets éventuels de ce type de NP sont rapidement contrôlés par les cellules. Ainsi, l'induction observée en analyse protéomique avec ces NP pour la GCLM, sous-unité régulatrice de l'enzyme de synthèse du glutathion, pourrait ici permettre une augmentation de la production de GSH en quantités suffisantes, ou plus, pour compenser les pertes éventuelles liées aux NP. Effectivement, l'analyse sur les deux lignées (Figure 72, droite) ne montre aucune diminution significative du niveau global de GSH, et dans le cas de RAW 264.7, ce niveau est même légèrement augmenté, ce qui pourrait être lié à l'induction de la GCLM. Cette compensation suggère ici un stress peu intense, auquel la lignée J774A.1 semble être une fois encore légèrement plus sensible que la lignée RAW 264.7, comme cela avait déjà été observé précédemment.

L'exposition au ZnO/H₂O à la DL20 (8 µg/mL) induit quant à elle une diminution de 25% de la population principale de niveau élevé en GSH (Figure 72, gauche), associée à une légère augmentation de taille et de granulosité, visible sur la représentation en dot-plot (flèches rouges). Celle-ci traduit le fait que les NP ont été internalisées par les cellules, ce qui est en accord avec les analyses par microscopie électronique et les tests ciblés de phagocytose. Une fois internalisées, les NP sont alors capables de diminuer le niveau de glutathion pour un quart environ de la population cellulaire. Cependant, ceci signifie également que la majorité des cellules sont capables de résister au stress induit, ce que les analyses sur les deux lignées confirment (Figure 72, droite) : le niveau de GSH est stable sur la lignée J774A.1 et augmente légèrement sur la lignée RAW 264.7, probablement du fait de l'augmentation de la GCLM liée au stress oxydant induit par les NP. Ainsi, comme dans le cas du ZnO cationique, et bien que les profils d'analyse montrent des effets plus intenses, le stress oxydant induit par le ZnO/H₂O est lui aussi rapidement géré par les cellules.

Enfin, lorsqu'elles sont exposées aux ions Zn^{2+} , la population correspondant au niveau le plus faible en GSH, est légèrement augmentée (10% au lieu de 2% dans les cellules non traitées), et les populations de niveaux intermédiaires sont légèrement diminuées (10% au lieu de 18%). Cependant, la population principale de niveau le plus élevé en GSH n'est pas modifiée (Figure 72, gauche). Ainsi, il semble qu'il n'y ait ici qu'une redistribution des populations de faibles niveaux en GSH, la majorité des cellules conservant une quantité élevée en glutathion, ce qui suggère des effets oxydants modérés de la part des ions. Effectivement, l'analyse sur les deux lignées montre que les cellules ne subissent pas non plus de modifications marquées de leur niveau de glutathion, qui est même augmenté sur les deux lignées, de façon plus importante sur RAW 264.7 là encore. Une fois de plus, on suppose que cette augmentation est liée à l'induction de la GCLM.

L'ensemble des résultats obtenus ici sont donc cohérents avec ceux de l'analyse protéomique. En particulier, l'augmentation de la GCLM détectée dans les trois conditions semble induire la surproduction de GSH en réponse au stress oxydant, de façon suffisante pour conserver des niveaux stables en glutathion dans les cellules J774A.1, et induire une augmentation de ces niveaux sur les cellules RAW 264.7, ce qui est cohérent avec la sensibilité accrue de la lignée J774A.1. En outre, l'induction observée en analyse protéomique était plus forte avec les ions que celle observée avec le ZnO/H₂O, elle-même légèrement plus marquée que celle observée avec le ZnO cationique. Or, les analyses réalisées ici sont parfaitement en accord avec ces observations, l'augmentation des niveaux de glutathion suivant elle aussi les mêmes tendances ($Zn^{2+} \geq ZnO/H_2O \geq ZnO$ cationique).

Dans tous les cas, le stress oxydant induit par le zinc (NP et ions) semble donc modéré, et cette augmentation du GSH semble permettre aux cellules d'y répondre de façon suffisante, ce qui corrobore également la faible quantité de modifications observées à l'échelle moléculaire pour les protéines classiques de réponse à ce type de stress. Une fois encore, il semble intéressant de confirmer ces résultats sur des cellules primaires, afin de conclure définitivement sur ce paramètre.

2.4.3. Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

L'analyse protéomique montre que le zinc induit une réponse mitochondriale limitée, les modifications étant restreintes à 3 protéines : une protéine matricielle, et des formes modifiées minoritaires de deux protéines plutôt impliquées dans la structure de la mitochondrie. Ainsi, ces modifications ne suggèrent pas, *a priori*, de variations du potentiel transmembranaire mitochondrial. Néanmoins, l'estimation de ce dernier en présence de zinc a été évalué, afin de confirmer ou non l'absence de changements au niveau des mitochondries. Le test employé est le même que dans le cas du cuivre, basé sur l'internalisation de rhodamine 123 par les mitochondries. Les résultats sont présentés sur la Figure 73.

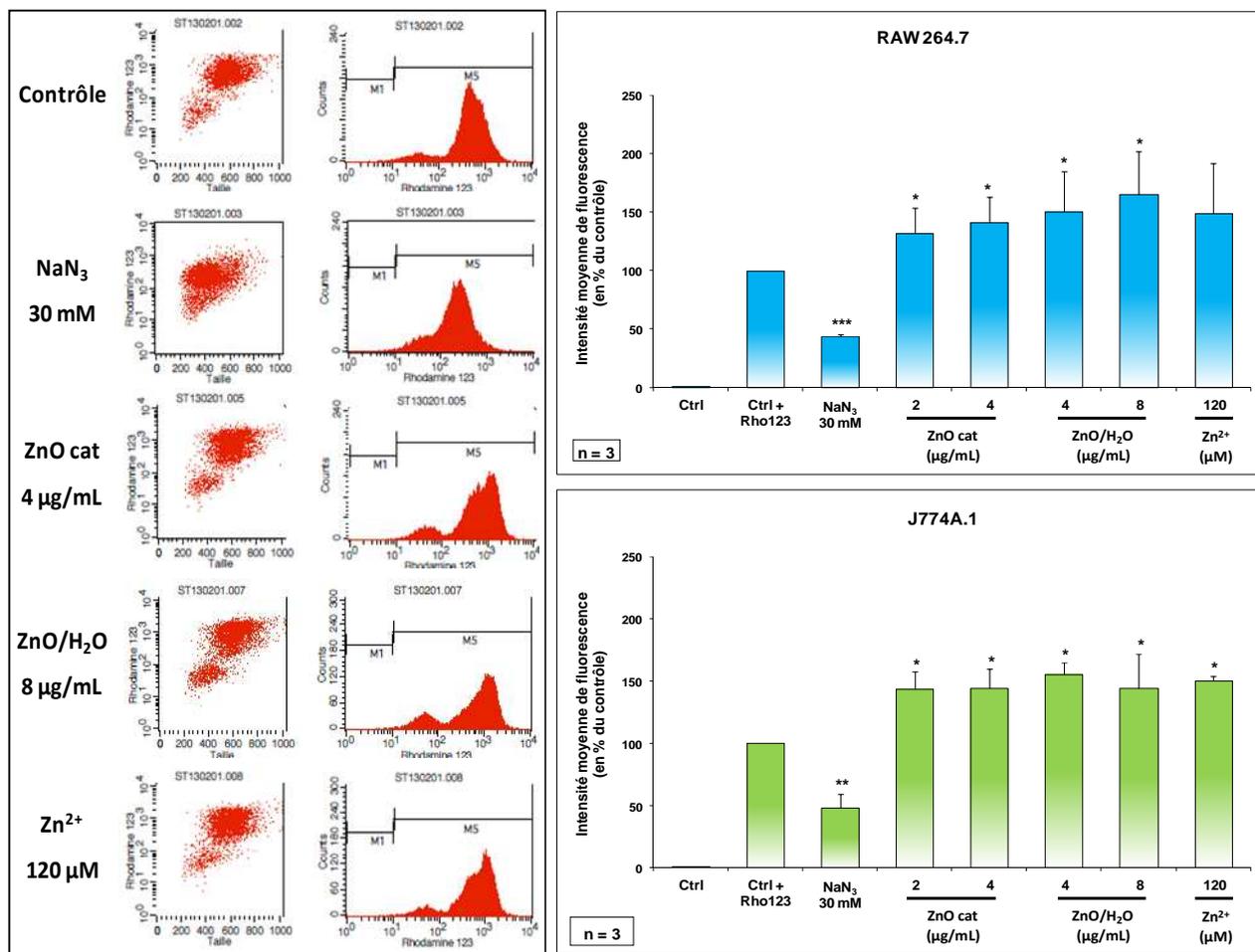


Figure 73 : Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées pendant 24h au ZnO cationique, ZnO/H₂O ou aux ions à différentes doses, puis marquées à la rhodamine 123 pendant 30 minutes à 37°C. Un contrôle négatif a aussi été réalisé par traitement à l'azide de sodium (NaN₃) pendant 2h à 37°C, puis marquage à la rhodamine 123. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). A gauche : Dot-plots et histogrammes types obtenus pour les différentes conditions. A droite : Intensité moyenne de fluorescence dans les différentes conditions, exprimée en pourcentage du contrôle. Les données ont été analysées avec le test statistique non paramétrique de Mann et Whitney : * p≤0,05 ; ** p≤0,01 ; *** p≤0,001.

Tout d'abord, en l'absence de traitement, les cellules sont majoritairement détectées dans un pic principal, dont l'intensité de fluorescence (environ 550 dans l'exemple présenté) traduit la valeur maximale du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules en conditions normales. On note tout de même la présence de populations minoritaires de potentiel plus faible (Figure 73, gauche). Lorsque les cellules sont traitées à l'azide de sodium, qui altère la fonction mitochondriale, l'ensemble du pic principal est décalé vers les intensités de fluorescence plus faibles (environ 250 ici), traduisant une diminution d'un facteur ≈ 2 du potentiel mitochondrial. Ceci a été observé sur les deux lignées de macrophages (Figure 73, droite).

L'exposition des cellules au zinc, qu'il soit sous forme nanoparticulaire ou ionique, fournit des profils similaires à ceux de cellules non traitées (Figure 73, gauche). On observe tout de même une légère augmentation des populations de faible niveau de potentiel mitochondrial, à la fois avec les NP et les ions, mais celle-ci ne semble pas suffisante pour induire une diminution globale de ce potentiel. L'analyse sur les deux lignées confirme qu'effectivement, ni les ions ni les NP de ZnO n'induisent de diminution du potentiel transmembranaire, celui-ci ayant même plutôt tendance à augmenter dans toutes les conditions, souvent de façon statistiquement significative (Figure 73, droite). Or, l'altération de la fonction mitochondriale n'est généralement associée qu'à une diminution de ce potentiel. Ainsi, les résultats obtenus ici sont difficiles à interpréter en tant que tels, mais suggèrent que le zinc n'affecte effectivement pas ce paramètre.

Ces résultats confirmeraient donc également les observations faites dans les analyses protéomiques : le zinc affecte un nombre restreint de formes protéiques mitochondriales, non impliquées dans les transferts de protons et d'électrons au niveau de la membrane, et il n'en résulte donc aucune variation du potentiel transmembranaire associé. Néanmoins, les lignées étant généralement plus résistantes, la réalisation du même test sur de macrophages primaires s'avère ici indispensable pour pouvoir conclure de manière définitive sur les effets du zinc sur la mitochondrie.

2.4.4. Effets du zinc sur la production de NO

Afin de compléter l'étude des effets du zinc, nous avons également évalué les effets des NP de ZnO et des ions Zn^{2+} sur la capacité des macrophages à produire des médiateurs inflammatoires. En effet, l'analyse protéomique n'a pas montré, *a priori*, d'effets du zinc sur des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire des macrophages, et l'on pourrait donc s'attendre ici à ce que le zinc n'affecte pas ces processus. Néanmoins, l'analyse de cette capacité reste indispensable, dans la mesure où celle-ci constitue une fonction essentielle de ce type cellulaire, nécessaire et indispensable aux défenses immunitaires innées.

La capacité des lignées de macrophages à produire du NO, après stimulation au LPS, a donc été évaluée ici en présence ou non de zinc (NP et ions), par la méthode de Griess, selon les mêmes conditions expérimentales que lors de l'étude du cuivre. Les résultats de ce test sont présentés sur la Figure 74.

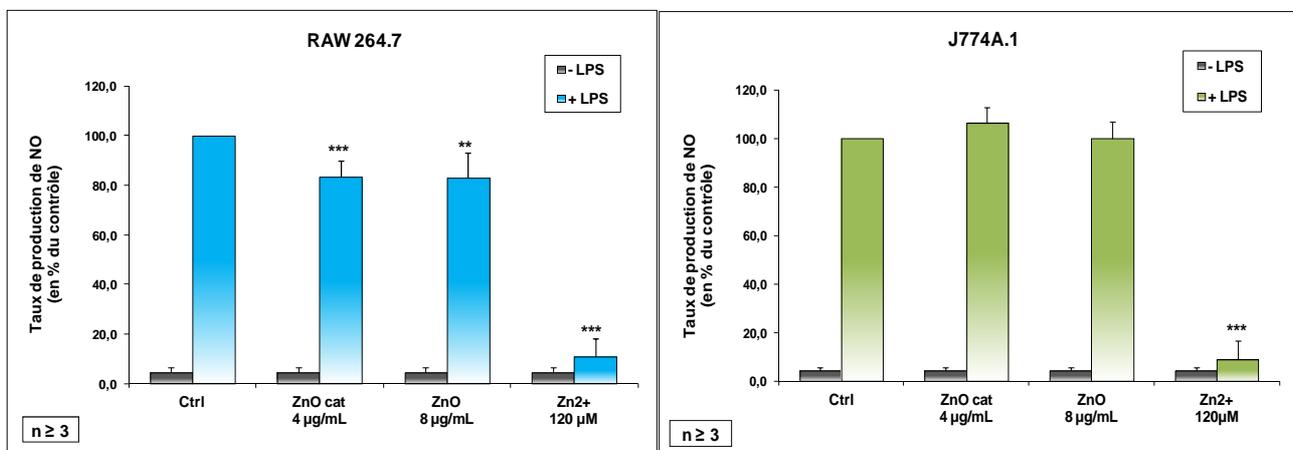


Figure 74 : Effets du zinc sur la production de NO par les lignées RAW 264.7 et J774A.1. Les cellules ont été traitées ou non pendant 24h à 37°C aux NP ou aux ions à leurs DL20, puis stimulées ou non pendant 24h à 37°C au LPS (1 µg/mL) en présence d'arginine (5 mM). Le NO sécrété dans le milieu de culture a été dosé par incubation du surnageant avec un volume équivalent de réactif de Griess pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe formé a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm, contre une gamme de nitrite de sodium ($NaNO_2$). Le taux de production de NO dans les différentes conditions est exprimé en pourcentage du contrôle stimulé. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Tout d'abord, ce test montre que les cellules ne produisent du NO qu'après stimulation au LPS, simulant les conditions d'une attaque pathogène. La question qui se pose est donc de savoir si le zinc affecte ou non la capacité des cellules à répondre à de telles conditions. Or, on constate que les deux types de NP n'induisent qu'une diminution faible de la capacité de production de NO : bien que celle-ci soit statistiquement significative sur la lignée RAW 264.7, elle ne reste que de l'ordre de 15%, et aucune diminution significative n'est observée sur J774A.1. on peut donc en déduire que le zinc sous forme nanoparticulaire n'altère pas la capacité des macrophages à produire ce type de médiateurs inflammatoires. Ceci corrobore tout de même les analyses protéomiques, dans lesquelles aucune modification n'a été observée pour des protéines qui seraient impliquées dans la production de médiateurs ou dans la mise en place de la réponse inflammatoire de manière générale.

En revanche, les ions ont ici des effets très marqués sur la production de NO : à dose équivalente à celle des NP (ZnO/H₂O), on observe sur les deux lignées une perte significative de 90% de la capacité à produire ce médiateur. Or, l'analyse protéomique n'a montré aucune modification induite par le zinc ionique sur des protéines impliquées dans l'activation de la réponse inflammatoire ou la production de NO. Néanmoins, ces résultats semblent cohérents avec les données de la littérature. En effet, la revue de Pluth *et coll.* confirme l'existence d'interactions étroites entre le Zn²⁺ et le NO, notamment dans le système immunitaire (Pluth, M.D., *et al.*, 2011). Plus particulièrement, de nombreuses études sur différents modèles cellulaires (cellules pulmonaires, kératinocytes, ...) prouvent que le zinc, à des concentrations de l'ordre de 10 à 150 µM, possède des propriétés anti-inflammatoires, et est capable notamment d'inhiber l'activité des enzymes de synthèse du NO. Ce rôle apparaît également dans le fait que le NO lui-même, en conditions inflammatoires, serait capable d'induire la libération de zinc à partir de métallothionéines, de façon à appliquer un rétro-contrôle de la réponse inflammatoire. De ce fait, il a également été montré qu'une déficience en zinc induit des dysfonctionnements importants du système immunitaire, pouvant conduire à des états d'inflammation chronique. Ainsi, le zinc ionique est donc nécessaire au bon déroulement et à la résolution de la réponse inflammatoire, mais, à concentration excessive, comme cela semble être le cas dans le test réalisé ici, il inhibe la production du NO nécessaire à cette réponse. Cet effet est ici spécifique de la forme ionique du

zinc, et il apparaît ici nécessaire de valider ces observations, par la réalisation du même test sur des cellules primaires.

2.4.5. Effets du zinc sur le métabolisme : dosage du pyruvate

L'analyse protéomique sur les lignées a montré l'induction, sous l'effet du zinc, de plusieurs enzymes de la voie de la glycolyse, et en particulier de toutes les formes de l' α -énolase, enzyme de l'avant-dernière étape de cette voie, conduisant à la production de pyruvate. Ces observations suggèrent ici une activation de métabolisme central, dans le cadre d'une réponse spécifique au zinc puisque ces modifications ne correspondent pas uniquement à celles classiquement observées (« déjà vu en protéomique »). Afin de valider cette hypothèse, la production de pyruvate par les cellules en présence de zinc a été évaluée. Pour cela, des cellules de la lignée RAW 264.7 ont été exposées aux NP et aux ions zinc, puis lysées. Le pyruvate a été dosé dans les surnageants de lyse à l'aide d'un kit enzymatique, après élimination des protéines pouvant, d'après le fournisseur, interférer avec ce dosage.

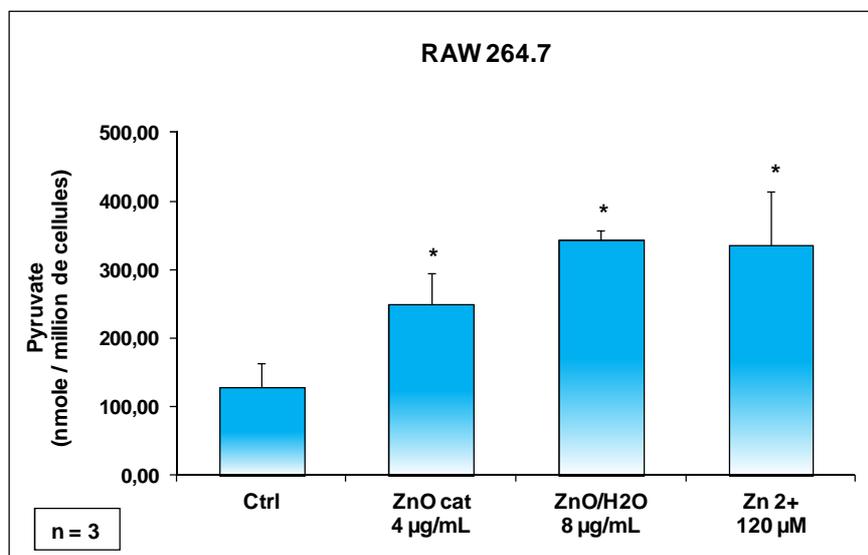


Figure 75 : Effet du zinc sur la production de pyruvate par la lignée RAW 264.7. Les cellules ont été exposées pendant 24h à 37°C aux NP et aux ions à leur DL20 respective, puis récoltées et lysées. La quantité de pyruvate produit a alors été déterminée dans les différentes conditions par voie enzymatique, conduisant à la formation d'un composé coloré proportionnel au pyruvate présent dans l'échantillon, dont l'absorbance a été mesurée à 560 nm. La quantité de pyruvate a été exprimée en fonction de la quantité de cellules dans l'échantillon. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Les résultats de ce test (Figure 75) montrent que le zinc, qu'il soit sous forme ionique ou nanoparticulaire, induit effectivement une augmentation très marquée de la production de pyruvate par les macrophages : celle-ci peut être jusqu'à trois fois supérieure à celle obtenue en conditions normales (ZnO/H₂O et Zn²⁺). Ainsi, nos résultats corroborent ceux de l'analyse protéomique, et l'on peut déduire ici que le zinc induit une sur-activation du métabolisme central des cellules, que l'on suppose nécessaire à la lutte contre le stress induit. La confirmation de ces observations sur des cellules primaires semblent également intéressante ici.

2.5. Validation sur des macrophages primaires murins

Comme expliqué lors de l'étude du cuivre, les cellules primaires constituent le modèle le plus proche de la réalité sur le plan physiologique. Bien que la faible quantité de matériel biologique qu'il est possible d'obtenir en cultures primaires ne permette pas leur utilisation pour des approches protéomiques telles que celle réalisée dans ces travaux, les cellules primaires peuvent être utilisées pour la réalisation de tests à plus petite échelle. Ici, des cultures primaires de macrophages établies à partir de moelle osseuse de souris ont été différenciées, caractérisées, et exposées aux NP et aux ions zinc pour la réalisation de plusieurs types de tests ciblés, dans le but de confirmer les données obtenues sur les lignées, et de valider celles de l'analyse protéomique.

2.5.1. Cytotoxicité sur zinc sur les cellules primaires

Afin d'étudier les effets des NP de ZnO et des ions Zn^{2+} sur les macrophages primaires, il était nécessaire, dans un premier temps, d'évaluer leur toxicité sur ces cellules, et de déterminer la DL20 à employer dans les différents tests ciblés à suivre. Pour cela, le taux de mortalité cellulaire en présence des NP et des ions a été estimé par le test d'exclusion de colorant comme précédemment sur les lignées.

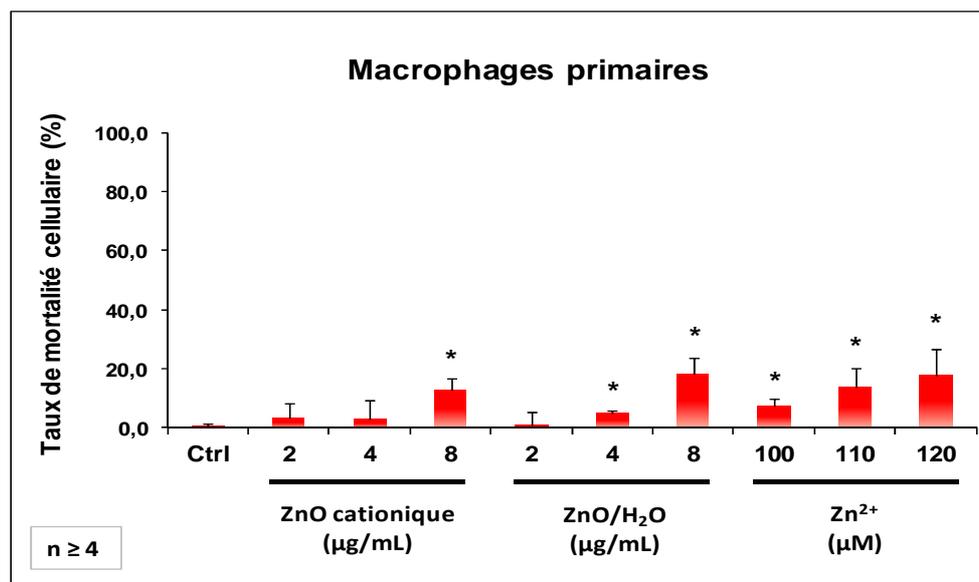


Figure 76 : Cytotoxicité du zinc (NP et ions) sur les macrophages primaires de souris. Les cellules ont été exposées pendant 24h à différentes doses de ZnO cationique, ZnO/H₂O et ions Zn^{2+} . Le taux de mortalité a ensuite été déterminé par test d'exclusion au Bleu de Trypan. Significativité statistique : * pour $p \leq 0,05$, selon le test non paramétrique de Mann et Whitney.

Les résultats (Figure 76) montrent que les cellules primaires ont la même sensibilité que les lignées vis-à-vis du ZnO/H₂O (DL20 identique à 8 µg/mL), mais sont moins sensibles vis-à-vis du ZnO cationique, pour lequel la DL20 semble également se situer ici vers la dose de 8 µg/mL, soit deux fois plus élevée que celle obtenues sur les deux lignées. Ces cellules sont également légèrement plus sensibles aux ions Zn²⁺ : le taux de mortalité induit à la dose de 120 µM, équivalente à la quantité de zinc ionique qui pourrait être libérée par dissolution totale des NP, correspond bien ici à une DL20, alors que celle-ci n'était pas tout à fait atteinte sur les lignées.

Ainsi, à dose équivalente, les NP et les ions zinc ont le même degré de cytotoxicité sur les cellules primaires, ce qui suggère bien des effets équivalents des ions et des NP comme cela a été largement observé au cours de l'analyse protéomique et des analyses ciblées sur les lignées. Les différences de sensibilité peuvent s'expliquer là encore par les différences physiologiques entre les cellules primaires et les lignées, et notamment par l'origine tumorale de ces dernières.

2.5.2. Effets du zinc sur la capacité phagocytaire

De même que sur les lignées, la capacité phagocytaire des cellules en présence de zinc a été analysée par cytométrie en flux. Pour cela, les macrophages primaires ont été exposés aux NP et aux ions, puis mis en présence de billes de 1 µm, dont la fluorescence a ensuite été mesurée. Ces tests ont été réalisés selon les mêmes conditions expérimentales que pour les lignées (avec désorption au D-sorbitol pour limiter le bruit de fond). Les résultats de ces tests sont présentés sur la Figure 77.

Comme pour les lignées RAW 264.7 et J774A.1, la désorption au D-sorbitol a permis de travailler ici avec un bruit de fond limité, bien que celui-ci soit légèrement plus élevé que sur les lignées (de 5 à 8% d'adsorption, données non présentées ici). Comme expliqué dans le cas du cuivre, ceci pourrait être lié aux fortes capacités d'adhésion des cellules primaires, qui favoriseraient les interactions entre les cellules et les billes pré-incubées dans du sérum. Néanmoins, on peut considérer que cette valeur reste raisonnable, d'autant plus que le taux de phagocytose des cellules non traitées est lui aussi plus élevé (généralement supérieur à 80 %).

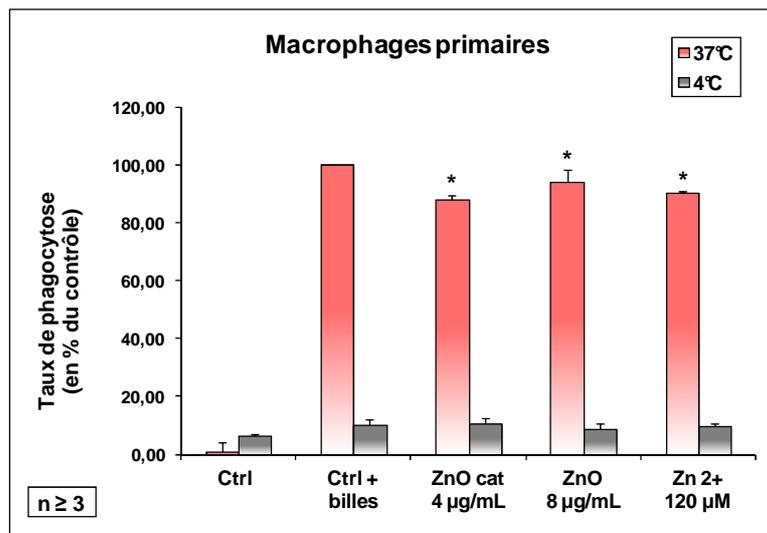


Figure 77 : Effets du zinc sur la capacité phagocytaire des macrophages primaires. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à leur DL20, puis mises en présence de billes fluorescentes pendant 2h à 37°C ou à 4°C. La fluorescence des billes internalisées (cellules vivantes) a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). Le taux de phagocytose moyen dans les différentes conditions est exprimé en pourcentage du contrôle à 37°C. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Comme observé sur les lignées, l'exposition des cellules aux deux NP et aux ions, à des doses qui sont équivalentes, n'induit pas de diminution marquée de la phagocytose : bien qu'elle soit statistiquement significative ($p \leq 0,05$), la perte de capacité phagocytaire n'est de l'ordre que de 5 à 10 % selon les cas (Figure 77). L'ensemble de ces résultats confirme donc ceux obtenus sur les lignées, et valident ainsi les observations de l'analyse protéomique : on peut désormais conclure que les NP de zinc et les ions Zn^{2+} induisent des modifications légères au niveau des protéines du cytosquelette (formes modifiées, non majoritaires, et surtout impliquées de façon indirecte dans les mécanismes de phagocytose). L'ampleur de ces modifications à l'échelle moléculaire s'avère cependant insuffisante pour affecter la capacité phagocytaire des macrophages, et par extension, altérer les défenses immunitaires innées.

2.5.3. Effets du zinc sur le glutathion

De même que sur les lignées, les niveaux de glutathion réduit intracellulaire des cellules en présence de zinc ont été analysés par cytométrie en flux. Pour cela, les macrophages primaires ont été exposés aux NP et aux ions, puis marqués au monochlorobimane (MCB), dont la fluorescence a ensuite été mesurée. Ces tests ont été réalisés selon les mêmes conditions expérimentales que pour les lignées, et les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 78.

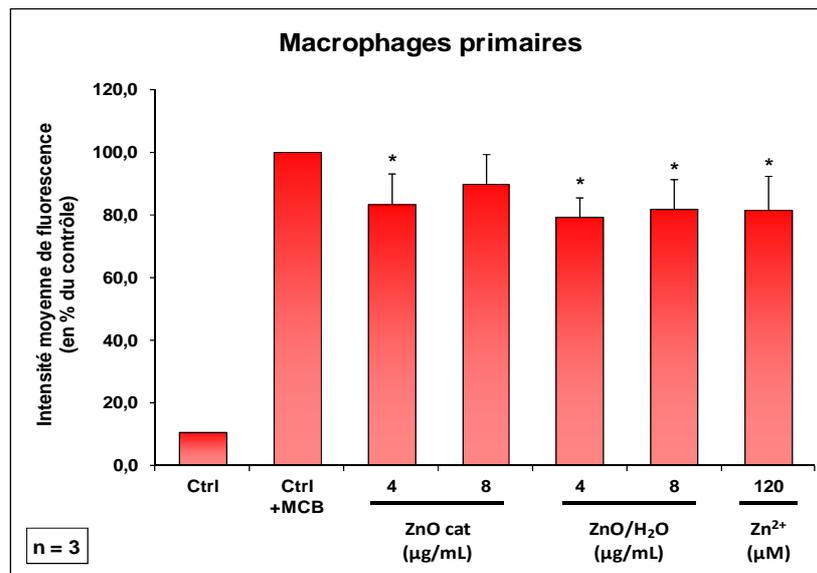


Figure 78 : Effets du zinc sur le glutathion réduit intracellulaire des macrophages primaires. Les cellules ont été traitées pendant 24h aux NP ou aux ions à différentes doses, puis marquées au MCB pendant 5 minutes à 37°C. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au MoFlo (Excitation/Emission : 350/450 nm). L'intensité de fluorescence moyenne dans les différentes conditions est exprimée en pourcentage du contrôle. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Comme observé sur les lignées, l'exposition des cellules aux deux NP et aux ions, à des doses qui sont équivalentes, n'induit pas de diminution marquée du niveau de GSH intracellulaire. En effet, bien qu'elle soit globalement significative sur le plan statistique ($p \leq 0,05$) et légèrement plus marquée que sur les lignées, ce qui est cohérent avec la sensibilité accrue des cellules primaires, cette diminution est de même ampleur avec les différentes conditions, et reste de l'ordre de 10 à 20 % selon les cas (Figure 78).

L'ensemble de ces résultats confirment donc ceux obtenus sur les lignées, et valident ainsi les observations de l'analyse protéomique : on peut désormais conclure que les NP de zinc et les ions Zn^{2+} induisent des

modifications légères au niveau des protéines de réponse au stress oxydant (essentiellement une induction de la GCLM pour augmenter la synthèse *de novo* de glutathion), traduisant un stress oxydant peu intense. L'ampleur de ces modifications à l'échelle moléculaire s'avère en effet suffisante pour compenser et contrôler rapidement le stress induit et maintenir des niveaux relativement stables de GSH, et ne justifie donc pas la mise en place d'autres mécanismes de réponse oxydante, qui feraient intervenir des protéines supplémentaires classiques de ce type de réponse.

2.5.4. Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

Comme pour les lignées, les variations éventuelles du potentiel transmembranaire mitochondrial ont été évaluées sur des macrophages primaires, par le test basé sur l'internalisation de rhodamine 123 par les mitochondries. La Figure 79 présente la synthèse des résultats obtenus.

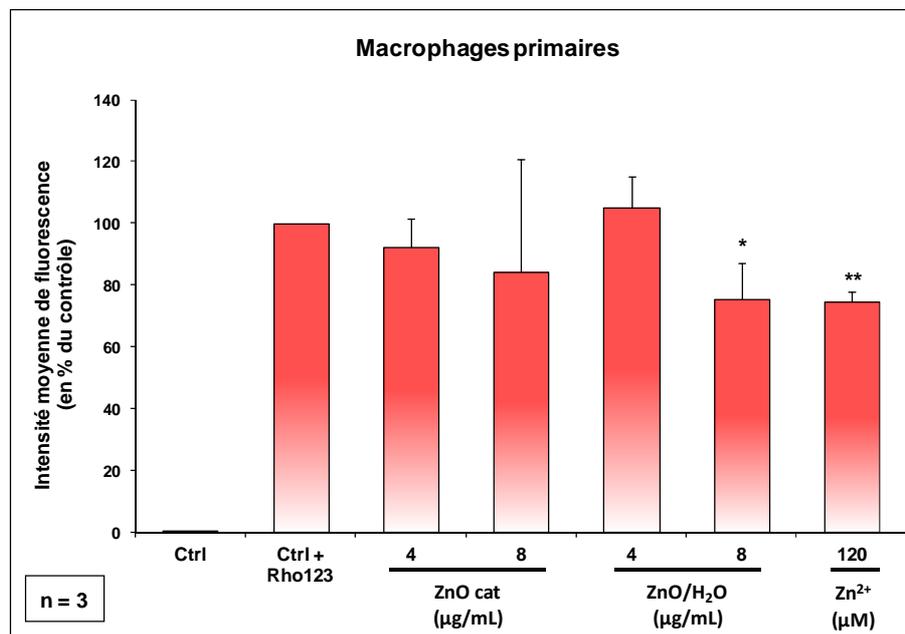


Figure 79 : Effets du zinc sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des macrophages primaires. Les cellules ont été traitées pendant 24h au ZnO cationique, ZnO/H₂O ou aux ions à différentes doses, puis marquées à la rhodamine 123 pendant 30 minutes à 37°C. La fluorescence des cellules vivantes a été mesurée au FACScalibur (filtres FITC). L'intensité moyenne de fluorescence dans les différentes conditions est exprimée en pourcentage du contrôle. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

On constate tout d'abord que, contrairement aux lignées, l'intensité de fluorescence, et donc le potentiel transmembranaire mitochondrial, n'a pas tendance à augmenter en présence de zinc, qu'il soit sous forme d'ions ou de NP : le potentiel est soit stable, soit légèrement diminué (Figure 79). Le ZnO cationique induit une diminution moyenne légère et non significative de ce potentiel à la DL20 (8 µg/mL). La diminution est également observée avec le ZnO/H₂O et les ions Zn²⁺ à dose équivalente, de façon un peu plus marquée (jusqu'à 25% de diminution) et significative.

Cependant, il s'agit ici de diminutions relativement faibles, et l'on peut donc considérer que ces données sont cohérentes avec celles obtenues sur les lignées et au cours de l'analyse protéomique : les modifications peu nombreuses au niveau protéique induites par le zinc ne sont donc pas suffisantes pour affecter la fonction mitochondriale et induire des variations du potentiel transmembranaire associé. Ceci semble cohérent dans la mesure où les protéines modifiées ne sont pas impliquées dans les mécanismes de transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane mitochondriale (chaîne respiratoire), dont dépend fortement ce potentiel.

2.5.5. Effets du zinc sur la production de NO

Afin de valider les observations de l'analyse protéomique et des tests ciblés sur les lignées, nous avons aussi évalué les effets du zinc sur la capacité des macrophages primaires à produire du NO, médiateur pro-inflammatoire essentiel à la réponse des cellules à la stimulation exogène par du LPS bactérien. Les cellules ont donc été exposées au ZnO cationique, ZnO/H₂O, et Zn²⁺, puis stimulées au LPS. Le NO produit et sécrété dans le milieu de culture a ensuite été dosé par la méthode de Griess, selon les mêmes conditions expérimentales que sur les lignées. Les résultats de ce test sont présentés sur la Figure 80.

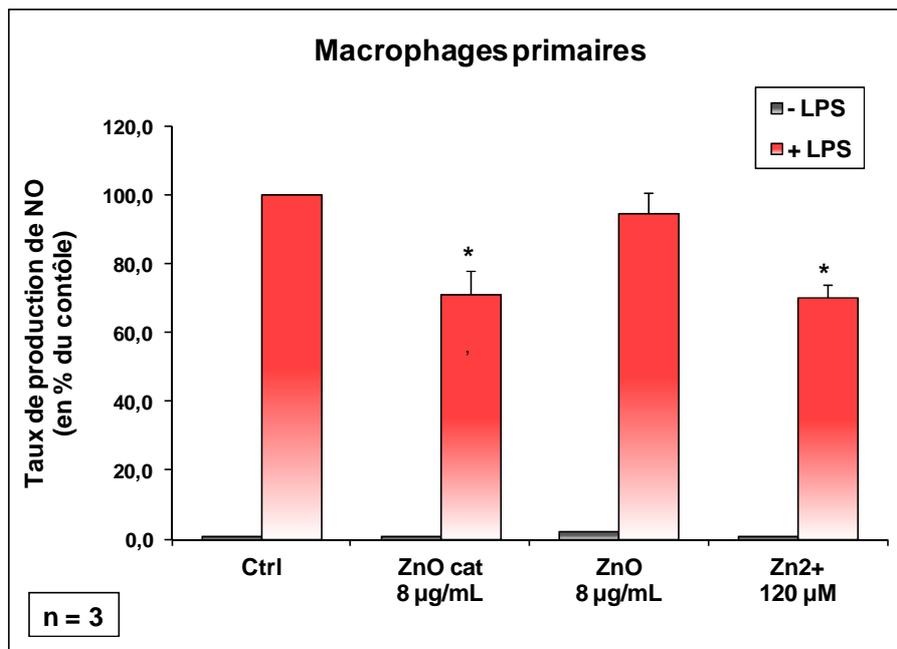


Figure 80 : Effets du zinc sur la production de NO par les macrophages primaires. Les cellules ont été traitées ou non pendant 24h à 37°C aux NP ou aux ions à leur DL20, puis stimulées ou non pendant 24h à 37°C au LPS (1 µg/mL) en présence d'arginine (5 mM). Le NO sécrété dans le milieu de culture a été dosé par incubation du surnageant avec un volume équivalent de réactif de Griess pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe formé a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm, contre une gamme de nitrite de sodium (NaNO₂). Le taux de production de NO dans les différentes conditions est exprimé en pourcentage du contrôle stimulé. Significativité statistique selon le test non paramétrique de Mann et Whitney : * $p \leq 0,05$.

Ces tests montrent que les cellules primaires sont une fois encore plus sensibles que les lignées aux NP : on observe ici une diminution significative de la production de NO après exposition au ZnO cationique. Cependant, celle-ci reste de l'ordre de 25 à 30 %, ce qui est nettement inférieur à la diminution observée avec les ions sur les lignées, et aucune diminution significative n'est observée avec le ZnO/H₂O. On peut considérer ici que les effets du zinc sur la production de ce médiateur inflammatoire sont relativement modérés, et que les cellules sont en mesure de les compenser. A l'inverse, les effets des ions sont ici nettement moins marqués que sur les lignées, et du même ordre de grandeur que ceux du ZnO cationique, à des doses qui sont ici équivalentes. Ce résultat est surprenant, compte tenu de la sensibilité généralement accrue des cellules primaires, mais il est envisageable que la différence observée soit liée à des différences physiologiques entre les cellules primaires et les lignées.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse protéomique et du dosage ciblé du NO, à la fois sur les lignées et sur les macrophages primaires suggère que le zinc sous forme nanoparticulaire pourrait affecter de façon très modérée la production de médiateurs inflammatoires. Néanmoins, ces effets pourraient être essentiellement liés à la fraction ionique issue de la dissolution intracellulaire importante de ces particules, les effets des ions étant plus marqués, et déjà documentés dans la littérature (Pluth, M.D., *et al.*, 2011).

2.5.6. Effets du zinc sur le métabolisme : dosage du pyruvate

Comme pour la lignée RAW 264.7, les effets du zinc sur la production de pyruvate par les macrophages primaires ont également été évalués, afin de confirmer encore et de valider de façon définitive les données de l'analyse protéomique. Les cellules ont donc été exposées aux NP et aux ions, puis lysées. Le pyruvate produit a été dosé par voie enzymatique, dont la réaction conduit à la formation d'un composé coloré de façon proportionnelle à la quantité de pyruvate présent dans l'échantillon. Pour des raisons de temps et de quantité de matériel biologique et de réactifs enzymatiques disponibles, ce test n'a été réalisé qu'une seule fois. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés sur la Figure 81.

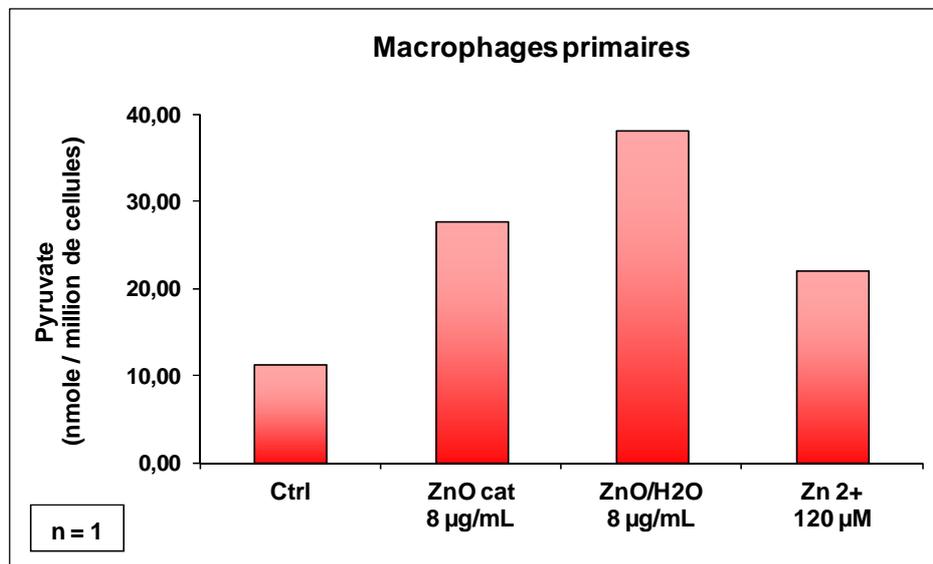


Figure 81 : Effet du zinc sur la production de pyruvate par les macrophages primaires. Les cellules ont été exposées pendant 24h à 37°C aux NP et aux ions à leur DL20 respective, puis récoltées et lysées. La quantité de pyruvate produit a été déterminée par voie enzymatique. L'absorbance du composé coloré formé, proportionnel au pyruvate présent dans l'échantillon, a été mesurée à 560 nm. La quantité de pyruvate a été exprimée en fonction de la quantité de cellules dans l'échantillon.

Comme sur la lignée RAW 264.7, on constate que la production de pyruvate est augmentée à la fois avec les deux NP de ZnO et avec les ions Zn^{2+} , et selon les mêmes tendances : l'augmentation est ici d'un facteur au moins égal à 2, et jusqu'à 4 dans le cas du ZnO/H₂O. Ces données préliminaires sont donc parfaitement en accord avec celles obtenues sur les cellules de la lignée RAW 264.7.

L'ensemble de ces résultats confirment donc que le zinc, quelle que soit sa forme (NP ou ion), induit un stress pour les cellules, auquel elles répondent majoritairement par une sur-activation de leur métabolisme central. Cette production augmentée de pyruvate peut notamment être utilisée pour répondre à l'augmentation des besoins énergétiques des cellules, leur permettant de compenser le stress induit par l'exposition au zinc.

2.6. Bilan sur l'oxyde de zinc

Au cours de cette étude, deux types de NP de ZnO utilisées, l'une étant obtenue sous forme de dispersion commerciale, et l'autre sous forme de poudre dont la dispersion en solution aqueuse ne nécessite pas d'agent d'enrobage. Les deux types de NP forment des agrégats de l'ordre de 200 à 250 nm, que les macrophages sont capables d'internaliser, et de dissoudre par des voies de dégradation intracellulaire, jusqu'à atteindre des particules de l'ordre de 25 à 30 nm. Ces NP présentent alors une toxicité à des doses relativement faibles (4 et 8 µg/mL), notamment par rapport à d'autres types de NP métalliques (TiO₂).

L'approche protéomique a ici mis en évidence certains des mécanismes moléculaires expliquant cette toxicité. En particulier, nous avons montré que des effets moléculaires sont essentiellement observés avec le zinc sous forme ionique (120 µM), alors que les effets des NP, à dose équivalente, sont très restreints. On note surtout une sur-activation du métabolisme central, permettant de compenser l'augmentation des besoins énergétiques liés au stress, ainsi que quelques modifications légères des voies d'internalisation et de dégradation intracellulaire, traduisant un effort des cellules pour compenser les effets induits, ce qu'elles semblent pouvoir réaliser. En effet, le zinc n'induit pas de stress oxydant intense pour les cellules, les niveaux de glutathion intracellulaire restant stables, et les effets au niveau mitochondrial sont limités, ne concernant que quelques protéines non membranaires, et n'induisant donc pas de variations du potentiel associé. De même, les capacités phagocytaires et la production de NO sont faiblement affectées. Ces effets modérés s'expliquent notamment par le fait que les modifications correspondantes concernent souvent des formes modifiées minoritaires de protéines dont les formes majoritaires restent inchangées. De plus, les effets observés ici sont peu spécifiques, puisque plusieurs des protéines identifiées dans les différentes voies font partie du « déjà vu » classique en protéomique.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la toxicité du zinc à l'échelle moléculaire est essentiellement liée aux nombreuses interactions de la forme ionique avec un grand nombre de protéines et de constituants cellulaires. Ces interactions semblent être compensées par les cellules, jusqu'à un certain seuil, relativement bas, au-delà duquel les perturbations du fonctionnement normal des protéines conduisent directement à la mort cellulaire.

DISCUSSION

GENERALE

Les travaux présentés ici portaient sur l'étude de NP de cuivre (Cu), oxyde de cuivre (CuO) et oxyde de zinc (ZnO), par une approche protéomique, combinée à plusieurs approches complémentaires de biologie cellulaire, biochimie, ou encore cytométrie en flux, nécessaires à la validation et à l'approfondissement des hypothèses dégagées par l'analyse protéomique. Compte tenu de l'obtention des NP sous forme de poudre, l'étude a commencé par l'optimisation des conditions de dispersion des NP en suspension, afin de pouvoir traiter ensuite les cellules avec des suspensions de concentrations connues, homogènes, et stables pour assurer la reproductibilité des conditions d'exposition.

1. NANOPARTICULES ET CYTOTOXICITE

1.1. Dispersion et caractérisation

Bien que les concentrations des différentes suspensions soient identiques (50 mg/mL), aucune des conditions de dispersion testées n'a permis d'obtenir des particules de dimension inférieure à 100 nm, qu'il s'agisse du cuivre ou du zinc : dans les deux cas, nous avons obtenu des NP de même taille minimale, soit 200 à 250 nm de diamètre moyen, dimensions confirmées à la fois par DLS et par microscopie électronique. Dans le cas du zinc, nous avons également étudié une dispersion commerciale qui, après dilution dans les milieux de culture, fournit des NP de 150 à 200 nm de diamètre, donc du même ordre de grandeur que celles citées ci-dessus. Bien que ces dimensions ne correspondent pas à la définition des NP au sens strict, l'agrégation minimale reste un phénomène courant dans la littérature, et inévitable.

Une différence notable entre les NP à base de cuivre et celles à base de zinc, est la nécessité d'employer un agent stabilisateur dans le premier cas (PVP40), qui permet d'améliorer considérablement la dispersion et la taille minimale des agrégats de NP, alors qu'un tel composé n'a pas été nécessaire dans le cas des NP de ZnO (dispersion en eau seule). La dispersion commerciale, quant à elle, contient d'après le fournisseur un agent dispersant de type silane (cationique). La littérature confirme que la présence d'agents d'enrobage permet d'améliorer la dispersion des NP, en particulier avec le cuivre, alors que plusieurs groupes ont travaillé avec du ZnO également non enrobé. De plus, l'utilisation de ce type de composés peut être remise

en question, dans la mesure où ils pourraient soit masquer soit, au contraire, potentialiser les effets réels des NP (Horie, M., *et al.*, 2009 ; Yin, H., *et al.*, 2010 ; Chang, Y.N., *et al.*, 2012). Cependant, sans la présence de PVP40, il aurait été impossible d'obtenir des suspensions dispersées de NP de cuivre. En outre, la toxicité intrinsèque du PVP40 a été évaluée par ailleurs au sein du laboratoire, et il a été montré qu'elle était inexistante (résultats non présentés ici).

A l'exception de la dispersion cationique, l'analyse des suspensions de NP obtenues a montré par ailleurs qu'elles sont toutes stables sur une période de 6 à 8 semaines seulement, au-delà desquelles les particules s'agglomèrent, imposant donc la préparation régulière de nouvelles suspensions. Ceci constitue une des difficultés majeures des NP, et peut aussi être source de variabilité tout au long de l'étude si les paramètres des NP ne sont pas contrôlés fréquemment.

Les analyses par microscopie ont également montré que les NP de cuivre et de zinc ont des formes relativement proches (globalement sphériques, à l'exception du CuO), et ont de plus permis de visualiser des particules de ZnO internalisées par les cellules, et apparaissant encore intactes. Or, l'internalisation des NP semble jouer un rôle majeur dans leurs effets toxiques potentiels. Ceci est d'autant plus important lorsque le modèle d'étude est un type cellulaire dont l'une des fonctions principales consiste à internaliser tout corps reconnu comme étranger à l'organisme, tel que les macrophages.

Par ailleurs, le dosage de la fraction ionique issue de la dissolution des NP dans les milieux de culture cellulaire a montré des taux de dissolution proches et importants à la fois pour le cuivre (60%) et le zinc (80%), valeurs supportées par la littérature. Cependant, dans les deux cas, les effets de cette fraction dissoute restent difficiles à déterminer. De plus, les données de la littérature sur ce point divergent fortement. C'est pourquoi la comparaison des effets des NP avec ceux d'ions correspondants demeure importante, de même que l'estimation de la fraction ionique libérée par les NP dans les cellules après internalisation, lorsqu'il est possible d'y accéder.

1.2. Cytotoxicité du cuivre et du zinc

L'évaluation de la cytotoxicité des NP de cuivre et de zinc a été faite sur les mêmes lignées cellulaires, dans des conditions d'exposition et de mesure identiques, grâce au test d'exclusion de colorant au Bleu de Trypan. Ce dernier pouvant être remis en cause, d'autres tests sont plus fréquemment utilisés (MTT, rouge neutre, iodure de propidium...), et la littérature montre que les résultats obtenus peuvent varier selon le type de test choisi. De plus, le test au Bleu de Trypan nécessite la récolte des cellules, pouvant elle-même induire de la mortalité cellulaire. Cependant, malgré ces éléments, les tests par exclusion de colorant sont aussi les seuls tests de viabilité qui soient insensibles à la présence des NP, la pénétration du colorant dans les cellules n'étant liée qu'au degré de perméabilité des membranes. Ainsi, seule l'adsorption des NP en excès en surface des cellules pourrait éventuellement bloquer l'entrée du colorant. Or, l'analyse par microscopie montre que les NP sont internalisées et non adsorbées en surface des cellules. Enfin, ce type de test reste l'un des plus simples à mettre en œuvre, et la variabilité n'est généralement liée qu'à l'opérateur. C'est pourquoi il a été choisi et maintenu dans ces travaux.

Les tests de viabilité ont été réalisés avec les suspensions de Cu/PVP40, CuO/PVP40, ZnO/H₂O et ZnO cationique, qui sont toutes de concentration initiale identique, et dont les dimensions, la forme, l'homogénéité et la stabilité sont proches, à l'exception de la dispersion ZnO commerciale, pour laquelle on ne dispose que d'une quantité restreinte d'informations. On pouvait donc supposer, pour les nanopoudres, que les effets sur les cellules seraient similaires. En effet, les DL20 observées étaient du même ordre de grandeur : 10 µg/mL pour Cu et CuO, et 8 µg/mL pour ZnO. Ceci pouvait suggérer des effets proches lors de l'analyse protéomique et des essais ciblés. La dispersion commerciale de ZnO, quant à elle, donne une DL20 de 4 µg/mL, que nous avons supposé liée à l'agent d'enrobage cationique, seule différence réelle entre cette suspension et celle que nous avons préparée à partir de la nanopoudre. On pouvait donc supposer ici que les variations observées par analyse protéomique et tests fonctionnels seraient différents.

2. ANALYSE PROTEOMIQUE : COMPARAISON DES EFFETS DU CUIVRE ET DU ZINC

2.1. Analyse globale

L'analyse protéomique a été conduite de la même façon avec les deux types de NP et les ions correspondants. Sur un plan quantitatif, l'analyse globale des résultats a montré que l'approche utilisée ici permettait de détecter dans les deux études environ 2000 protéines, parmi lesquelles environ 3% sont affectées. Ces valeurs proches entre les différentes analyses rendent compte de la bonne reproductibilité de la méthode choisie ici (électrophorèse 2D), paramètre indispensable dans le cadre d'études toxicologiques. De plus, la proportion de variations obtenue justifie le choix de la DL20 dans ces analyses, et suggère que la faible quantité de modifications observées est bien liée uniquement aux traitements appliqués sur les cellules, et non à la mortalité cellulaire.

De plus, étant du même ordre de grandeur entre le cuivre et le zinc, nos données suggèrent donc une réponse des cellules de même ampleur vis-à-vis des deux métaux, corroborée une fois encore par la cytotoxicité similaire observée dans les tests de viabilité entre les NP de Cu/CuO (10 µg/mL) d'une part et les NP de ZnO/H₂O (8 µg/mL) d'autre part. En revanche, les NP de ZnO cationique, dont la DL20 était deux fois inférieure à celle du ZnO/H₂O, étaient supposées affecter le protéome de façon plus importante que ce dernier. Or, l'analyse montre que ce n'est pas le cas, du moins en termes de quantité de variations totales induites, qui sont proches entre les deux NP, suggérant plutôt des effets d'intensité comparable.

Par ailleurs, il apparaît clair que les ions Zn²⁺ ont des effets plus marqués en protéomique que les ions Cu²⁺ (quantité plus élevée de protéines modifiées), ce qui était également visible sur les tests de viabilité. En effet, pour les deux métaux, la DL20 choisie correspond à la quantité totale de cuivre ou de zinc ionique que l'on obtiendrait à partir de la dissolution totale des NP, ce qui correspond également à une dose plus faible en zinc qu'en cuivre. Or, les tests de viabilité montrent qu'à cette dose les ions Zn²⁺ induisent une mortalité cellulaire proche de celle induite par les NP ZnO/H₂O, alors que celle induite par les ions Cu²⁺ est plus faible que celle induite par les NP de Cu/CuO. L'analyse protéomique sur le cuivre a également montré

que, même à doses équivalentes, les ions n'ont que très peu d'effets par rapport aux NP, ce qui n'est pas le cas pour le zinc.

Cette différence importante entre ions cuivre et ions zinc peut s'expliquer par le fait que le zinc est un élément essentiel pour l'organisme (2^{ème} métal de transition le plus abondant dans l'organisme après le fer), et dont le rôle physiologique est beaucoup plus étendu que celui du cuivre, en particulier au niveau du système nerveux central mais aussi du système immunitaire (Wirth, J.J., et al., 1989 ; Keen, C.L., and M.E. Gershwin, 1990 ; Prasad, A.S., 2008 ; Prasad, A.S., 2009 ; site « Office of Dietary Supplements, National Institute of Health », 2013). En effet, tandis que le cuivre interagit essentiellement avec des protéines impliquées dans le transport de l'oxygène et la respiration cellulaire, le zinc, lui, intervient en tant qu'élément structural (protéines à doigts de zinc) ou de cofacteur pour de nombreuses protéines (protéines structurales des membranes cellulaires, divers facteurs de transcription, presque toutes les classes d'enzymes, métallothionéines,...). Il participe ainsi au métabolisme des acides nucléiques, à l'expression génique, à la signalisation, ou encore à la régulation des mécanismes antioxydants ainsi qu'au maintien de l'intégrité membranaire (Bray, T.M., and W.J. Bettger, 1990 ; Hennig, B., et al., 1996 ; Myers, S.A., et al., 2012).

Ainsi, compte tenu de ses rôles importants en tant qu'élément à la fois structural, catalytique et régulateur, le transport et l'homéostasie du zinc sont finement régulés : de nombreux transporteurs membranaires interviennent dans l'import (transporteurs ZIP), l'export (transporteurs ZnT) et la compartimentation intracellulaire du Zn²⁺ (ZnT, métallothionéines...), assurant ainsi les quantités nécessaires au fonctionnement des constituants cellulaires (Eide, D.J., 2006 ; Myers, S.A., et al., 2012). De la même manière, il existe des transporteurs membranaires permettant l'import/export (ATPases) et le trafic intracellulaire (métallothionéines, céruloplasmine, superoxyde dismutases...) de Cu²⁺ (Prohaska, J.R., and A.A. Gybina, 2004 ; Lutsenko, S., et al., 2007). Cependant, le zinc, contrairement au cuivre ou au fer, n'est pas un agent possédant des propriétés redox. On peut donc envisager ici que, lorsque les macrophages sont exposés aux ions Zn²⁺, les systèmes d'import fonctionnent à régime normal, permettant l'entrée nécessaire des ions, qui sont alors libres d'interagir avec un nombre important de constituants cellulaires,

jusqu'à induire finalement la mort cellulaire. A l'inverse, lorsqu'ils sont exposés aux ions Cu^{2+} , reconnus immédiatement comme agents toxiques et redox potentiels, les transporteurs correspondants, qui nécessitent eux-mêmes de l'énergie pour fonctionner, sont bloqués. Les ions ne pénétrant pas dans les cellules, on pourrait ainsi expliquer l'absence d'effets moléculaires et le faible taux de mortalité observés.

On peut également étendre cette hypothèse aux deux types de NP. En effet, comme cela a été montré précédemment, celles-ci sont internalisées par les cellules (phagocytose principalement), puis fortement dégradées, libérant alors une fraction ionique intracellulaire considérable. Ainsi, « l'entrée » des ions dans les cellules, pour le zinc comme pour le cuivre, se fait ici par des mécanismes détournés très différents des mécanismes d'import/export habituels, que la cellule ne peut pas empêcher et qu'elle doit alors compenser par d'autres voies. Ainsi, pour les deux métaux, on pourrait donc effectivement attribuer en partie les effets des NP aux ions issus de leur dissolution intracellulaire. Dans le cas du zinc, les ions libérés interagiraient comme précédemment avec de nombreux constituants cellulaires, perturbant peu à peu leur fonctionnement normal sans pour autant induire de fortes altérations moléculaires, et conduisant *in fine* à la mort cellulaire. Dans le cas du cuivre, la toxicité serait principalement liée aux propriétés redox de l'ion, conduisant à de fortes altérations moléculaires, puis fonctionnelles, comme observé dans ces travaux.

De façon globale, ces observations conduisent à dire que les effets observés en protéomique correspondent surtout aux effets des NP dans le cas du cuivre, et notamment du CuO , probablement via la fraction ionique libérée, alors qu'il s'agit plutôt des effets des ions dans le cas du zinc. De plus, contrairement au cuivre, les variations observées dans le cas du zinc correspondent le plus souvent à des répressions de formes protéiques, ce qui pourrait suggérer soit une toxicité directe du zinc sur les processus correspondants, empêchant leur fonctionnement normal, soit que les cellules, dans un effort de compensation des effets induits, ne se concentreraient que sur un nombre très restreint de voies métaboliques, induisant une baisse de régime sur de nombreuses autres voies. En revanche, les modifications induites par le zinc (NP et ions) concernent souvent des formes modifiées de protéines dont la/les formes majoritaires restent pour la plupart inchangées, ce qui suggère des effets plutôt modérés du zinc, alors que les effets des NP de cuivre sont en général assez marqués.

Sur le plan qualitatif global, on peut d'ores et déjà constater que les principaux processus et compartiments mis en évidence lors de l'étude du zinc sont globalement les mêmes que ceux observés avec le cuivre, ce qui pourrait aussi suggérer des réponses similaires des cellules aux deux métaux. Cependant, si l'on s'intéresse plus en détail à la nature des protéines affectées, au type de variation (induction/répression), ainsi qu'aux effets relatifs entre les NP et les ions dans les deux analyses, on constate des différences. En particulier, sur l'ensemble des modifications observées, seules 13 protéines sont communes aux deux analyses. Celles-ci sont réparties dans les différents processus mis en évidence, et sont surtout affectées par les NP dans le cas du cuivre (surtout CuO), alors que les effets des ions sont plus étendus dans le cas du zinc (Tableau XII). De plus, les variations suivent la même tendance à l'exception de celles affectant le métabolisme central, majoritairement induit par le zinc mais réprimé par le cuivre.

Nom de la protéine (anglais)	Numéro d'accèsion UniProtKb	Modification avec le cuivre / Inducteur(s)	Modification avec le zinc / Inducteur(s)
Réponse au stress oxydant			
Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	O09172	Induction / NP et ions	Induction / NP et ions
Signalisation cellulaire			
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P08752	Répression / NP et ions	Répression / Ions
Synthèse et repliement protéique			
Endoplasmic reticulum resident protein 29	P57759	Induction / NP	Répression / Ions
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (forme modifiée)	P63242	Répression / CuO	Répression / NP et ions
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (forme modifiée)	P17742	Répression / NP	Répression / ZnO/H ₂ O
Transcription factor BTF3	Q64152	Induction / Cu et ions	Induction / Ions
Métabolisme central			
Aldose reductase	P45376	Répression / CuO	Induction / ZnO/H ₂ O et ions
Alpha-enolase (forme modifiée)	P17182	Répression / CuO	Induction / NP et ions
Malate dehydrogenase, cytoplasmic (forme modifiée)	P14152	Répression / CuO	Répression / ZnO/H ₂ O et ions
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (forme modifiée)	P52480	Répression / Cu	Induction / ZnO cationique
Cytosquelette			
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q61166	Répression / CuO	Répression / Ions
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (forme modifiée)	Q99PT1	Répression / NP	Répression / Ions
Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (forme modifiée)	Q61599	Répression / NP	Répression / NP et ions

Tableau XII : Protéines modifiées de façon commune par le cuivre et le zinc.

2.2. Réponse générale des cellules au stress

La réponse générale des cellules au stress a été observée avec les deux types de métaux. Elle concerne essentiellement, de façon commune, les voies du métabolisme central, de la synthèse et du repliement protéique, de la signalisation cellulaire et, dans une moindre mesure, du cytosquelette. Or, pour ces processus, de nombreuses protéines sont classiquement identifiées en protéomique (« déjà vu » ; Petrak, J., *et al.*, 2008 ; Wang, P., *et al.*, 2009). Il était donc important et nécessaire de vérifier tout d'abord l'appartenance ou non à cette liste classique, des protéines identifiées ici. Qu'il s'agisse du cuivre ou du zinc, cette comparaison a montré que la plupart des protéines du « déjà vu » n'ont pas été identifiées dans ces travaux, et qu'à l'inverse, la plupart des protéines que nous avons identifiées ne font pas partie de cette liste classique, surtout dans le cas du cuivre. Ainsi, on peut considérer que, dans le cas du cuivre, les modifications observées correspondent bien principalement aux effets des NP, et que, dans le cas du zinc, cette réponse générale est moins spécifique, et correspond aux effets des NP mais aussi des ions.

La réponse générale des cellules est par ailleurs différente vis-à-vis des deux métaux. En effet, dans le cas du cuivre, elle consiste essentiellement en une répression plus ou moins intense de diverses protéines des voies citées ci-dessus, alors que dans le cas du zinc, on constate une induction de plusieurs formes d'enzymes de la voie de la glycolyse, associée à une légère induction de voies alternatives de production d'énergie ou à la légère répression de voies consommant les métabolites nécessaires à ces dernières, modifications non observées avec le cuivre. De plus, bien que la plupart des formes majoritaires des protéines observées avec le zinc restent inchangées, l'induction de toutes les formes de l' α -énolase, enzyme clé intervenant à la fin de la voie, renforce ici l'hypothèse de la sur-activation du métabolisme glycolytique sous l'effet du zinc. Ainsi, il paraissait intéressant de valider cette hypothèse par un test ciblé. Nous avons donc choisi ici de réaliser le dosage enzymatique du pyruvate, produit final de la glycolyse. Par ailleurs, une telle réponse n'ayant pas été observée pour le cuivre, on peut supposer que, dans ce cas, les cellules ont plutôt tendance à diminuer les activités métaboliques qui ne leur sont pas nécessaires à la lutte contre le stress.

2.3. Réponse au stress oxydant

Des réponses oxydantes ont été observées à la fois avec le cuivre et le zinc, cependant, celles-ci sont très différentes. L'étude des NP de cuivre sur la lignée RAW 264.7 a mis en évidence plusieurs protéines marqueurs du stress oxydant, telles que des formes de peroxyrédoxines, de l'hème oxygénase, ou encore d'enzymes de la voie de biosynthèse du glutathion, lui-même acteur important des défenses anti-oxydantes. L'analyse complémentaire sur la lignée J774A.1 a également mis en évidence la protéine DJ-1, également impliquée de façon indirecte dans ces défenses. L'ensemble des résultats sur les deux lignées suggèrent une réponse oxydante très forte vis-à-vis du cuivre. Or, le cuivre est un métal de transition à plusieurs états d'oxydation possibles (Cu^+ et Cu^{2+}), ce qui implique que son pouvoir en tant qu'agent de stress redox est élevé. Ainsi, la réponse observée semble cohérente avec les propriétés de ce métal, et il n'est pas surprenant qu'elle soit assez marquée (variations fortes des protéines de réponse au stress oxydant).

A l'inverse, la réponse oxydante des cellules RAW 264.7 vis-à-vis du zinc est beaucoup plus limitée : elle concerne un nombre très restreint de protéines (3), parmi lesquelles la seule commune avec le cuivre est la GCLM, sous-unité régulatrice de la première enzyme de synthèse du glutathion. On peut donc ici supposer soit que le stress oxydant induit par le zinc soit mieux contrôlé par les cellules, soit que la toxicité du zinc ne passe pas de façon majoritaire par ce type de stress, ce qui serait cohérent avec le fait que le zinc, contrairement au cuivre, n'est pas un métal à cycle redox entre formes de degrés d'oxydation différents.

De manière générale, il semble que les deux types de métaux induisent un stress oxydant auquel les cellules répondent en activant majoritairement les systèmes de défenses mettant en jeu le glutathion, et ce quelle que soit l'origine du stress induit. C'est pourquoi nous avons choisi de valider cette hypothèse sur le plan fonctionnel, par un test permettant de doser les niveaux de glutathion intracellulaire en présence de cuivre et de zinc (ions et NP). La comparaison des données entre cuivre et zinc suggérant l'induction d'un stress oxydant de façon beaucoup plus marquée dans le cas du cuivre, ceci devrait se traduire par des niveaux de glutathion intracellulaire plus constants avec le zinc.

2.4. Réponse mitochondriale

De même que pour la réponse oxydante, les réponses mitochondriales des macrophages sont très différentes vis-à-vis du zinc et du cuivre. Dans le cas des NP de cuivre, cette réponse se caractérise par des modifications touchant essentiellement des protéines membranaires (sous-unités de complexes de la chaîne respiratoire), ainsi que le facteur d'élongation mit-EF-Tu, qui participe à la synthèse de ces mêmes protéines membranaires à partir du génome mitochondrial. De telles modifications sous l'effet des NP de Cu et CuO suggèrent des perturbations importantes au niveau de la membrane mitochondriale, et en particulier du potentiel transmembranaire établi grâce à la chaîne respiratoire via le gradient de protons. De plus, la protéine DJ-1 mise en évidence sur la lignée J774A.1 semble intervenir également dans le maintien de ce potentiel. Il paraissait donc pertinent d'évaluer dans quelles mesures ce potentiel est affecté par ces deux NP, par le biais d'un test ciblé, basé ici sur l'internalisation de rhodamine 123 par les mitochondries. De plus, cette réponse est spécifique des NP de cuivre, les formes protéiques affectées n'étant globalement pas répertoriées dans le « déjà vu » classique en protéomique.

Dans le cas du zinc, les modifications ne concernent que 3 protéines, dont aucune n'est commune avec le cuivre, et dont 2 appartiennent au « déjà vu », ce qui suggère que la réponse est ici peu spécifique du zinc. Parmi ces 3 protéines, on observe une enzyme du métabolisme des alcools (ALDH), localisée dans la matrice mitochondriale, et une forme modifiée d'une protéine de structure assurant le maintien de l'intégrité des crêtes membranaires (mitofiline). Ces variations ne suggèrent pas ici de perturbations éventuelles du potentiel transmembranaire. En revanche, la modification d'une forme modifiée minoritaire d'ATP synthase a aussi été observée, la forme majoritaire ne variant pas. Cette protéine membranaire permettant la production d'ATP grâce au couplage avec le gradient de protons transmembranaire, nous avons tout de même étudié ce paramètre dans le cas des NP de ZnO et des ions Zn^{2+} . Cependant, contrairement au cuivre, on peut d'ores et déjà s'attendre ici à ce que les variations observées, si elles existent, soient minimales.

2.5. Effets sur le cytosquelette et le trafic intracellulaire

L'analyse protéomique sur les NP de cuivre et de zinc montre que les deux types de métaux affectent le cytosquelette de manière relativement similaire. En effet, bien que les protéines affectées en elles-mêmes soient parfois différentes, beaucoup concernent dans les deux cas l'assemblage ou le désassemblage des filaments d'actine et de tubuline, ce qui suggère des modifications de la structure globale des cellules sous l'effet des NP métalliques en général. De telles modifications ne sont pas surprenantes, puisque les analyses par microscopie électronique montrent que les NP sont internalisées par les cellules. Or, l'internalisation requiert en elle-même des changements structuraux importants. En outre, dans les deux analyses, la réponse peut être considérée comme spécifique, puisque peu de protéines identifiées sont associées au « déjà vu » classique.

De plus, sur un plan fonctionnel, on observe dans les deux cas plusieurs protéines ou formes modifiées de protéines impliquées de façon plus ou moins directe dans la régulation de l'assemblage des filaments d'actine dans le cadre de la phagocytose (notamment des formes modifiées minoritaires des Rho-GDI dans les deux cas, mais aussi gelsoline avec le zinc, ou encore Arp-2/3 avec le cuivre). Ceci suggère également des perturbations de ce mécanisme majeur d'internalisation, et ce avec les deux types de NP. En revanche, les modifications induites par les NP de cuivre (Arp-2/3) sont plus directement impliquées dans ces mécanismes que celles induites par les NP de zinc. Elles sont également souvent plus intenses (variations d'intensité plus fortes) et ne concernent pas uniquement des formes modifiées de protéines dont les formes majoritaires restent inchangées, comme c'est souvent le cas avec le zinc. Ceci laisse supposer que les perturbations de la phagocytose seront plus importantes dans le cas des NP de cuivre.

En revanche, les NP de zinc affectent également des processus non observés dans le cas du cuivre : les mécanismes d'endocytose et de macropinocytose. Ce dernier résultat pourrait suggérer que les cellules, après avoir internalisé les NP de ZnO, seraient capables de réorienter certains mécanismes de dégradation intracellulaire (préférentiellement vers la voie lysosomale), probablement pour tenter de limiter leurs effets toxiques à l'échelle moléculaire. Ceci corroborerait alors les hypothèses citées ci-dessus (stress oxydant mieux contrôlé, variations de potentiel mitochondrial et de capacité phagocytaire moins

intenses...), et devrait indiquer une toxicité inférieure du zinc par rapport au cuivre. Cependant, les DL20 des deux types de NP sont équivalentes, et les données de microscopie électronique montrent qu'au contraire les NP de ZnO sont moins dégradées que celles de cuivre dans les cellules (taille réduite jusqu'à 25 à 30 nm, contre 10 nm pour le cuivre). Ainsi, il s'agirait donc plutôt ici d'une toxicité spécifique du zinc vis-à-vis des processus d'endocytose/macropinocytose. On pourrait alors supposer que la dégradation du ZnO libèrerait des quantités importantes d'ions zinc, capables d'interagir avec un grand nombre de protéines, dont celles impliquées dans ces mécanismes d'internalisation, altérant ainsi leurs fonctions normales. A l'inverse, dans le cas du cuivre, les ions issus de la dégradation n'affecteraient pas ces processus, mais contribueraient à la toxicité des NP par les réponses oxydantes et mitochondriales intenses, liées en grande partie aux perturbations de l'équilibre redox des cellules.

2.6. Effets sur les voies de dégradation protéique

Des mécanismes de dégradation protéique, notamment par la voie du protéasome, ont été mis en évidence sur la lignée J774A.1 exposée au cuivre, et sur la lignée RAW 264.7 exposée au zinc. La comparaison avec la liste du « déjà vu » montre ici que ce type de réponse est majoritairement spécifique de l'exposition à ces deux métaux. De plus, bien que la nature des protéines identifiées soit différente entre les deux conditions, certains mécanismes mis en jeu sont similaires : il semblerait que certaines sous-unités régulatrices du protéasome 26S soient réprimées afin de permettre la sur-activation des sous-unités catalytiques du complexe. Or, ce dernier joue par ailleurs un rôle dans les défenses anti-oxydantes, par le biais de l'élimination de protéines oxydées pouvant être toxiques. Ces données sont donc cohérentes avec la réponse oxydante mise en place vis-à-vis des deux métaux.

Néanmoins, la réponse vis-à-vis du zinc fait aussi apparaître plusieurs enzymes impliquées dans les voies de dégradation ubiquitine-dépendantes (assemblage et désassemblage des chaînes de polyubiquitine), absentes de la réponse au cuivre sur les deux lignées. Or, ce dernier induisant des réponses plus fortes, notamment contre le stress oxydant, on aurait pu supposer au contraire que le protéasome serait plus affecté par le cuivre que par le zinc. De plus, ces protéines étant réprimées par le zinc, ceci n'est pas non plus cohérent avec une sur-activation potentielle des voies de dégradation. Cette inhibition suggère plutôt

soit des mécanismes de toxicité du zinc, et non du cuivre, vis-à-vis de ces processus, soit que le zinc interagissait plus que le cuivre avec les protéines de ces voies. Or, il semblerait que le zinc puisse effectivement être chélaté par de nombreuses enzymes des voies de dégradation protéique, induisant selon les cas leur activation ou leur inhibition (Bedford, L., *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'hypothèse d'une toxicité supérieure du zinc sur ces processus expliquerait aussi d'une part l'absence d'identification de protéines de ces voies sur la lignée RAW 264.7 exposée au cuivre, et d'autre part l'identification partielle de protéines de ces voies sur la lignée J774A.1 exposée au cuivre, celle-ci y étant visiblement plus sensible que RAW 264.7.

2.7. Autres effets observés

Quelques autres modifications isolées ont été observées en réponse au cuivre et/ou au zinc. Il semble ici intéressant de noter en particulier la répression dans les deux analyses de protéines impliquées dans le métabolisme des purines (zinc) ou la réparation de l'ADN (cuivre). Ceci suggère que les deux types de NP, et les ions dans le cas du zinc, sont capables d'induire des dommages au niveau des acides nucléiques, que les cellules ne seront pas forcément en mesure de réparer.

Par ailleurs, dans le cas du cuivre, la répression d'une enzyme favorisant les propriétés pro-inflammatoires des cellules (andénosylhomocystéinase), suggère également des perturbations de l'une des fonctions majeures des macrophages : la production de médiateurs de l'inflammation. Il apparaît donc essentiel de tester également cette fonction pour compléter l'étude réalisée. Le dosage de l'oxyde nitreux (NO) a donc aussi été réalisé dans cette optique. En revanche, aucune protéine ou enzyme impliquée dans ce type de mécanismes n'a été observée dans le cas du zinc. Le même dosage a tout de même été réalisé afin d'étudier les effets potentiels du ZnO et des ions Zn²⁺ sur la production des médiateurs de l'inflammation. Cependant, on peut s'attendre ici à ce que ces effets, s'ils existent, soient encore une fois minimes.

2.8. Bilan de l'analyse protéomique comparative

Nous avons montré que les deux types de NP métalliques étudiés ici ont des structures, des dimensions, et des degrés de cytotoxicité similaires sur les deux lignées de macrophages, suggérant des mécanismes moléculaires de toxicité proches. Cependant, la comparaison des analyses protéomiques des effets des NP de cuivre et de zinc, ainsi que des ions correspondants, montre que ces mécanismes sont pourtant très différents, et met en évidence plusieurs points intéressants :

(1) Bien que les grandes classes de compartiments et de processus cellulaires et métaboliques identifiés soient les mêmes, les protéines affectées dans ces voies sont de nature différente.

(2) La toxicité des NP de Cu et CuO se traduit essentiellement par une réponse oxydante et mitochondriale intense et spécifique, ainsi que par de potentielles perturbations des capacités phagocytaires et inflammatoires des cellules. Ces modifications sont souvent liées à des inductions de protéines impliquées de façon directe dans les processus considérés.

(3) La toxicité des NP de ZnO se traduit à l'inverse par des réponses métabolique, oxydante, mitochondriale et cytosquelettique modérées, souvent non ou peu spécifiques, et liées essentiellement à des répressions de formes protéiques modifiées minoritaires dont les formes majoritaires restent inchangées. Elles sont néanmoins associées à de fortes perturbations des voies de dégradation protéique.

(4) Les ions Cu^{2+} n'ont que très peu d'effets au niveau protéomique, et les effets observés sont majoritairement liés aux NP, tandis que les ions Zn^{2+} ont des effets beaucoup plus étendus, et les NP de ZnO ont des effets limités par rapport aux NP de cuivre.

(5) La toxicité du cuivre semble être essentiellement liée aux propriétés redox de ce métal, tandis que celle du zinc est due aux nombreuses interactions entre l'ion et les protéines, perturbant le fonctionnement normal de ces dernières.

L'ensemble des hypothèses émises grâce à l'analyse protéomique ont ensuite été approfondies et validées par le biais des différents tests fonctionnels ciblés mis en place.

3. VALIDATIONS FONCTIONNELLES : EFFETS COMPARES DU CUIVRE ET DU ZINC

Afin de valider les observations faites à l'échelle moléculaire lors des analyses protéomiques, plusieurs types de tests ciblés ont été mis en place, permettant d'évaluer les effets du cuivre et du zinc sur plusieurs paramètres fonctionnels. Ces tests sont essentiellement basés sur des techniques de cytométrie en flux, mais également de biochimie et d'enzymologie.

3.1. Effets sur la capacité phagocytaire des macrophages

La phagocytose est une fonction majeure des macrophages, leur permettant d'éliminer directement les agents pathogènes dans le cas d'une infection, et pouvant conduire, si besoin, à l'activation de l'immunité spécifique si les défenses innées s'avèrent insuffisantes. Or, les analyses protéomiques faites sur le cuivre et le zinc montrent que les deux métaux sont capables d'affecter des protéines du cytosquelette, dont certaines sont impliquées directement ou indirectement dans les mécanismes de phagocytose. Les effets du cuivre et du zinc sur cette fonction ont donc été évalués sur les lignées ainsi que sur des macrophages primaires, par mise en présence des cellules avec des billes fluorescentes de la même taille que des bactéries. La fluorescence des billes effectivement internalisées après exposition aux deux métaux, a été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont très différents entre les deux types de métaux.

Dans le cas du cuivre, les deux types de NP (surtout Cu sur les lignées, mais aussi CuO sur les macrophages primaires) induisent une diminution importante et dose-dépendante de la capacité phagocytaire des cellules, pouvant atteindre jusqu'à 60 voire 80% de perte (DL20 sur cellules primaires). De plus, cet effet est spécifique des NP, puisque les ions Cu^{2+} n'induisent aucune diminution de cette capacité, sur aucun des types cellulaires. A l'inverse, ni les NP de ZnO (cationique et poudre/ H_2O), ni les ions Zn^{2+} n'induisent de diminution marquée de la phagocytose, que ce soit sur les lignées ou sur les macrophages primaires (maximum 10% de perte sur l'ensemble des conditions).

Ces différences peuvent s'expliquer notamment par le fait que les protéines affectées par l'un et l'autre des deux métaux sont de nature différente, et ont des rôles différents vis-à-vis des mécanismes de

phagocytose. Dans le cas du cuivre, certaines des protéines affectées régulent directement ces processus (Arp-2/3 notamment), et les modifications observées sont souvent intenses. A l'inverse, le zinc affecte essentiellement des formes modifiées et souvent minoritaires de protéines impliquées de façon plus indirecte dans ces mécanismes. Ainsi, les effets plus intenses observés avec le cuivre sont cohérents, et les données issues de ce test ciblé sont parfaitement cohérentes avec celles de l'analyse protéomique comparative.

3.2. Effets sur le métabolisme du glutathion

L'analyse protéomique montre que les deux métaux induisent une réponse oxydante de la part des cellules, mettant notamment en jeu des mécanismes permettant d'augmenter leur niveau de glutathion intracellulaire pour lutter contre le stress induit. Il était donc pertinent ici de réaliser le dosage de ce composé. Celui-ci a été réalisé par cytométrie en flux, par une méthode basée sur l'emploi de monochlorobimane (MCB), composé se fixant de façon covalente et spécifique sur la forme réduite du glutathion (GSH). Là encore, les effets du cuivre et du zinc sur les niveaux de glutathion intracellulaire sont très différents.

En effet, les NP de cuivre (Cu surtout) induisent une diminution importante et dose-dépendante de la quantité de GSH intracellulaire, à la fois sur les macrophages primaires et sur les lignées, pouvant atteindre dans ce dernier cas jusqu'à 50% de perte à la DL20. Comme dans le cas de la phagocytose, il s'agit ici d'un effet spécifique des NP, les effets potentiels des ions n'étant visibles que sur les macrophages primaires, et de façon très limitée. En revanche, les niveaux de GSH sont globalement stables en présence de zinc (NP et ions), ou éventuellement légèrement augmentés (lignée RAW 264.7).

Les différences observées s'expliquent également en partie par les résultats de l'analyse protéomique : le cuivre induit une réponse oxydante beaucoup plus intense que le zinc, et faisant intervenir un nombre supérieur de protéines classiques de ce type de réponse (péroxyrédoxines, hème oxygénases, plusieurs protéines impliquées dans la synthèse du glutathion, dont la GCLM...), tandis que la réponse des cellules au zinc se limite à trois protéines, dont la GCLM, seule modification commune, fortement induite par les deux

métaux. L'intensité accrue de la réponse au cuivre s'explique elle-même par le fort caractère redox de ce métal, que le zinc ne possède pas. Ainsi, le stress plus intense induit par le cuivre nécessite de plus fortes compensations de la part des cellules (réponse protéomique plus intense), et les données de ce test ciblé sont en accord avec celles de l'analyse protéomique : qu'il s'agisse du cuivre ou du zinc, l'induction d'enzymes de synthèse du glutathion doit permettre l'augmentation des niveaux de GSH intracellulaire. Cependant, dans le cas du zinc, cette augmentation est suffisante pour permettre aux cellules de conserver des niveaux globaux de GSH stables, voire de les augmenter, tandis que dans le cas du cuivre, elle n'est pas suffisante à elle seule pour lutter contre le stress, dans la mesure où le cuivre semble lui-même avoir un effet direct sur le GSH.

Effectivement, il a déjà été montré que, en milieu intracellulaire, le cuivre (II) peut être rapidement converti en cuivre (I), espèce capable de former spontanément un complexe avec le GSH directement au niveau de la cystéine interne (Freedman, J.H., *et al.*, 1989 ; Vulpe, C.D., *and* S. Packman, 1995 ; Harris, E.D., 2000 ;). Le GSH intervient alors non seulement comme un agent protecteur contre la toxicité du cuivre en excès, mais aussi comme un transporteur potentiel du cuivre vers un certain nombre de macromolécules, parmi lesquelles les métallothionéines, les superoxyde dismutases, la céruloplasmine, etc. La formation de ce complexe induit ainsi une diminution du niveau global de GSH, comme observée sur certains modèles cellulaires après exposition au cuivre (II), et peut conduire dans certains cas à la formation de radicaux superoxydes, induisant eux-mêmes un stress oxydant supplémentaire (Speisky, H., *et al.*, 2008). De façon intéressante, il semble que le GSH, en conditions normales, participe lui-même à l'entrée de cuivre dans les cellules, un déficit en GSH étant associé à une diminution de l'import de cuivre, on peut envisager qu'en conditions normales (Maryon, E.B., *et al.*, 2013). Ainsi, dans le cas du cuivre, l'entrée des ions est favorisée par les niveaux élevés initiaux en GSH intracellulaire, puis les ions importés ou issus de la dissolution des NP complexent le GSH, réduisant ses capacités détoxifiantes, et générant potentiellement d'autres espèces oxydantes.

Les interactions du zinc avec le glutathion, quant à elles, sont moins documentées à ce jour. Néanmoins, il est établi que le zinc présente une certaine affinité pour les groupes thiols, ce qui favoriserait son

interaction avec la cystéine du GSH. Par ailleurs, il semble qu'une déficience en zinc induise une élévation du niveau de glutathion sanguin (Mills, B.J., *et al.*, 1981). De plus, le couple GSH/GSSG semble intervenir également dans la libération de zinc par les métallothionéines (MT), celle-ci étant plutôt induite par l'espèce oxydée, et inhibée par l'espèce réduite (Jiang, L.J., *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que, en présence d'un excès de zinc, les niveaux de GSH seraient diminués, induisant potentiellement à la libération de zinc à partir des MT, pouvant lui-même contribuer encore à la réduction du niveau de glutathion. Néanmoins, nos résultats démontrent que, dans le cas des macrophages, ces effets sont compensés et les niveaux de GSH restent stables, et ce probablement jusqu'à ce que la dose de zinc devienne excessive, conduisant *in fine* à la mort cellulaire.

3.3. Effets sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

L'analyse protéomique comparative sur les lignées montre que les réponses au cuivre et au zinc sont très différentes : dans le cas du cuivre, les protéines modifiées sont globalement des constituants des complexes de la chaîne respiratoire membranaires, suggérant de possibles perturbations du potentiel transmembranaire mitochondrial associé, tandis que dans le cas du zinc, la réponse est beaucoup plus limitée, et restreinte à des protéines matricielles ou structurales. Il paraissait donc intéressant ici de comparer les effets réels des deux métaux sur ce potentiel. Les variations de ce dernier ont été estimées par cytométrie en flux, permettant de mesurer la fluorescence de la rhodamine 123 après internalisation par les mitochondries : si celles-ci sont altérées, le potentiel transmembranaire est généralement diminué, et l'internalisation de rhodamine est réduite. Les données de ce test ciblé montrent que les réponses au cuivre et au zinc sont effectivement très différentes.

Dans le cas du cuivre, comme on pouvait l'envisager, les NP de CuO induisent une diminution dose-dépendante très marquée du potentiel transmembranaire mitochondrial, pouvant atteindre jusqu'à 60% à la DL20 sur les cellules primaires. Dans ces tests, on observe également un effet potentiel des ions sur les macrophages primaires. L'effet observé ici n'est donc *a priori* pas spécifique des NP de cuivre. A l'inverse, les NP de ZnO n'induisent pas de diminution marquée du potentiel : celui-ci ne diminue que de 20 à 25% à la DL20 sur les cellules primaires, et reste stable voire est augmenté sur les lignées. En revanche, comme

pour le cuivre, les ions Zn^{2+} semblent avoir un effet plus intense sur les macrophages primaires que sur les lignées, mais sans pour autant induire plus de 25% de diminution là encore.

Ainsi, les différences observées lors de l'analyse protéomique sont validées par ces tests ciblés, et l'on peut conclure ici que le cuivre (NP, et potentiellement ions) entraîne des dommages mitochondriaux importants, notamment au niveau de la chaîne respiratoire membranaire, induisant la diminution du potentiel transmembranaire associé. Le zinc, à l'inverse, ne semble pas affecter les complexes membranaires, et les effets observés sur le potentiel mitochondrial restent très modérés, traduisant le fait que le stress mitochondrial induit par le zinc est rapidement compensé par les cellules, contrairement au cuivre.

3.4. Effets sur la capacité de production du NO

La production de médiateurs tels que le NO est une autre fonction majeure des macrophages, nécessaire à la mise en place de la réponse inflammatoire et à l'activation de l'immunité adaptative pour lutter contre les attaques pathogènes. Il était donc essentiel ici de mesurer les effets du cuivre et du zinc sur la capacité des cellules à produire de tels médiateurs. Le NO produit après stimulation (LPS) de cellules préalablement exposées à l'un ou l'autre des deux métaux, a été dosé par la méthode de Griess. Dans ce cas, les effets des NP de cuivre et de zinc sont différents, mais les effets des ions correspondants présentent des similarités.

Dans le cas du cuivre (en particulier avec CuO), on observe une diminution dose-dépendante avec les deux NP, à la fois sur les lignées et surtout sur les macrophages primaires, où la production de NO diminue de 75%. Cependant, les effets des ions Cu^{2+} sont également très intenses, quel que soit le type cellulaire. Ces derniers sont associés à de possibles interactions entre les ions cuivre et le NO, et la littérature permet d'envisager qu'il s'agit plutôt ici d'une surconsommation de NO diminuant sa quantité globale, plutôt que d'une réduction du taux de production. De plus, on peut également supposer que les effets des NP de CuO sont ici en partie dus à la fraction dissoute intracellulaire. A l'inverse, la production de NO en présence de ZnO est relativement stable sur les lignées, et légèrement diminuée sur les cellules primaires. Comme dans le cas du cuivre, les ions Zn^{2+} induisent également une forte diminution de la production de NO, et la

littérature suggère qu'il s'agit ici effectivement d'une réduction liée à l'inhibition des enzymes de synthèse du NO, dans le cadre d'une réponse anti-inflammatoire.

Ainsi, dans le cas du cuivre, la capacité de réponse inflammatoire est fortement altérée, à la fois par les NP et les ions, tandis que dans le cas du zinc, seuls les ions affectent cette fonction. Les mécanismes des deux types d'ions sont ici visiblement différents, mais conduisent tous deux à la perte de NO, qui joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Par ailleurs, l'absence d'effets des NP de zinc et l'existence d'effets des NP de cuivre sont en accord avec les analyses protéomiques : les NP de cuivre semblent affecter certaines protéines impliquées dans le maintien des propriétés pro-inflammatoires, tandis qu'aucune modification de ce type n'est observé avec les NP de zinc.

3.5. Effets sur la production de pyruvate

L'analyse protéomique a montré des différences importantes entre le cuivre et le zinc en termes de réponse générale au stress : le zinc semble induire de façon spécifique l'activation du métabolisme central, notamment par la voie de la glycolyse, tandis que le cuivre entraîne plutôt la répression de plusieurs protéines du métabolisme souvent classiquement identifiées (« déjà vu »), suggérant plutôt une baisse de régime des processus correspondants, que l'on suppose nécessaire pour permettre aux cellules de se concentrer sur les stress oxydant et mitochondrial, beaucoup plus intenses avec ce métal.

Ainsi, dans le cas du zinc, l'activation de la glycolyse a été validée par le dosage enzymatique direct du pyruvate, produit final de cette voie, qui met effectivement en évidence une très forte augmentation de la quantité de pyruvate produit en présence de zinc), à la fois sur les lignées et sur les macrophages primaires (production multipliée par 2 à 4 selon le type cellulaire). Cette réponse constitue la plus intense de celles observées en présence de zinc, et n'est pas spécifique des NP, puisqu'elle est également induite par les ions Zn^{2+} .

CONCLUSIONS
GENERALES
et PERSPECTIVES

L'objectif des travaux de thèse présentés ici était d'analyser les effets de deux types de NP métalliques sur un modèle cellulaire de type macrophage murin : des NP à base de cuivre (Cu et CuO), et des NP de ZnO, couramment employées pour diverses applications industrielles, et, dans le cas du ZnO, pour la fabrication de produits de consommation courante tels que les écrans solaires. Pour cette étude, une approche de type protéomique a été choisie, basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse, et les données obtenues ont été validées par différents types de tests ciblés, basés sur la cytométrie en flux, la biochimie, ou encore l'enzymologie.

Par ces approches, nous avons ici montré que les deux types de métaux, voisins dans la classification périodique, forment des NP de dimensions et de structure proches, et dont le degré de cytotoxicité sur les macrophages sont similaires (DL20 du même ordre de grandeur, et relativement faible par rapport à d'autres types de NP métalliques, telles que TiO₂). Néanmoins, malgré ces similarités, les effets toxiques observés à l'échelle moléculaire et fonctionnelle sont très différents.

D'après nos résultats, la toxicité moléculaire des NP de Cu et CuO se traduit principalement par une réponse oxydante et mitochondriale intense, ainsi que par des atteintes au niveau de protéines du cytosquelette directement nécessaires aux mécanismes d'internalisation par phagocytose. Effectivement, les tests ciblés complémentaires montrent que ces NP induisent une réduction du niveau de glutathion intracellulaire, nécessaire à la réponse anti-oxydante, mais aussi une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, traduisant des dommages importants au niveau de cet organelle, ainsi qu'une forte réduction de la capacité des macrophages à phagocyter et à produire du NO, deux fonctions essentielles de ce type cellulaire contribuant à leur rôle dans l'immunité innée. Les différents effets observés, à la fois dans l'analyse protéomique et dans les tests ciblés, sont généralement spécifiques de la forme nanoparticulaire du cuivre, les ions Cu²⁺ n'ayant globalement que très peu d'effets.

A l'inverse, le zinc, qu'il soit sous forme nanoparticulaire ou ionique, induit des effets moléculaires modérés, traduits par une réponse oxydante, mitochondriale et cytosquelettique différente et beaucoup moins intense que les NP de cuivre. Les effets fonctionnels résultants sont effectivement limités, et l'on a pu montrer que ces NP n'altèrent ni le métabolisme du glutathion, ni le potentiel mitochondrial, ni la

capacité des cellules à phagocyter ou à produire du NO, ou alors de façon très modérée par rapport à ce qui est observé sous l'effet des NP de cuivre. La réponse la plus intense à ce second type de NP réside en l'activation du métabolisme central, validée par un dosage ciblé du pyruvate. Néanmoins, ce type de réponse est considéré classiquement comme une réponse générale au stress, bien que les protéines affectées ici ne fasse pas partie de celles fréquemment identifiées en protéomique.

Ainsi, l'approche protéomique a permis ici de dégager des hypothèses sur les mécanismes moléculaires de la toxicité des deux types de NP, et des ions correspondants, et ainsi de mieux comprendre cette toxicité. La comparaison des effets du zinc et du cuivre suggère que, lorsque les cellules sont exposées au cuivre, elles subissent énormément de dommages moléculaires, altérant les grandes fonctions des macrophages et conduisant à leur mort rapide, tandis que lorsqu'elles sont exposées au zinc, elles subissent un nombre restreint de dommages, qu'elles arrivent à compenser et qui n'altèrent donc pas les fonctions principales de ce type cellulaire. Ainsi, contrairement au cuivre, la toxicité du ZnO se limite essentiellement à l'induction de la mort cellulaire au-delà d'une certaine dose. A l'inverse, dans le cas du cuivre, le stress oxydant intense semble être une contribution majeure à la toxicité des NP, ce qui semble cohérent dans la mesure où celui-ci, contrairement au zinc, peut perturber l'équilibre redox des cellules.

Par ailleurs, la plupart des essais ciblés réalisés dans le cadre de ces travaux ont permis de valider les observations de l'analyse protéomique. Néanmoins, certaines réponses moléculaires mériteraient d'être également approfondies. A titre d'exemples, la toxicité des deux types de métaux sur les processus de dégradation protéique pourrait être confirmée par exposition des cellules au cuivre et au zinc après traitement préalable par des inhibiteurs du protéasome, afin d'évaluer la capacité des cellules à gérer le stress induit dans ces conditions. De même, les éventuels dommages subis par les acides nucléiques, suggérés dans les deux analyses et en particulier avec le cuivre, peuvent être analysés par des techniques de biologie moléculaire, telles que le test des comètes. Ce type de test a été réalisé récemment, et les données préliminaires suggèrent effectivement l'augmentation de la quantité de cassures des brins d'ADN, en particulier dans le cas du cuivre. Néanmoins, la confirmation de ces données reste nécessaire.

Sur le plan fonctionnel, compte tenu des effets observés sur la production de NO, en particulier avec le cuivre, il serait intéressant d'approfondir l'étude, en évaluant les effets des deux métaux à l'échelle génomique et/ou transcriptomique, en ciblant des gènes impliqués dans les mécanismes inflammatoires, tels que les gènes des enzymes de synthèse du NO (iNOS), ou encore des gènes d'interleukines. Dans cette optique, des expériences de RT-qPCR ont été envisagées, pour lesquelles des amorces ont déjà été préparées (IL-6, iNOS). La réalisation de ces tests est actuellement en cours, et pourrait encore être approfondie elle-même par le dosage d'autres médiateurs de l'inflammation (cytokines), par exemple avec des tests de type ELISA.

Enfin, compte tenu des nombreux éléments mécanistiques fournis par les approches employées dans ces travaux, on peut facilement envisager de mener le même type d'étude sur d'autres types de NP métalliques et/ou d'autres modèles cellulaires. Dans ce cadre, plusieurs autres études sont actuellement en cours au sein du laboratoire. L'ensemble des données fournies par ces différents travaux contribuera à mieux comprendre les mécanismes de toxicité des NP métalliques, et devrait permettre de définir un cadre réglementaire et sanitaire plus approprié à l'utilisation croissante de tels matériaux.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RESSOURCES ELECTRONIQUES

AFSSET, Les nanomatériaux, Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement, Rapport d'expertise collective :

http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/460552230101468097041324565478/10_03_ED_Les_nanomatériaux_Rapport_comprime.pdf, 15 Mars 2010.

American Elements, <http://www.americanelements.com>, site consulté le 10 décembre 2012.

CEDEF, Centre de Documentation Economie-Finances du Ministère de l'Economie et des Finances, <http://www.economie.gouv.fr/cedef/dossier-documentaire-nanotechnologies>, article du 21 mai 2012.

CSST, Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail, Service du répertoire toxicologique, *Noir de Carbone*. Disponible sur : http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=14043, mars 2006.

EmFutur Technologies, <http://www.emfutur.com>, site consulté le 10 décembre 2012.

Hanspers, K., et al. (2013). "Glycolysis and Neoglucogenesis (Homo sapiens)", disponible sur WikiPathways, Pathways for the People, <http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP534#Bibliography>, page mise à jour le 22 Février 2013.

Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M., et al. (2001). "Evolution of the innate immune system", in "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease". 5ème édition. Editions New York Garland Science. (Disponible en ligne sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27138/>).

Kourilsky, P. (2008). « Immunologie moléculaire », L'annuaire du Collège de France [En ligne], 108 | 2008, mis en ligne le 24 juin 2010, consulté le 17 janvier 2013. URL : <http://annuaire-cdf.revues.org/312>.

Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie, http://www.developpement-durable.gouv.fr/spip.php?page=article&id_article=7286, article mis à jour en août 2011.

Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health, Dietary Supplement Fact Sheet on Zinc, <http://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>, page mise à jour le 05 Juin 2013, consultée le 12 Juin 2013.

Skirball Institute of Biomolecular Medicine, <http://saturn.med.nyu.edu/facilities/paf/qtof>, page mise à jour en 2012, consultée le 18 mai 2013.

The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), of The Woodrow Wilson International Center for Scholars and The PEW Charitable Trusts, <http://www.nanotechproject.org/>.

OUVRAGES

Dukhin, A.S., and Goetz, P.J. (2002). "Ultrasound for characterizing colloids. Particle sizing, zeta potential, rheology". Studies in interface science, 15. Editions Elsevier.

Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M., et al. (2001). "Evolution of the innate immune system", in "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease". 5ème édition. Editions New York Garland Science. (Disponible en ligne sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27138/>).

O'Farrelly, C. and Doherty, D. G. (2007). "A short primer of fundamental immunology", in "Liver Immunology Principles and Practice", chapitre 1, pp. 15–24. Editions Humana Press.

Poole, C.P., and Owens, F.J. (2003). "Introduction to Nanotechnology". Editions Wiley-Interscience.

Yu, X., R.A. Ponce and E.M. Faustman (2011). "Metals Induced Disruption of Ubiquitin Proteasome System, Activation of Stress Signaling and Apoptosis", in "Cellular Effects of Heavy Metals", chapitre 14, pp. 291-311. Editions Gaspar Banfalvi.

ARTICLES ET REVUES SCIENTIFIQUES

Abel, G., J. Szöllösi and J. Facht (1991). "Phagocytosis of fluorescent latex microbeads by peritoneal macrophages in different strains of mice: a flow cytometric study." *Eur J Immunogenet* 18(4): 239-245.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.

Aiken, C. T., R. M. Kaake, X. Wang and L. Huang (2011). "Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes." *Mol Cell Proteomics* 10(5): R110.006924.

Aillon, K. L., Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland and M. L. Forrest (2009). "Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity." *Adv Drug Deliv Rev* 61(6): 457-466.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.

Angel, T. E., U. K. Aryal, S. M. Hengel, E. S. Baker, R. T. Kelly, E. W. Robinson and R. D. Smith (2012). "Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions." *Chem Soc Rev* 41(10): 3912-3928.

Aude-Garcia, C., C. Villiers, S. M. Candéias, C. Garrel, C. Bertrand, V. Collin, P. N. Marche and E. Jouvin-Marche (2011). "Enhanced susceptibility of T lymphocytes to oxidative stress in the absence of the cellular prion protein." *Cell Mol Life Sci* 68(4): 687-696.

Baulac, S., H. Lu, J. Strahle, T. Yang, M. S. Goldberg, J. Shen, M. G. Schlossmacher, C. A. Lemere, Q. Lu and W. Xia (2009). "Increased DJ-1 expression under oxidative stress and in Alzheimer's disease brains." *Mol Neurodegener* 4: 12.

Beck, G. and G. S. Habicht (1996). "Immunity and the invertebrates." *Sci Am* 275(5): 60-63, 66.

Bedford, L., J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer and J. E. Brownell (2011). "Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets." *Nat Rev Drug Discov* 10(1): 29-46.

Biemann, K. (1988). "Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure." *Biomed Environ Mass Spectrom* 16(1-12): 99-111.

- Bondy, S. C. (2011). "Nanoparticles and colloids as contributing factors in neurodegenerative disease." *Int J Environ Res Public Health* 8(6): 2200-2211.
- Borm, P. J., D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit and E. Oberdorster (2006). "The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC." *Part Fibre Toxicol* 3: 11.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bray, T. M. and W. J. Bettger (1990). "The physiological role of zinc as an antioxidant." *Free Radic Biol Med* 8(3): 281-291.
- Brocardo, P. S., J. Gil-Mohapel and B. R. Christie (2011). "The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders." *Brain Res Rev* 67(1-2): 209-225.
- Brunner, T. J., P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink and W. J. Stark (2006). "In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility." *Environ Sci Technol* 40(14): 4374-4381.
- Carlton, J., M. Bujny, B. J. Peter, V. M. Oorschot, A. Rutherford, H. Mellor, J. Klumperman, H. T. McMahon and P. J. Cullen (2004). "Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides." *Curr Biol* 14(20): 1791-1800.
- Carlton, J. G., M. V. Bujny, B. J. Peter, V. M. Oorschot, A. Rutherford, R. S. Arkell, J. Klumperman, H. T. McMahon and P. J. Cullen (2005). "Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport." *J Cell Sci* 118(Pt 19): 4527-4539.
- Casals, E., S. Va'zquez-Campos, N.G. Bastu's, V. Puntos (2008). "Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems". *Trends in Analytical Chemistry*, 27(8): 672-683.
- Chang, Y.N., M. Zhang, L. Xia, J. Zhang and G. Xing (2012). "The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles". *Materials*, 5:2850-2871.
- Chavrier, P. (2001). "Molecular basis of phagocytosis". *Semin Immunol*, 13(6): 337-338.
- Chen, G. Y. and G. Nuñez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." *Nat Rev Immunol* 10(12): 826-837.
- Chen, Y. R., C. L. Chen, L. Zhang, K. B. Green-Church and J. L. Zweier (2005). "Superoxide generation from mitochondrial NADH dehydrogenase induces self-inactivation with specific protein radical formation." *J Biol Chem* 280(45): 37339-37348.
- Chevallet, M., H. Diemer, A. Van Dorssealer, C. Villiers and T. Rabilloud (2007). "Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome." *Proteomics* 7(11): 1757-1770.
- Chevallet, M., S. Luche and T. Rabilloud (2006). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Nat Protoc* 1(4): 1852-1858.
- Chithrani, B. D. and W. C. Chan (2007). "Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes." *Nano Lett* 7(6): 1542-1550.

- Chithrani, B. D., A. A. Ghazani and W. C. Chan (2006). "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells." *Nano Lett* 6(4): 662-668.
- Chughtai, K. and R. M. Heeren (2010). "Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis." *Chem Rev* 110(5): 3237-3277.
- Cosson, P. and T. Soldati (2008). "Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria." *Curr Opin Microbiol* 11(3): 271-276.
- Crofts, A. R. (2004). "The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure." *Annu Rev Physiol* 66: 689-733.
- Cronholm, P., K. Midander, H. L. Karlsson, K. Elihn, I. O. Wallinder and L. Möller (2011). "Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells." *Nanotoxicology* 5(2): 269-281.
- Crosera, M., M. Bovenzi, G. Maina, G. Adami, C. Zanette, C. Florio and F. Filon Larese (2009). "Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature." *Int Arch Occup Environ Health* 82(9): 1043-1055.
- Dang, C. V. (2013). "Role of aerobic glycolysis in genetically engineered mouse models of cancer." *BMC Biol* 11: 3.
- Di Palma, S., M. L. Hennrich, A. J. Heck and S. Mohammed (2012). "Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis." *J Proteomics* 75(13): 3791-3813.
- Diz, A. P., M. Martínez-Fernández and E. Rolán-Alvarez (2012). "Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype." *Mol Ecol* 21(5): 1060-1080.
- Donaldson, K. and C. A. Poland (2012). "Inhaled nanoparticles and lung cancer - what we can learn from conventional particle toxicology." *Swiss Med Wkly* 142: w13547.
- Drummond, G. S. and A. Kappas (1979). "Manganese and zinc blockade of enzyme induction: studies with microsomal heme oxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10): 5331-5335.
- Eide, D. J. (2006). "Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc." *Biochim Biophys Acta* 1763(7): 711-722.
- Fahmy, B. and S. A. Cormier (2009). "Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells." *Toxicol In Vitro* 23(7): 1365-1371.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* 246(4926): 64-71.
- Forman, H. J. and M. Torres (2002). "Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling." *Am J Respir Crit Care Med* 166(12 Pt 2): S4-8.
- Freedman, J. H., M. R. Ciriolo and J. Peisach (1989). "The role of glutathione in copper metabolism and toxicity." *J Biol Chem* 264(10): 5598-5605.
- Fröhlich, E. (2012). "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles." *Int J Nanomedicine* 7: 5577-5591.
- Fröhlich, E. and E. Roblegg (2012). "Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products." *Toxicology* 291(1-3): 10-17.

- Fubini, B., M. Ghiazza and I. Fenoglio (2010). "Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity." *Nanotoxicology* 4: 347-363.
- Gaiser, B. K., T. F. Fernandes, M. Jepson, J. R. Lead, C. R. Tyler and V. Stone (2009). "Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments." *Environ Health* 8 Suppl 1: S2.
- Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau and M. Desjardins (2001). "The phagosome proteome: insight into phagosome functions." *J Cell Biol* 152(1): 165-180.
- Gay, C., J. Collins, and J.M. Gebicki (1999). "Determination of Iron in Solutions with the Ferric-Xylenol Orange Complex". *Anal. Biochem.* 273:143-148.
- Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai and S. M. Mische (1999). "Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity." *Electrophoresis* 20(3): 601-605.
- Ghio, A. J., J. D. Carter, J. M. Samet, W. Reed, J. Quay, L. A. Dailey, J. H. Richards and R. B. Devlin (1998). "Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells." *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): L728-736.
- Ghio, A. J., J. H. Richards, K. L. Dittrich and J. M. Samet (1998). "Metal storage and transport proteins increase after exposure of the rat lung to an air pollution particle." *Toxicol Pathol* 26(3): 388-394.
- Gianazza, E., F. Celentano, S. Magenes, C. Etori and P. G. Righetti (1989). "Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes." *Electrophoresis* 10(11): 806-808.
- Goodridge, H. S., D. M. Underhill and N. Touret (2012). "Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis." *Traffic* 13(8): 1062-1071.
- Gottschalk, F. and B. Nowack (2011). "The release of engineered nanomaterials to the environment." *J Environ Monit* 13(5): 1145-1155.
- Grieneisen, M. L. (2010). "The proliferation of nano journals." *Nat Nanotechnol* 5(12): 825.
- Grillo, C. A., M. A. Reigosa and M. A. de Mele (2010). "Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells?" *Contraception* 81(4): 343-349.
- Grinstein, S. (2012). "Phagocytosis here and now." *Traffic* 13(8): 1041.
- Gruber, C., S. Stürzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger and R. Dallinger (2000). "Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*." *Eur J Biochem* 267(2): 573-582.
- Gullapalli, A., T. A. Garrett, M. M. Paing, C. T. Griffin, Y. Yang and J. Trejo (2004). "A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking." *Mol Biol Cell* 15(5): 2143-2155.
- Görg, A., O. Drews, C. Lück, F. Weiland and W. Weiss (2009). "2-DE with IPGs." *Electrophoresis* 30 Suppl 1: S122-132.
- Ha, K. N., Y. Chen, J. Cai and P. Sternberg (2006). "Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: implication for protection against oxidative stress." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(6): 2709-2715.

Hackenberg, S., A. Scherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, M. Burghartz, R. Hagen and N. Kleinsasser (2011). "Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro." *Toxicol In Vitro* 25(3): 657-663.

Hamilton, R. F., S. A. Thakur and A. Holian (2008). "Silica binding and toxicity in alveolar macrophages." *Free Radic Biol Med* 44(7): 1246-1258.

Hanagata, N., F. Zhuang, S. Connolly, J. Li, N. Ogawa and M. Xu (2011). "Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis." *ACS Nano* 5(12): 9326-9338.

Harris, E. D. (2000). "Cellular copper transport and metabolism." *Annu Rev Nutr* 20: 291-310.

Harvey, J., S. C. Hardy and M. L. Ashford (1999). "Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on K(ATP) channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line." *Br J Pharmacol* 126(1): 51-60.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2011). "NF- κ B in immunobiology." *Cell Res* 21(2): 223-244.

He, Z., C. Yang and W. Yu (2008). "Peak bagging for peptide mass fingerprinting." *Bioinformatics* 24(10): 1293-1299.

Heng, B. C., X. Zhao, S. Xiong, K. W. Ng, F. Y. Boey and J. S. Loo (2011). "Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format." *Arch Toxicol* 85(6): 695-704.

Hennig, B., M. Toborek and C. J. McClain (1996). "Antiatherogenic properties of zinc: implications in endothelial cell metabolism." *Nutrition* 12(10): 711-717.

Hillenkamp, F., M. Karas, R. C. Beavis and B. T. Chait (1991). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers." *Anal Chem* 63(24): 1193A-1203A.

Hodges, E., M. T. Krishna, C. Pickard and J. L. Smith (2003). "Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes." *J Clin Pathol* 56(1): 1-11.

Horie, M., H. Kato, K. Fujita, S. Endoh and H. Iwahashi (2012). "In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles." *Chem Res Toxicol* 25(3): 605-619.

Horie, M., K. Nishio, K. Fujita, S. Endoh, A. Miyauchi, Y. Saito, H. Iwahashi, K. Yamamoto, H. Murayama, H. Nakano, N. Nanashima, E. Niki and Y. Yoshida (2009). "Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells." *Chem Res Toxicol* 22(3): 543-553.

Hsiao, I. L. and Y. J. Huang (2011). "Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells." *Sci Total Environ* 409(7): 1219-1228.

Hughes, P., D. Marshall, Y. Reid, H. Parkes and C. Gelber (2007). "The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?" *Biotechniques* 43(5): 575, 577-578, 581-572 passim.

James, P. (1997). "Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics." *Q Rev Biophys* 30(4): 279-331.

James, P., M. Quadroni, E. Carafoli and G. Gonnet (1993). "Protein identification by mass profile fingerprinting." *Biochem Biophys Res Commun* 195(1): 58-64.

Jeng, H. A. and J. Swanson (2006). "Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41(12): 2699-2711.

- Ji, Z., X. Jin, S. George, T. Xia, H. Meng, X. Wang, E. Suarez, H. Zhang, E. M. Hoek, H. Godwin, A. E. Nel and J. I. Zink (2010). "Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media." *Environ Sci Technol* 44(19): 7309-7314.
- Jiang, L. J., W. Maret and B. L. Vallee (1998). "The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3483-3488.
- Jiang, W., B. Y. Kim, J. T. Rutka and W. C. Chan (2008). "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent." *Nat Nanotechnol* 3(3): 145-150.
- Jiang, W., K. Yang, R. W. Vachet and B. Xing (2010). "Interaction between oxide nanoparticles and biomolecules of the bacterial cell envelope as examined by infrared spectroscopy." *Langmuir* 26(23): 18071-18077.
- Johnson, L. V., M. L. Walsh and L. B. Chen (1980). "Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(2): 990-994.
- Jones, C. F. and D. W. Grainger (2009). "In vitro assessments of nanomaterial toxicity." *Adv Drug Deliv Rev* 61(6): 438-456.
- Joyce, S. (2000). "Natural T cells: cranking up the immune system by prompt cytokine secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 6933-6935.
- Jugan, M. L., S. Barillet, A. Simon-Deckers, N. Herlin-Boime, S. Sauvaigo, T. Douki and M. Carriere (2012). "Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells." *Nanotoxicology* 6(5): 501-513.
- Jugan, M. L., S. Barillet, A. Simon-Deckers, S. Sauvaigo, T. Douki, N. Herlin and M. Carrière (2011). "Cytotoxic and genotoxic impact of TiO₂ nanoparticles on A549 cells." *J Biomed Nanotechnol* 7(1): 22-23.
- Kadiu, I., A. Nowacek, J. McMillan and H. E. Gendelman (2011). "Macrophage endocytic trafficking of antiretroviral nanoparticles." *Nanomedicine (Lond)* 6(6): 975-994.
- Kahru, A. and H. C. Dubourguier (2010). "From ecotoxicology to nanoecotoxicology." *Toxicology* 269(2-3): 105-119.
- Kahru, A. and A. Ivask (2012). "Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research." *Acc Chem Res*.
- Kahru, A. and K. Savolainen (2010). "Potential hazard of nanoparticles: from properties to biological and environmental effects." *Toxicology* 269(2-3): 89-91.
- Kang, C. M., A. S. Jang, M. H. Ahn, J. A. Shin, J. H. Kim, Y. S. Choi, T. Y. Rhim and C. S. Park (2005). "Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles." *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(3): 290-296.
- Kao, Y. Y., Y. C. Chen, T. J. Cheng, Y. M. Chiung and P. S. Liu (2012). "Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity." *Toxicol Sci* 125(2): 462-472.
- Karavitis, J. and E. J. Kovacs (2011). "Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors." *J Leukoc Biol* 90(6): 1065-1078.
- Karlsson, H. L., P. Cronholm, J. Gustafsson and L. Möller (2008). "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes." *Chem Res Toxicol* 21(9): 1726-1732.

- Karlsson, H. L., J. Gustafsson, P. Cronholm and L. Möller (2009). "Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size." *Toxicol Lett* 188(2): 112-118.
- Keen, C. L. and M. E. Gershwin (1990). "Zinc deficiency and immune function." *Annu Rev Nutr* 10: 415-431.
- Kelly, F. J. (2003). "Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects." *Occup Environ Med* 60(8): 612-616.
- Kennedy, T., A. J. Ghio, W. Reed, J. Samet, J. Zagorski, J. Quay, J. Carter, L. Dailey, J. R. Hoidal and R. B. Devlin (1998). "Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(3): 366-378.
- Kikuchi, G., T. Yoshida and M. Noguchi (2005). "Heme oxygenase and heme degradation." *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 558-567.
- Kim, I., C. H. Kim, J. H. Kim, J. Lee, J. J. Choi, Z. A. Chen, M. G. Lee, K. C. Chung, C. Y. Hsu and Y. S. Ahn (2004). "Pyrrolidine dithiocarbamate and zinc inhibit proteasome-dependent proteolysis." *Exp Cell Res* 298(1): 229-238.
- Kim, I. S., M. Baek and S. J. Choi (2010). "Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells." *J Nanosci Nanotechnol* 10(5): 3453-3458.
- Kress, Y., F. Gaskin, C. F. Brosnan and S. Levine (1981). "Effects of zinc on the cytoskeletal proteins in the central nervous system of the rat." *Brain Res* 220(1): 139-149.
- Kulvietis, V., V. Zalgevicene, J. Didziapetriene and R. Rotomskis (2011). "Transport of nanoparticles through the placental barrier." *Tohoku J Exp Med* 225(4): 225-234.
- Kwon, Y. M., Z. Xia, S. Glyn-Jones, D. Beard, H. S. Gill and D. W. Murray (2009). "Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro." *Biomed Mater* 4(2): 025018.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.
- Lanone, S., F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix and P. Hoet (2009). "Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines." *Part Fibre Toxicol* 6: 14.
- Larsen, G. L. and P. M. Henson (1983). "Mediators of inflammation." *Annu Rev Immunol* 1: 335-359.
- Lee, R., M. Margaritis, K. M. Channon and C. Antoniades (2012). "Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations." *Curr Med Chem* 19(16): 2504-2520.
- Li, J. J., S. Muralikrishnan, C. T. Ng, L. Y. Yung and B. H. Bay (2010). "Nanoparticle-induced pulmonary toxicity." *Exp Biol Med (Maywood)* 235(9): 1025-1033.
- Liaskou, E., D. V. Wilson and Y. H. Oo (2012). "Innate immune cells in liver inflammation." *Mediators Inflamm* 2012: 949157.
- Liaudet, L., G. Vassalli and P. Pacher (2009). "Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways." *Front Biosci* 14: 4809-4814.
- Lim, J. P. and P. A. Gleeson (2011). "Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps." *Immunol Cell Biol* 89(8): 836-843.

- Lottspeich, F. (1999). "Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins." *Angew Chem Int Ed Engl* 38(17): 2476-2492.
- Lucbe, S., H. Diemer, C. Tastet, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud (2004). "About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis." *Proteomics* 4(3): 551-561.
- Ludovico, P., F. Sansonetty and M. Côrte-Real (2001). "Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry." *Microbiology* 147(Pt 12): 3335-3343.
- Lutsenko, S., N. L. Barnes, M. Y. Bartee and O. Y. Dmitriev (2007). "Function and regulation of human copper-transporting ATPases." *Physiol Rev* 87(3): 1011-1046.
- MacCuspie, R. I., A. J. Allen and V. A. Hackley (2011). "Dispersion stabilization of silver nanoparticles in synthetic lung fluid studied under in situ conditions." *Nanotoxicology* 5(2): 140-156.
- Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." *Nat Immunol* 2(2): 95-101.
- Mackenzie, G. G. and P. I. Oteiza (2007). "Zinc and the cytoskeleton in the neuronal modulation of transcription factor NFAT." *J Cell Physiol* 210(1): 246-256.
- MacMicking, J., Q. W. Xie and C. Nathan (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
- Maneiro, E., M. J. López-Armada, M. C. de Andres, B. Caramés, M. A. Martín, A. Bonilla, P. Del Hoyo, F. Galdo, J. Arenas and F. J. Blanco (2005). "Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes." *Ann Rheum Dis* 64(3): 388-395.
- Manna, P., M. Ghosh, J. Ghosh, J. Das and P. C. Sil (2012). "Contribution of nano-copper particles to in vivo liver dysfunction and cellular damage: role of I κ B α /NF- κ B, MAPKs and mitochondrial signal." *Nanotoxicology* 6(1): 1-21.
- Manzo, S., A. Rocco, R. Carotenuto, F. e. L. Picione, M. L. Miglietta, G. Rametta and G. Di Francia (2011). "Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms." *Environ Sci Pollut Res Int* 18(5): 756-763.
- Maryon, E. B., S. A. Molloy and J. H. Kaplan (2013). "Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1." *Am J Physiol Cell Physiol* 304(8): C768-779.
- May, R. C. and L. M. Machesky (2001). "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." *J Cell Sci* 114(Pt 6): 1061-1077.
- McCoy, M. K. and M. R. Cookson (2011). "DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress." *Autophagy* 7(5): 531-532.
- Midander, K., P. Cronholm, H. L. Karlsson, K. Elihn, L. Möller, C. Leygraf and I. O. Wallinder (2009). "Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study." *Small* 5(3): 389-399.
- Mills, B. J., R. D. Lindeman and C. A. Lang (1981). "Effect of zinc deficiency on blood glutathione levels." *J Nutr* 111(6): 1098-1102.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol* 4(11): 841-855.

- Moller, I. M. (2001). "PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591.
- Morel, F., J. Doussiere and P. V. Vignais (1991). "The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects." *Eur J Biochem* 201(3): 523-546.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-969.
- Mossman, B. T. and A. Churg (1998). "Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis." *Am J Respir Crit Care Med* 157(5 Pt 1): 1666-1680.
- Mott, J. D., B. C. Pramanik, C. R. Moomaw, S. J. Afendis, G. N. DeMartino and C. A. Slaughter (1994). "PA28, an activator of the 20 S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits." *J Biol Chem* 269(50): 31466-31471.
- Mueller, N. C. and B. Nowack (2008). "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment." *Environ Sci Technol* 42(12): 4447-4453.
- Murray, J., B. Zhang, S. W. Taylor, D. Oglesbee, E. Fahy, M. F. Marusich, S. S. Ghosh and R. A. Capaldi (2003). "The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification." *J Biol Chem* 278(16): 13619-13622.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." *Nat Rev Immunol* 11(11): 723-737.
- Muñoz, A. and M. Costa (2012). "Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* 260(1): 1-16.
- Myers, S. A., A. Nield and M. Myers (2012). "Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus." *J Nutr Metab* 2012: 173712.
- Müller, K. H., J. Kulkarni, M. Motskin, A. Goode, P. Winship, J. N. Skepper, M. P. Ryan and A. E. Porter (2010). "pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution." *ACS Nano* 4(11): 6767-6779.
- Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka and I. Messaoudi (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." *Nat Rev Immunol* 4(2): 123-132.
- O'Reilly, P. J., J. M. Hickman-Davis, I. C. Davis and S. Matalon (2003). "Hyperoxia impairs antibacterial function of macrophages through effects on actin." *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(4): 443-450.
- Oberdörster, G. (2001). "Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles." *Int Arch Occup Environ Health* 74(1): 1-8.
- Oberdörster, G., E. Oberdörster and J. Oberdörster (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environ Health Perspect* 113(7): 823-839.
- Omata, Y., G. A. Salvador, S. Supasai, A. H. Keenan and P. I. Oteiza (2013). "Decreased zinc availability affects glutathione metabolism in neuronal cells and in the developing brain." *Toxicol Sci* 133(1): 90-100.
- Osman, I. F., A. Baumgartner, E. Cemeli, J. N. Fletcher and D. Anderson (2010). "Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells." *Nanomedicine (Lond)* 5(8): 1193-1203.
- Osmond, M. J. and M. J. McCall (2010). "Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard." *Nanotoxicology* 4(1): 15-41.

- Ossendorp, F., N. Fu, M. Camps, F. Granucci, S. J. Gobin, P. J. van den Elsen, D. Schuurhuis, G. J. Adema, G. B. Lipford, T. Chiba, A. Sijts, P. M. Kloetzel, P. Ricciardi-Castagnoli and C. J. Melief (2005). "Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells." *J Immunol* 174(12): 7815-7822.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* 87(1): 315-424.
- Palomäki, J., P. Karisola, L. Pylkkänen, K. Savolainen and H. Alenius (2010). "Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells." *Toxicology* 267(1-3): 125-131.
- Park, E. J., J. Yi, K. H. Chung, D. Y. Ryu, J. Choi and K. Park (2008). "Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells." *Toxicol Lett* 180(3): 222-229.
- Peralta-Videa, J. R., L. Zhao, M. L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong and J. L. Gardea-Torresdey (2011). "Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010." *J Hazard Mater* 186(1): 1-15.
- Perera, P. Y., T. N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S. M. Goyert and S. N. Vogel (2001). "CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression." *J Immunol* 166(1): 574-581.
- Petrak, J., R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny and C. D. Vulpe (2008). "Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins." *Proteomics* 8(9): 1744-1749.
- Petros, R. A. and J. M. DeSimone (2010). "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications." *Nat Rev Drug Discov* 9(8): 615-627.
- Piret, J. P., D. Jacques, J. N. Audinot, J. Mejia, E. Boilan, F. Noël, M. Fransolet, C. Demazy, S. Lucas, C. Saout and O. Toussaint (2012). "Copper(II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response." *Nanoscale* 4(22): 7168-7184.
- Plane, F., S. Wigmore, G. D. Angelini and J. Y. Jeremy (1997). "Effect of copper on nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in the rat isolated aorta." *Br J Pharmacol* 121(2): 345-350.
- Plummer, J. L., B. R. Smith, H. Sies and J. R. Bend (1981). "Chemical depletion of glutathione in vivo." *Methods Enzymol* 77: 50-59.
- Pluth, M. D., E. Tomat and S. J. Lippard (2011). "Biochemistry of mobile zinc and nitric oxide revealed by fluorescent sensors." *Annu Rev Biochem* 80: 333-355.
- Porter, D., K. Sriram, M. Wolfarth, A. Jefferson, D. Schwegler-Berry, M. Andrew, and V. Castranova (2008). "A biocompatible medium for nanoparticle dispersion". *Nanotoxicology*, 2(3): 144-154.
- Porter, D. W., N. Wu, A. F. Hubbs, R. R. Mercer, K. Funk, F. Meng, J. Li, M. G. Wolfarth, L. Battelli, S. Friend, M. Andrew, R. Hamilton, K. Sriram, F. Yang, V. Castranova and A. Holian (2012). "Differential mouse pulmonary dose and time course responses to titanium dioxide nanospheres and nanobelts." *Toxicol Sci* 131(1): 179-193.
- Prasad, A. S. (2008). "Zinc in human health: effect of zinc on immune cells." *Mol Med* 14(5-6): 353-357.
- Prasad, A. S. (2009). "Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12(6): 646-652.

- Premanathan, M., K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian and G. Manivannan (2011). "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation." *Nanomedicine* 7(2): 184-192.
- Prohaska, J. R. and A. A. Gybina (2004). "Intracellular copper transport in mammals." *J Nutr* 134(5): 1003-1006.
- Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel and J. Lunardi (1997). "Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* 18(3-4): 307-316.
- Rabilloud, T., M. Chevallet, S. Luche and C. Lelong (2010). "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future." *J Proteomics* 73(11): 2064-2077.
- Rabilloud, T. and C. Lelong (2011). "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial." *J Proteomics* 74(10): 1829-1841.
- Rabilloud, T., C. Valette and J. J. Lawrence (1994). "Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension." *Electrophoresis* 15(12): 1552-1558.
- Ralph, P. and I. Nakoinz (1977). "Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS." *J Immunol* 119(3): 950-954.
- Ralph, P. and I. Nakoinz (1977). "Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture." *Cancer Res* 37(2): 546-550.
- Ralph, P., J. Prichard and M. Cohn (1975). "Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity." *J Immunol* 114(2 pt 2): 898-905.
- Ramana, K. V. and S. K. Srivastava (2010). "Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies." *Int J Biochem Cell Biol* 42(1): 17-20.
- Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph and I. Nakoinz (1978). "Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus." *Cell* 15(1): 261-267.
- Rechsteiner, M., C. Realini and V. Ustrell (2000). "The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation." *Biochem J* 345 Pt 1: 1-15.
- Ren, G., D. Hu, E. W. Cheng, M. A. Vargas-Reus, P. Reip and R. P. Allaker (2009). "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications." *Int J Antimicrob Agents* 33(6): 587-590.
- Rice, G. C., E. A. Bump, D. C. Shrieve, W. Lee and M. Kovacs (1986). "Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo." *Cancer Res* 46(12 Pt 1): 6105-6110.
- Richert, S., S. Luche, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud (2004). "About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry." *Proteomics* 4(4): 909-916.
- Richter, P., M. I. Toral, A. E. Tapia and E. Fuenzalida (1997). "Flow injection photometric determination of zinc and copper with zincon based on the variation of the stability of the complexes with pH." *Analyst* 122(10): 1045-1048.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* 11(11): 601.
- Rogler, G. and T. Andus (1998). "Cytokines in inflammatory bowel disease." *World J Surg* 22(4): 382-389.

- Rothen-Rutishauser, B., C. Mühlfeld, F. Blank, C. Musso and P. Gehr (2007). "Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model." *Part Fibre Toxicol* 4: 9.
- Rotilio, D., A. Della Corte, M. D'Imperio, W. Coletta, S. Marcone, C. Silvestri, L. Giordano, M. Di Michele and M. B. Donati (2012). "Proteomics: bases for protein complexity understanding." *Thromb Res* 129(3): 257-262.
- Roy, R., A. Tripathi, M. Das and P. D. Dwivedi (2011). "Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide." *J Biomed Nanotechnol* 7(1): 110-111.
- Rudolf, E., L. Klvacová, S. John and M. Cervinka (2008). "Zinc alters cytoskeletal integrity and migration in colon cancer cells." *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51(1): 51-57.
- Rush, R.M., J.H. Yoe (1954). "Colorimetric determination of zinc and copper with 2-carboxy-20-hydroxy-50-sulfoformazylbenzene". *Anal. Chem.* 26:1345-1347.
- Sauer, U. G., C. Kneuer, J. Tentschert, T. Wächter, M. Schroeder, D. Butzke, A. Luch, M. Liebsch, B. Grune and M. E. Götz (2011). "A knowledge-based search engine to navigate the information thicket of nanotoxicology." *Regul Toxicol Pharmacol* 59(1): 47-52.
- Schleicher, U. and C. Bogdan (2009). "Generation, culture and flow-cytometric characterization of primary mouse macrophages." *Methods Mol Biol* 531: 203-224.
- Seth, R., S. Yang, S. Choi, M. Sabeen and E. A. Roberts (2004). "In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2." *Toxicol In Vitro* 18(4): 501-509.
- Sharma, V., D. Anderson and A. Dhawan (2011). "Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2)." *J Biomed Nanotechnol* 7(1): 98-99.
- Shaw, B. J. and R. D. Handy (2011). "Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions." *Environ Int* 37(6): 1083-1097.
- Sijts, A., Y. Sun, K. Janek, S. Kral, A. Paschen, D. Schadendorf and P. M. Kloetzel (2002). "The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing." *Mol Immunol* 39(3-4): 165-169.
- Simkó, M. and M. O. Mattsson (2010). "Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review." *Part Fibre Toxicol* 7: 42.
- Simon-Deckers, A., B. Gouget, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, C. Reynaud and M. Carrière (2008). "In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes." *Toxicology* 253(1-3): 137-146.
- Smith, M. L., S. P. Vorce, J. M. Holler, E. Shimomura, J. Magluilo, A. J. Jacobs and M. A. Huestis (2007). "Modern instrumental methods in forensic toxicology." *J Anal Toxicol* 31(5): 237-253, 238A-239A.
- Song, W., J. Zhang, J. Guo, F. Ding, L. Li and Z. Sun (2010). "Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles." *Toxicol Lett* 199(3): 389-397.
- Speisky, H., M. Gómez, C. Carrasco-Pozo, E. Pastene, C. Lopez-Alarcón and C. Olea-Azar (2008). "Cu(I)-glutathione complex: a potential source of superoxide radicals generation." *Bioorg Med Chem* 16(13): 6568-6574.

- Stover, N. A., T. A. Dixon and A. R. Cavalcanti (2011). "Multiple independent fusions of glucose-6-phosphate dehydrogenase with enzymes in the pentose phosphate pathway." *PLoS One* 6(8): e22269.
- Sun, J., X. Zhang, M. Broderick, and H. Fein (2003). "Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay". *Sensors*, 3:276-284.
- Suzuki, H., T. Ueda, H. Taguchi and N. Takeuchi (2007). "Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu." *J Biol Chem* 282(6): 4076-4084.
- Säbel, C. E., J. M. Neureuther and S. Siemann (2010). "A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon." *Anal Biochem* 397(2): 218-226.
- Taira, T., Y. Saito, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, K. Takahashi and H. Ariga (2004). "DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death." *EMBO Rep* 5(2): 213-218.
- Tarakanova, V. L., V. Leung-Pineda, S. Hwang, C. W. Yang, K. Matatall, M. Basson, R. Sun, H. Piwnicka-Worms, B. P. Sleckman and H. W. Virgin (2007). "Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication." *Cell Host Microbe* 1(4): 275-286.
- Tastet, C., P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer and T. Rabilloud (2003). "A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins." *Electrophoresis* 24(11): 1787-1794.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
- Tsai, Y. Y., Y. H. Huang, Y. L. Chao, K. Y. Hu, L. T. Chin, S. H. Chou, A. L. Hour, Y. D. Yao, C. S. Tu, Y. J. Liang, C. Y. Tsai, H. Y. Wu, S. W. Tan and H. M. Chen (2011). "Identification of the nanogold particle-induced endoplasmic reticulum stress by omic techniques and systems biology analysis." *ACS Nano* 5(12): 9354-9369.
- Tulp, A., D. Verwoerd and J. Neefjes (1999). "Electromigration for separations of protein complexes." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722(1-2): 141-151.
- Underhill, D. M. and H. S. Goodridge (2012). "Information processing during phagocytosis." *Nat Rev Immunol* 12(7): 492-502.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." *Annu Rev Immunol* 20: 825-852.
- Valant, J., D. Drobne, K. Sepčić, A. Jemec, K. Kogej and R. Kostanjsek (2009). "Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay." *J Hazard Mater* 171(1-3): 160-165.
- Valenzuela, P. and J. A. Simon (2012). "Nanoparticle delivery for transdermal HRT." *Maturitas* 73(1): 74-80.
- von der Malsburg, K., J. M. Müller, M. Bohnert, S. Oeljeklaus, P. Kwiatkowska, T. Becker, A. Loniewska-Lwowska, S. Wiese, S. Rao, D. Milenkovic, D. P. Hutu, R. M. Zerbes, A. Schulze-Specking, H. E. Meyer, J. C. Martinou, S. Rospert, P. Rehling, C. Meisinger, M. Veenhuis, B. Warscheid, I. J. van der Klei, N. Pfanner, A. Chacinska and M. van der Laan (2011). "Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis." *Dev Cell* 21(4): 694-707.

- Vrba, J. and M. Modrianský (2002). "Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 146(2): 15-20.
- Vulpe, C. D. and S. Packman (1995). "Cellular copper transport." *Annu Rev Nutr* 15: 293-322.
- Wahab, R., N. K. Kaushik, A. K. Verma, A. Mishra, I. H. Hwang, Y. B. Yang, H. S. Shin and Y. S. Kim (2011). "Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells." *J Biol Inorg Chem* 16(3): 431-442.
- Wang, D., J. Hu, D. R. Irons and J. Wang (2011). "Synergistic toxic effect of nano-TiO and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*." *Sci Total Environ* 409(7): 1351-1356.
- Wang, P., F. G. Bouwman and E. C. Mariman (2009). "Generally detected proteins in comparative proteomics--a matter of cellular stress response?" *Proteomics* 9(11): 2955-2966.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams and I. Humphery-Smith (1995). "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*." *Electrophoresis* 16(7): 1090-1094.
- Weischenfeldt, J. and B. Porse (2008). "Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications." *CSH Protoc* 2008: pdb.prot5080.
- Weiss, H., T. Friedrich, G. Hofhaus and D. Preis (1991). "The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria." *Eur J Biochem* 197(3): 563-576.
- Wilhelm, B., U. I. Walther and B. Fichtl (2001). "Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines." *Arch Toxicol* 75(7): 388-394.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser and K. L. Williams (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19-50.
- Wirth, J. J., P. J. Fraker and F. Kierszenbaum (1989). "Zinc requirement for macrophage function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of a protozoan parasite." *Immunology* 68(1): 114-119.
- Witschger, O., and J-F. Fabriès (2005). "Particules ultrafines et santé au travail 2 - Sources et caractérisation de l'exposition". Disponible sur :
- <http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=ND%202227>.
- Wright, P. C., J. Noirel, S. Y. Ow and A. Fazeli (2012). "A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations." *Theriogenology* 77(4): 738-765.e752.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *J Nutr* 134(3): 489-492.
- Wu, Q., H. Yuan, L. Zhang and Y. Zhang (2012). "Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: from qualitative to quantitative analysis--a review." *Anal Chim Acta* 731: 1-10.
- Wu, Z., D. Weng and G. Li (2013). "Quantitative proteome analysis of overexpressed Cripto-1 tumor cell reveals 14-3-3 γ as a novel biomarker in nasopharyngeal carcinoma." *J Proteomics* 83: 26-36.

- Xia, T., M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink and A. E. Nel (2008). "Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties." *ACS Nano* 2(10): 2121-2134.
- Yang, Z., Z. W. Liu, R. P. Allaker, P. Reip, J. Oxford, Z. Ahmad and G. Ren (2010). "A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system." *J R Soc Interface* 7 Suppl 4: S411-422.
- Yates, J. R., J. K. Eng, A. L. McCormack and D. Schieltz (1995). "Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database." *Anal Chem* 67(8): 1426-1436.
- Yates, J. R., A. L. McCormack, D. Schieltz, E. Carmack and A. Link (1997). "Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry." *J Protein Chem* 16(5): 495-497.
- Yazdi, A. S., G. Guarda, N. Riteau, S. K. Drexler, A. Tardivel, I. Couillin and J. Tschopp (2010). "Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β ." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45): 19449-19454.
- Yin, H., P. S. Casey and M. J. McCall (2010). "Surface modifications of ZnO nanoparticles and their cytotoxicity." *J Nanosci Nanotechnol* 10(11): 7565-7570.
- Yokota, T., K. Sugawara, K. Ito, R. Takahashi, H. Ariga and H. Mizusawa (2003). "Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition." *Biochem Biophys Res Commun* 312(4): 1342-1348.
- Zerbes, R. M., I. J. van der Klei, M. Veenhuis, N. Pfanner, M. van der Laan and M. Bohnert (2012). "Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture." *Biol Chem* 393(11): 1247-1261.
- Zhang, X., A. Fang, C. P. Riley, M. Wang, F. E. Regnier and C. Buck (2010). "Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--a review." *Anal Chim Acta* 664(2): 101-113.
- Zhou, W. and C. R. Freed (2005). "DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity." *J Biol Chem* 280(52): 43150-43158.

ANNEXES

ANNEXE 1 : MANUSCRIT DE LA PUBLICATION « EFFETS DU CUIVRE SUR LA LIGNEE RAW 264.7 »

Ce manuscrit a été révisé et soumis auprès du journal *Molecular and Cellular Proteomics* le 06 Mai 2013.

“Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses”

Sarah Triboulet ^{1, 2, 3}, Catherine Aude-Garcia ^{1, 2, 3}, Marie Carrière ⁴, Hélène Diemer ⁵, Fabienne Proamer ⁶, Aurélie Habert ⁷, Mireille Chevallet ^{1, 2, 3}, Véronique Collin-Faure ^{1, 2, 3}, Jean-Marc Strub ⁵, Daniel Hanau ⁶, Alain Van Dorsselaer ⁵, Nathalie Herlin-Boime ⁷, Thierry Rabilloud ^{1, 2, 3*}

1: Pro-MD team, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Université Joseph Fourier, Grenoble

2: Pro-MD team, CEA Grenoble, iRTSV/LCBM, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble

3: Pro-MD team, UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF, Grenoble

4: UMR E3 CEA-Université Joseph Fourier, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (LAN), Grenoble

5: Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France. CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France.

6: UMR_S725, INSERM-UdS, EFS-Alsace, 10, rue Spielmann, 67065 Strasbourg

7: IRAMIS, SPAM-LFP (CEA CNRS URA 2453), Saclay

*: to whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF 5249, iRTSV/LCBM, CEA Grenoble, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

thierry.rabilloud@cea.fr

Running title: macrophage responses to copper oxide nanoparticles

ABBREVIATIONS

BHP: t-butyl hydroperoxide; CHAPS:3-[3- Cholamidopropyl]-dimethylammonio propane-1-sulfonate; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; LPS: lipopolysaccharide; MS: mass spectrometry; MS/MS: tandem mass spectrometry; PBS: phosphate buffered saline; PVP: polyvinyl pyrrolidone; SEM: scanning electron microscopy; TCEP: tris(carboxyethyl)phospine; TEM: transmission electron microscopy

ABSTRACT

The molecular responses of macrophages to copper-based nanoparticles has been investigated by a combination of proteomic and biochemical approaches, using the RAW264.7 cell line as a model. Both metallic copper and copper oxide nanoparticles have been tested, with copper ion and zirconium oxide nanoparticles as controls. Proteomic analysis highlighted changes in proteins implicated in oxidative stress responses (superoxide dismutases and peroxiredoxins), in glutathione biosynthesis, in the actomyosin cytoskeleton and in mitochondrial proteins (especially oxidative phosphorylation complex subunits). Validation studies by functional analyses showed that the increase in glutathione biosynthesis and in mitochondrial complexes observed in the proteomic screen was critical to cell survival upon stress with copper-based nanoparticles; pharmacological inhibition of these two pathways enhanced cell vulnerability to copper-based nanoparticles but not to copper ion. Furthermore, functional analyses using primary macrophages derived from bone marrow showed a decrease in reduced glutathione levels, a decrease in the mitochondrial transmembrane potential, as well as an inhibition of phagocytosis and of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. However, only a fraction of these effects could be obtained with copper ions. In conclusion, this study showed that macrophage functions are significantly altered by copper-based nanoparticles. Also highlighted are the cellular pathways modulated by cells for survival and the exemplified cross-toxicities that can occur between copper-based nanoparticles and pharmacological agents.

INTRODUCTION

Manufactured nanoparticles are more and more widely used in more and more consumer products, ranging from personal care products to tyres and concrete. Among the nanoparticles, metals and metal oxides represent an important part of the total production and are used in water treatment, as antibacterials, in antifouling paints or in microelectronics. These wide uses pose in turn the problem of the toxicological evaluation of the toxicity of these nanoparticles (1, 2), and especially of the long-term effects that often do not come from simple cell mortality but from altered cellular functions.

Macrophages are one of the cell types that deserve special attention in toxicology, due to the variety of

their functions. An altered cytokine production can lead to adverse long term effects, as documented for example in the case of asbestos (3). Other dysfunctions of the innate immune system can lead to deregulation of the immune responses and to severe adverse effects, e.g. a higher incidence of tumours (4).

It is therefore not surprising that immunotoxicology of nanoparticles is a developing field (5-7), and several studies have been devoted to the response of macrophages to nanoparticles. However, most of these studies are limited to the effect of nanoparticles on cell viability and on cytokine production (e.g. (8-11)) although some publications also study oxidative stress (12-14) and sometimes other functional parameters (15-17). Very few studies use the analytical power of proteomics to go deeper into the mechanisms of response to nanoparticles or to metals (reviewed in (18)). A few exceptions exist, e.g. on carbon-based nanoparticles (19) and on titanium dioxide (20, 21).

Most of the toxicological studies in this field have been focused on a few nanoparticles, either used as health products such as iron oxide (15, 17, 22), or used in variety of consumer products such as silver (13, 14), silica (9, 12) or titanium dioxide (11, 16, 20, 21).

However, many other nanoparticles are more and more used in industrial applications without extensive toxicological testing. Good examples are indium-tin oxide, used in electronic screens and which appears to be toxic (23)

and the copper-based nanoparticles, used in high-performance batteries (24), in water depollution (25), and as bactericidal in replacement of nano-silver. Copper and copper oxide induce a strong toxicity (26, 27), coupled with inflammation (28), oxidative stress (29) and genotoxicity (30), at least in epithelial cells.

In the light of these various effects, we have decided to use a combination of a proteomics approach with targeted approaches to address in more molecular details the responses of macrophages to copper-based nanoparticles, i.e. both metallic copper and copper II oxide.

MATERIAL AND METHODS

Nanoparticles

Metallic copper and copper oxide nanoparticles (<50 nm) were purchased from Sigma-Aldrich (catalog numbers 684007 and 544868 respectively). They were dispersed in water as a 5.5% w/v suspension by sonication for 60 minutes in a cup-horn instrument (BioBlock Scientific, France), under a 5°C thermostated water circulation. One-tenth volume of 10% w/v PVP40 solution was added under sterile conditions, and the particles were coated for 1 hour under constant agitation. The actual size of the particles was determined after dilution in water or in complete culture medium by dynamic light scattering, using a Wyatt Dynapro Nanostar instrument or a Malvern HS 3000 instrument, the latter instrument being also used to determine the zeta potential.

The morphology of the samples was observed by SEM (Scanning Electron Microscopy). A 200 mesh

carbon grid was dipped in the nanoparticles suspensions and dried under air before imaging.

The amount of coating attached on the inorganic nanoparticles was evaluated from weight loss (from about 10mg of sample) after annealing under air using a Thermogravimetric Analysis device (Setaram). The temperature cycle was heating at a rate of 10°C/min up to 600°C followed by a dwelling time of 30 minutes and natural cooling.

Zirconium oxide nanoparticles (<100 nm) were purchased from Sigma-Aldrich as a 10% (w/v) dispersion in water (catalog number 643025). Prior to use, they were diluted by mixing one volume of dispersion with one volume of 2% w/v PVP-40 for 1 hour under constant agitation. The actual size of the final dispersion in complete culture medium was determined as for the copper nanoparticles.

Nanoparticles dissolution in culture medium

Nanoparticles were added at 5, 10 or 20 µg/ml to complete culture medium (RPMI 1640 + 10% fetal bovine serum) in cell culture 6 well plates containing 2ml culture medium per well. In some experiments, conditioned medium, i.e. complete cell culture medium having been in contact with the cells for at least 24 hours, was used in place of fresh complete culture medium. Known concentrations of copper chloride were also added to complete culture medium in control wells and incubated under the same conditions. The plates were incubated for 24 hours in a cell culture incubator at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The culture medium was recovered, and centrifuged at 270,000g for 45 minutes to sediment the nanoparticles (31). The concentration of copper ions was then determined using the Zincon method (32). Briefly, 1 ml of supernatant was acidified with trichloroacetic acid (7.5% w/v final concentration) to precipitate proteins and release bound copper ions. This precipitation step was carried out for 30 minutes on ice. The precipitated proteins were eliminated by centrifugation (15,000 g, 15 minutes), and the supernatants were collected. After neutralization by addition of 0.3 volumes of 2 M Tris, Zincon was added (50 µM final concentration) and the copper concentration was determined by absorbance at 600 nm, using the copper chloride in medium points to build the standard curve.

Cell culture

Cell lines

The mouse macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from the European Cell Culture Collection (Salisbury, UK). The cells were cultured in RPMI 1640 medium + 10% fetal bovine serum. Cells were seeded every two days at 200,000 cells/ml and harvested at 1,000,000 cells per ml.

Primary macrophages

Primary mouse macrophages were obtained from bone marrows essentially as described by Schleicher and Bogdan (33) and Tarakanova et al. (34) . Briefly, bone marrow was aseptically collected from femur and

tibias of 4 weeks-old C57Bl6 mice, sacrificed by cervical dislocation. The marrow plugs were dissociated by repeated flushing in the culture medium (DMEM 65% v/v, L929 cell culture supernatant 20% v/v, fetal bovine serum 10% v/v and horse serum 5% v/v) and plated at 4 million cells/ml on bacteriology culture dishes. An equal volume of medium was added after 4 days in culture. After 7 days of culture, the cells were scraped and replated at 1 million cells/ml in the same medium, except that the L929 supernatant was lowered to 10% v/v and DMEM increased to 75% v/v. Mature macrophages were obtained after an additional 3 days, and were viable and stable up to 2 weeks, provided that the culture medium was renewed every 3 days.

Cell treatment and viability assessment

Cells were treated with variable concentrations of nanoparticles, added directly in the culture medium. After 24 hours in the presence of the nanoparticles or ions, cell viability was measured by trypan blue exclusion. For treatment with inhibitors, cells were pretreated for 6 hours with either 100 μ M buthionine sulfoximine or 200 nM rotenone or 200 nM antimycin A. Copper oxide nanoparticles (or copper chloride) were then added for a further 18 hours before collection of the cells and viability measurements.

Neutral red uptake assay

This assay was performed essentially as described in (35). Briefly, cells grown in 12-well plates and treated or not with nanoparticles were incubated for 1 hour with 40 μ g/ml neutral red (final concentration, added from a 100x stock solution in 50% ethanol water). At the end of the incubation period, the medium was discarded and the cell layer was rinsed twice with PBS (5 minutes per rinse). The PBS was removed, and 1 ml of elution solution (50% ethanol and 1% acetic acid in water) was added per well. The dye was eluted for 15 minutes under constant agitation, and the dye concentration was read spectrophotometrically at 540 nm. The results were expressed as % of the control cells (untreated with nanoparticles).

Phagocytosis activity measurement

The phagocytic activity was measured using fluorescent latex beads (1 μ m diameter, green labelled, catalog number L4655 from Sigma), essentially as described in (36). Briefly, the beads were pre-incubated at a final concentration of 55 mg/ml for 30 minutes at 37°C in a 1:1 (v/v) PBS/ horse serum solution. They were then incubated with the cells (5.5 mg/L final concentration) for 2 h at 37°C. The cells were then harvested, washed twice with cold PBS, and incubated for 5 minutes on ice with a 0.25 M D-sorbitol solution in order to remove beads adhering to the cell surface. After another wash with cold PBS, cells were analyzed by flow cytometry on a FACScalibur instrument (Beckton Dickinson), using fluorescein excitation/emission filters, and using the live cell selection as described above.

Transmission Electron Microscopy

For TEM, fixation was initiated by adding an equal volume of fixative solution, previously warmed to 37°C, to the cells after treatment with copper oxide nanoparticles for 24 hours. The fixative solution contained 5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Euromedex, Strasbourg, France) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (both Merck, Darmstadt, Germany) (305 mOsm, pH 7.3). After 10 min the mixture was centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet resuspended in the fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 45 min at room temperature. The cells were then washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer and postfixed for 1 h at 4°C with 1% osmium tetroxide (Merck) in the same buffer and stained for 1 h at 4°C in 4% uranyl acetate. After further washing in distilled water, the cells were dehydrated in graded (50, 70, 80, 95, and 100%) ethanol solutions, incubated for 1 h in Epon (Electron Microscopy Sciences): absolute alcohol (1:1, vol/vol), then overnight in Epon and embedded in Epon. Ultrathin sections, stained with lead citrate (Leica, Bron, France) and uranyl acetate (Merck), were examined under a Philips CM 120 BioTwin electron microscope (120 kV).

Intracellular glutathione measurements

Intracellular glutathione levels were analyzed by the monochlorobimane technique (37), with some modifications (38). Briefly, the cells were harvested, centrifuged for 5 minutes and then labelled for 5 minutes with a 50 µM monochlorobimane solution diluted in PBS at 37°C. The reaction was stopped for 5 minutes on ice in the dark, and the cells were then washed twice with cold PBS. Finally, the cells were analyzed by flow cytometry on a MoFlo instrument (Beckman Coulter) using a UV laser for excitation and reading the emission at 450 nm. The analysis was restricted to live cells only.

Mitochondrial transmembrane potential assessment

The mitochondrial transmembrane potential was assessed by Rhodamine 123 uptake (39). Briefly, cells were treated with 10 µg/ml Rhodamine 123 in complete culture medium for 30 minutes at 37 °C. Cells were then harvested, rinsed twice in cold PBS and analysed by flow cytometry on a FACScalibur instrument (Beckton Dickinson), using fluorescein excitation/emission filters. First the live cells were selected on the basis of the size and granularity, then the fluorescence of these live cells was measured using the fluorescein channel.

NO production

The cells were grown to confluence in a 6 well plate, and then treated or not with copper nanoparticles, copper oxide nanoparticles, or copper chloride. After 24 hours of treatment, half of the wells were treated with 1 µg/ml LPS (from salmonella), and arginine monohydrochloride was added to all the wells (5 mM final concentration) to give a high concentration of substrate for the nitric oxide synthases. After 24 hours of incubation, the cell culture medium was recovered, centrifuged at 10,000 g for 10 minutes to remove cells

and debris, and the nitrite concentration was read at 540 nm after addition of an equal volume of Griess reagent and incubation at room temperature for 30 minutes.

Proteomics

2D gel electrophoresis

Sample preparation

The cells were collected by scraping, and then washed three times in PBS. The cells were then washed once in TSE buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, sucrose 0.25M, EDTA 1 mM), and the volume of the cell pellet was estimated. The pellet was resuspended in its own volume of TSE buffer. Then 4 volumes (relative to the cell suspension just prepared) of concentrated lysis buffer (urea 8.75 M, thiourea 2.5 M, CHAPS 5% w/v, TCEP-HCl, 6.25 mM, spermine base 12.5 mM) were added and the solution was let to extract at room temperature for 1 hour. The nucleic acids were then pelleted by ultracentrifugation (270,000 g at room temperature for 1 h), and the protein concentration in the supernatant was determined by a dye-binding assay (40). Carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3-10) were added to a final concentration of 0.4% (w/v), and the samples were kept frozen at -20°C until use

Isoelectric focusing

Home made 160 mm long 4-8 linear pH gradient gels (41) were cast according to published procedures (42). Four mm-wide strips were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes 3-10) and 100mM dithiodiethanol (43)(44).

The strips were then placed in a Multiphor plate (GE Healthcare), and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100V for 1 hour, then 300V for 3 hours, then 1000V for 1 hour, then 3400 V up to 60-70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 minutes in Tris 125mM, HCl 100mM, SDS 2.5%, glycerol 30% and urea 6 M (45) . They were then transferred on top of the SDS gels and sealed in place with 1% agarose dissolved in Tris 125mM, HCl 100mM, SDS 0.4% and 0.005% (w/v) bromophenol blue.

SDS electrophoresis and protein detection

Ten percent gels (160x200x1.5 mm) were used for protein separation. The Tris taurine buffer system (46) was used and operated at a ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9. The final gel composition is thus Tris 180mM, HCl 100 mM, acrylamide 10% (w/v), bisacrylamide 0.27%. The upper electrode buffer is Tris 50 mM, Taurine 200 mM, SDS 0.1%. The lower electrode buffer is Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1%. The gels were run at 25V for 1hour, then 12.5W per gel until the dye front has reached the bottom of the gel. Detection was carried out by fast silver staining (47).

Image analysis

The gels were scanned after silver staining on a flatbed scanner (Epson perfection V750), using a 16 bits grayscale image acquisition. The gel images were then analyzed using the Delta 2D software (v 3.6). 4 gels coming from 4 independent cultures were used for each experimental group. Spots that were never expressed above 100 ppm of the total spots were first filtered out. Then, significantly-varying spots were selected on the basis of their Student T-test p-value between the treated and the control groups. Spots showing a p-value lower than 0.05 were selected. However, two additional steps of statistical validation were used. On a global point perspective, the Storey and Tibshirani approach (48) was used to evaluate a FDR, as described previously (49). Then each of the selected spots was tested for significance by the Mann-Whitney ranking test, to rule out any bias that could exist the the T-test due to its underlying hypotheses.

Mass spectrometry

The spots selected for identification were excised from silver-stained gels and destained with ferricyanide/thiosulfate on the same day as silver staining in order to improve the efficiency of the identification process (50) (51). In gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPrep Station (Waters, Milford, USA). The gel plugs were washed twice with 50 μ L of 25 mM ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) and 50 μ L of acetonitrile. The cysteine residues were reduced by 50 μ L of 10 mM dithiothreitol at 57°C and alkylated by 50 μ L of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 10 μ L of 12.5 ng/ μ L of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 . The digestion was performed overnight at room temperature. The generated peptides were extracted with 30 μ L of 60% acetonitrile in 0.1% formic acid. Acetonitrile was evaporated under vacuum before nanoLC-MS/MS analysis.

NanoLC-MS/MS analysis was performed using on nanoLC-QTOF-MS system and on nanoLC-IT-MS system. The nanoLC-QTOF-MS system was composed of the nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation, Milford, USA) coupled to the SynaptTM High Definition Mass SpectrometerTM (Waters Corporation, Milford, USA). The system was fully controlled by MassLynx 4.1 SCN639 (Waters Corporation, Milford, USA).

The nanoLC system was composed of ACQUITY UPLC[®] BEH130 C18 column (250 mm x 75 μ m with a 1.7 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, USA) and a Symmetry C18 precolumn (20 mm x 180 μ m with a 5 μ m particle size, Waters Corporation, Milford, USA). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 4 μ L of sample were loaded into the enrichment column during 3 min at 5 μ L/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300 nL/min with a 8-35% linear gradient of solvent B in 9 minutes.

The tandem mass spectrometer was equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The capillary voltage was set at 2.8 kV and the cone voltage at 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using fragment ions from Glu-fibrino-peptide B on the [50;2000] m/z range. Online correction of this

calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion $(M+2H)^{2+}$ at m/z 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion $(M+H)^+$ at m/z 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis. The system was operated in Data-Dependent-Acquisition (DDA) mode with automatic switching between MS (0.5 s/scan on m/z range [150;1700]) and MS/MS modes (0.5 s/scan on m/z range [50;2000]). The two most abundant peptides (intensity threshold 20 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .pkl files using ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation, Milford, USA). Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5. Smoothing was performed on MS/MS spectra (Savitsky-Golay, 2 iterations, window of 3 channels). Deisotoping was applied for both MS (medium deisotoping) and MS/MS (fast deisotoping).

The nanoLC-IT-MS system was composed of the Agilent 1200 series nanoLC-Chip system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to the amaZon ion trap (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). The system was fully controlled by HyStar 3.2 and trapControl 7.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

The chip was composed of a Zorbax 300SB-C18 (43 mm \times 75 μ m, with a 5 μ m particle size) analytical column and a Zorbax 300SB-C18 (40 nL, 5 μ m) enrichment column. The solvent system consisted of 2% acetonitrile, 0.1% formic acid in water (solvent A) and 2% water, 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 4 μ L of sample were loaded into the enrichment column at a flow rate set to 3.75L/min with solvent A. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300 nL/min with a 8-40% linear gradient of solvent B in 7 minutes.

For tandem MS experiments, the system was operated in Data-Dependent-Acquisition (DDA) mode with automatic switching between MS and MS/MS. The voltage applied to the capillary cap was optimized to -1850V. The MS scanning was performed in the standard enhanced resolution mode at a scan rate of 8100 m/z per second. The mass range was 250-1500 m/z . The Ion Charge Control was 200000 and the maximum accumulation time was 200 ms. A total of 2 scans was averaged to obtain a MS spectrum and the rolling average was 1. The six most abundant precursor ions with an isolation width of 4 m/z were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan mode at a scan rate of 32500 m/z per second. The mass range was 100-2000 m/z . The Ion Charge Control was 300000. A total of 2 scans was averaged to obtain an MS/MS spectrum.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .mgf files using DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). A maximum number of 1700 compounds was detected with an intensity threshold of 150000. A charge deconvolution was applied on the MS full scan and the MS/MS spectra with an abundance cutoff of 5% and 2% respectively and with a maximum charge state of 3 and 2 respectively.

For protein identification, the MS/MS data were interpreted using a local Mascot server with MASCOT

2.4.0 algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProtKB/SwissProt (version 2012_08, 537,505 sequences). The research was carried out in all species. A maximum of one trypsin missed cleavage was allowed. Spectra from Qtof were searched with a mass tolerance of 15 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data and spectra from Ion Trap were searched with a mass tolerance of 0.3 Da in MS and MS/MS modes. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least two peptides with Mascot ion score above 20 or with one peptide with Mascot ion score above 30 and 5 consecutive fragment ions in MS/MS spectrum.

RESULTS AND DISCUSSION

Nanoparticle characterisation in culture medium

Upon sonication, copper and copper oxide nanoparticles could be dispersed to a microaggregate size of ca. 250 nm. These microaggregates were stable upon dilution in pure water, but we observed an immediate aggregation over the micron size when the nanoparticles were diluted in culture medium, even when containing fetal bovine serum. Unfortunately, this aggregation resulted in immediate sedimentation, leading to a very uneven exposure of the cell layer to the particles in the cell culture dish.

All of the undesirable phenomena were prevented when the copper and copper oxide nanoparticles were coated with polyvinylpyrrolidone (PVP) prior to dilution in the cell culture medium. PVP has been used in the preparation of stable copper nanoparticles by aqueous routes (52-54), e.g., for conductive inks (55). PVP is also used for the stabilisation of silver nanoparticles (56, 57) and in commercial nanoparticle dispersions (e.g., silver nanoparticles from Buhler). It is also classified as a biocompatible polymer (58, 59) and does not activate the macrophages by itself (60). Indeed, it induced no biological response, neither in our proteomic experiments nor in the targeted ones (data not shown).

Light scattering and scanning electron microscopy experiments showed that coating with PVP did not significantly change the microaggregation in water. However, the macroaggregation observed in culture media for noncoated particles was prevented, and the average diameter was kept close to 250 nm (Figure 1). The coating process with PVP significantly changed the zeta potential, measured at 0 mV instead of the classical 30 mV of a water suspension of CuO (61).

Zirconium oxide nanoparticles had the same aggregation property in culture media, which was prevented as well by PVP coating. The resulting average size was 180 nm measured by light scattering.

Dissolution studies, carried out in complete cell culture medium and in conditioned cell culture medium (both without cells), revealed that ca. 60% of the copper present initially in the nanoparticles was dissolved in the culture medium, and that dissolution was linear in the 5–20 µg/ml range. The dissolution data were similar whether fresh or conditioned medium was used and whether uncoated or PVP-coated nanoparticles

were used. These dissolution figures are quite close to those reported recently under the same conditions, i.e., dispersion in water then dilution in complete cell culture medium (31).

Determination of the effective copper doses

For carrying out a proteomics study, it was necessary to determine the dose to obtain the best compromise between viability and biological effect. We, therefore, decided to use an LD20, which is a dose leading to a cell mortality of 20%, knowing that the mortality of the control culture is approximately 5%. As nanoparticles are known to interfere with many viability estimation methods (62), we chose a very conservative and robust dye exclusion method for this critical step (63).

The results show that the LD20 was obtained at 10 µg/ml for the Cu and CuO nanoparticles for the RAW264 cell line, while it was obtained at 5 µg/ml for primary macrophages (Figure 2). A copper ion concentration of 0.2 mM corresponded to the LD20 for primary macrophages, while it induced no more than 10% mortality for the cell lines.

We, therefore, fixed our working concentrations at LD20 for the nanoparticles and at 0.2 mM for the copper ions.

Determination of nanoparticle fate in cells

In order to determine the fate of the nanoparticles in the presence of macrophages, transmission electron microscopy was performed on ultrathin sections of cells. These experiments showed that nanoparticles were present in vacuolar structures that were identified as multivesicular bodies and as lysosomes (Figure 3). These results were completely in line with what can be expected from professional phagocytic cells, as macrophages are. Moreover, these results demonstrate that macrophages seem to ingest nanoparticle aggregates present in the culture medium and to break them down within the endosomes-lysosomes. The first step was obviously the disaggregation of the aggregates into the nominal nanoparticles. However, the disaggregation did not seem to stop at this stage, as much smaller copper oxide particles were present (Figure 3). This observation is consistent with an intracellular dissolution of the copper oxide nanoparticles, which could be expected in an acidic organelle such as the lysosome. Macrophages are known to be able to uncoat nanoparticles (17), and this is further confirmed in our case by the existence of eroded nanoparticles within the cells. This size distribution was observed at both 4 hours and 24 hours of treatment with the nanoparticles. Thus, it can be concluded that the intracellular solubilisation of nanoparticles, which seems important for their biological effects (64), is kept even with coated nanoparticles. Overall, the coating process does not seem to interfere either with the extracellular or with the intracellular processes.

Proteomic analyses

The proteomic analyses were carried out on the RAW264 cell line, and typical gels are shown in Figure 4. More than 1,400 reliable spots were detected by the image analysis software, and they were further analysed for quantitative variations. As for all omics strategies, the issue of multiple testing must be taken into account. In other terms, positive hits will always be obtained when many molecules are screened simultaneously, as in many comparative omic screens, just because of the statistical noise. Most classical statistical corrections for multiple testing, such as the Bonferroni correction, are not suited to omics data, where relatively low replicate numbers are available, and are in fact much too conservative (65). We, therefore, used the t-test distribution approach, pioneered by Storey and Tibshirani (48) for transcriptomics and first applied to proteomics by Karp and coworkers (49). The distribution of the p-values (t-test) for the three tested conditions (nanoparticulate Cu, nanoparticulate CuO and Cu ion) is shown in Supplementary figure 1. This approach showed us that we could not expect any really significant result with a 25- μ M dose of copper ion, which has no effect on the cells. However, significant results could be expected for a higher dose of copper ion, corresponding to the LD20, as well as for copper and even more for copper oxide nanoparticles at the LD20.

We, therefore, focused our analysis on spots that showed a consistent variation between the Cu and CuO treatment, and these spots are indicated in Figure 4. These spots were then identified by mass spectrometry, and the results are shown in Table 1, with more details in Supplementary Tables 1 and 2. Some neighbouring spots or spots corresponding to other proteins of interest were also identified. On a global level, in addition to the classical metabolic modulation (66, 67), some cellular compartments/functions were highlighted by this proteomic analysis, such as cytoskeleton, cell signalling, mitochondrion and oxidative stress response, especially in the glutathione system.

In order to check for the specificity of the proteomic variations observed, we used zirconium oxide nanoparticles. These particles show very weak cytotoxicity (68) and were indeed nontoxic to RAW 264 cells up to 100 μ g/ml. As the density of zirconium oxide (5.68) is close to that of copper oxide (6.31), it meant that treatment of the cells with an equal concentration in weight also corresponded to equal concentrations in particle numbers, which is an important parameter for phagocytic cells. Furthermore, as zirconium oxide nanoparticles are also dispersed with PVP, this control integrated any possible effect of absorbed PVP.

Treatment with 10 μ g/ml zirconium oxide for 24 hours induced very few changes detectable in our proteomic screen (Supplementary Table 3 and Supplementary Figure 2), and none of these changes corresponded to the ones induced by copper and copper oxide nanoparticles (Table 1). This showed the specificity of our proteomic results. We, therefore, decided to test specifically these functions by targeted analyses, both on the RAW 264 cell line and on primary macrophages derived from bone marrow. As the proteomic effects were more pronounced with CuO nanoparticles, we primarily used these nanoparticles for the targeted experiments; although some experiments were also carried out with copper nanoparticles.

Characterisation of the general stress response

Quite frequently, proteomic studies identify a general cellular stress response module, which encompasses proteins involved in central metabolism and protein production and folding (67). However, in the case of the response of macrophages to copper-based nanoparticles, we did not observe the classical induction in central metabolism proteins. In contrast, we observed a small decrease in malate dehydrogenase, galactokinase and lactate dehydrogenase. We also did not observe changes in the heat shock proteins, in contrast to what has been described at the mRNA level in lung cells exposed to copper oxide nanoparticles (31), or at the protein level for cells exposed to gold nanoparticles (69). However, and consistent with the latter publication, we also observed a strong induction of the ribosomal protein P0.

Characterisation of the oxidative stress response

Oxidative stress has been observed in many cell types and with many nanoparticles [reviewed for example in (70)]. However, cellular responses to oxidative stress are not well characterised. The cellular oxidative stress response system is quite complex and involves several classes of enzymes, including catalases, peroxidases (including peroxiredoxins), superoxide dismutases and enzymes producing and using glutathione.

Our proteomic screen revealed that the heme oxygenase was very strongly induced, with a complex pattern of modifications. For the more classically observed peroxiredoxins (66, 67), we could determine by using the BHP oxidation test (71) that the induced form of Prx1 is indeed the oxidized form, while the native form of Prx6 is induced in our experiments. Other peroxiredoxins, such as Prx2 and the mitochondrial Prx3, remained unchanged, as shown in Table 1. The induction of Prx1 in response to gold nanoparticles has been described recently (69), but the status of the other peroxiredoxins had not been investigated. In addition, Prx1 is known to be inducible by heavy metals, as is heme oxygenase (72).

Furthermore, our results are consistent with those obtained for Prx6 with oxidative stress in lung cells (73) and in myoblasts (74).

As to the superoxide dismutases, we observed a decrease in the copper-zinc superoxide dismutase. The response of copper-zinc superoxide dismutase seems to be variable, because either an increase (75), decrease (76) or no change (29) has been described in response to metallic nanoparticles. We also observed no change for the mitochondrial manganese superoxide dismutase, although an increase in manganese superoxide dismutase has been described at the mRNA level (not at the protein level) in lung cells exposed to copper oxide nanoparticles (31).

Finally, as to the glutathione-dependent oxidative stress response system, we observed an increase in formyl glutathione hydrolase and a strong induction of the regulatory subunit of the glutamate-cysteine ligase, i.e., the activating subunit of the limiting enzyme in glutathione biosynthesis (77). This suggested that the cells responding to copper-based nanoparticles make a strong effort to increase their glutathione level, and we tested the intracellular levels of reduced glutathione by a chlorobimane conjugation test (37).

Compared with the positive control represented with diethyl maleate, which destroys reduced glutathione by alkylation, copper ion and copper-based nanoparticles induced a more subtle effect (Figure 5). A subpopulation of cells with low levels of reduced glutathione was induced, especially by copper nanoparticles. However, most of the cells had normal reduced glutathione levels, so that the average for the whole cell population was not significantly changed in most cases. In addition, the glutathione reductase was not induced by copper treatment (Figure 5).

Primary macrophages, however, were more sensitive and showed a decrease in their free glutathione levels of copper ions and of the two-copper-based nanoparticles. These results were consistent with those observed previously with copper oxide nanoparticles in lung cells (29, 30) and with silver in liver cells (75, 78). In the case of copper-based nanoparticles, this is also consistent with the well-known role of glutathione as a copper buffer in cells (79). Consistent with this role, the decrease in free glutathione levels was also observed when the cells were treated with copper ions.

However, the RAW264.7 cells appeared less sensitive to copper oxide and copper ions, as if the strong induction of glutamate-cysteine ligase was sufficient in this case to restore close to normal reduced glutathione levels. To verify this hypothesis, we treated RAW264.7 cells with non toxic doses of buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutamate-cysteine ligase. This induced a marked hypersensitivity of the cells to copper-based nanoparticles, as shown on Figure 5 (panel F)

Overall, these proteomics-based results show the fine tuning of the cellular response to oxidative stress, as exemplified from the differential response of the three cytosolic peroxidoxins (Prx1, 2 and 6), and from the response of the glutathione-dependent system.

Characterisation of the mitochondrial response

Mitochondrial function is sometimes tested in response to nanoparticle exposure by testing the main parameter of mitochondrial transmembrane potential. A decrease in mitochondrial transmembrane potential has been observed in response to copper-based nanoparticles or to copper ions in liver (78), in lung cells (80) and in macrophages (81). We also observed such a decrease in our study using a Rhodamine 123 uptake test (39), as shown in Figure 6. Both nanoparticles and copper ions induced a dose-dependent decrease in the mitochondrial transmembrane potential, and this effect was more pronounced in the primary macrophages than in the cell line.

Little is known, however, about the molecular events that could be related to the observed decrease in the mitochondrial transmembrane potential, which could even be due to a change in the plasma membrane potential. However, our proteomics screen suggested some possible mechanisms. First of all, we did not observe any change in the two major mitochondrial antioxidant proteins, superoxide dismutase 2 and peroxiredoxin 3. This suggests that there is no massive mitochondrial oxidative stress. However, we observed an increase in the levels of mit-EF-Tu. As this protein is a translation factor for the intramitochondrial synthesis of the few respiratory chain proteins encoded by the mitochondrial genome,

this result suggested an increase in the synthesis of the proteins of the oxidative phosphorylation chain, corroborated by an increase in one nuclear-coded subunit of the NADH dehydrogenase and one of the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex. However, the synthesis of another subunit of NADH dehydrogenase containing an iron-sulfur cluster (Ndufs8) was decreased. This suggests a toxic mechanism in which copper ions pumped into the mitochondria may alter the function of redox-sensitive proteins containing iron-sulfur clusters and, thus, alter both electron transfer and proton pumping through the inner mitochondrial membrane, leading to the observed decrease in the transmembrane potential. In this context, the observed increases in mit-EF-Tu, Uqcrc1 and Ndufs3 would represent an attempt of the cells to restore a normal mitochondrial transmembrane potential, which is observed at nontoxic doses of nanoparticles in RAW 264 cells. In order to test this hypothesis, we analysed cell survival after treatment with subtoxic doses of inhibitors targeting the two respiratory complexes highlighted by proteomics, namely Complex I and Complex III, inhibited respectively by rotenone and antimycin A. The results show the synergistic toxicity of mitochondrial inhibitors and copper oxide nanoparticles (Figure 6).

Changes in the cytoskeleton, intracellular trafficking and phagocytosis

Our proteomic screen pointed to changes in the cytoskeleton induced by copper-based nanoparticles. However, not all types of cytoskeletal proteins were altered by the nanoparticles. The tubulin cytoskeleton did not show any change in our screen, and besides vimentin, mostly the actin-myosin cytoskeleton was altered, either directly (decrease in tropomyosins) or indirectly (decrease in Rho GDI inhibitors, which is functionally equivalent to an increase in the activity of the Rho proteins). Rho proteins control specific modulations of the actin cytoskeleton (e.g., formation of stress fibres) that have been associated with decreased phagocytic capacity in macrophages stressed by hyperoxia (82).

A decrease in a subunit of the proton pump also pointed to a possible phagocytic deficiency. This prompted us to assay phagocytosis, which is a key macrophage function. CuO nanoparticles had no effect at moderately toxic doses in cell lines, and an inhibition of phagocytosis was apparent only at a toxic dose (20 µg/ml) (Figure 7). Cu nanoparticles were more efficient at inhibiting phagocytosis, while copper ions had no effect. In primary macrophages, which are more sensitive to nanoparticles in all our tests, both Cu and CuO nanoparticles were efficient in inhibiting phagocytosis, while Cu ions had no effect. Interestingly, tropomyosin, Rho GDI inhibitors and proton pump subunits were not modulated by copper ions in our proteomic screen.

To further study the functional effects of the observed decrease in the proton pump, we performed a classical neutral red uptake assay. Although classically used as a general viability assay (35), neutral red uptake is indeed an assay of lysosomal function because the acidic conditions retain neutral red inside the lysosomes. Figure 7C shows that neutral red uptake decreases more severely upon treatment with copper oxide nanoparticles than should be expected from a simple decrease in cell viability, showing a specific effect on lysosomes and validating the proteomically observed decrease in the proton pump.

NO production

In addition to phagocytosis, production of cytokines and of NO is a key function of macrophages. We, therefore, tested the production of NO in two different setups. In the first setup, we tested if nanoparticles could directly induce the production of NO, as this has been shown to occur with silver nanoparticles (13). In the second setup, we tested the modulation of the LPS-induced production of NO by a previous treatment with nanoparticles (Figure 8). While Cu-NP, CuO-NP and copper ions did not induce the production of NO by themselves, all three moderately inhibited LPS-induced NO production in primary macrophages. However, only copper ions were able to reduce the LPS-induced NO production in the case of the RAW 264 cell line. These results on NO production could be linked, at least indirectly, with the decrease in S-Adenosylhomocysteine hydrolase observed in our proteomic screen. Inhibition of S-Adenosylhomocysteine hydrolase has been shown to reduce pro-inflammatory properties (83), and this can be linked, at least in part to a decrease in adenosine concentrations, as adenosine is a potent activator of nitric oxide production in macrophages (84). Through this pathway, a reduced level of S-Adenosylhomocysteine hydrolase would suggest a lower ability to produce NO, at least in response to LPS, and this is exactly what was observed when NO production was specifically tested.

Overall, what can be explained by copper ions in the toxicity of nanoparticles ?

Since the demonstration of an important copper ion release from copper-based nanoparticles in biological media (85), it is generally thought that most of the nanoparticle toxicity arises from the copper ion itself, and not directly from the nanoparticles. However, transcriptomic studies (31), as well as our work presented here, show that extracellular copper ions can only account for a part of the cellular responses to copper-based nanoparticles. In our case, extracellular copper ions induced the general cellular stress responses (mitochondrial or glutathione dependent) and altered some specific cellular responses (e.g., nitric oxide production) but not all. For example, phagocytosis, a key function of macrophages, is altered by the nanoparticles but not by the free ions. We could, however, rule out a mechanical explanation of this inhibition, as titanium dioxide nanoparticles do not inhibit phagocytosis (data not shown).

These differences between the responses to the ion itself and to the nanoparticles may be the result of the existence of two different copper channels at the plasma membrane (Ctr1) and at the lysosomal membrane (Ctr2) (86). Thus, the real intracellular concentration, and even more subtly, the local copper concentrations within the cell can differ depending on the mode of entry. This might be the case for highly phagocytic cells such as macrophages, for which the lysosome-dependent entry can be much more important than the plasma membrane-dependent entry.

Concluding remarks

Despite its limited depth, estimated to ca. 500 proteins [1,500 spots for an average of 3 spots per protein (87)] the proteomics screen used here allowed us to point out several cellular functions that were modified upon treatment of macrophages with copper-based nanoparticles and/or copper ions. Interestingly, copper treatment was associated with a reduction in protein levels, suggesting either a decrease in their synthesis or an increase in their degradation. The fact that some copper-binding proteins (e.g., copper-zinc superoxide dismutase and S-adenosyl homocysteine hydrolase) diminished suggests that an excess in intracellular copper could lead to protein destructure and then degradation.

Moreover, the increase in the glutamate cysteine ligase subunit and of some mitochondrial proteins shows how proteomics can point to cellular resistance mechanisms even when they are successful, so that no apparent change can be detected in the downstream parameter (e.g., glutathione levels).

In the frame of macrophage physiology, the uptake of copper does not bring an activation of the macrophages, with the associated increase in the production of inflammatory mediators, as described for SiO₂ and TiO₂ nanoparticles (4) (88). It rather brings a depression of core macrophage activities such as NO production and phagocytosis, which can have in turn consequences on the overall efficiency of the immune system.

Finally, our results also show that even at nonlethal doses, nanoparticles can act synergistically with other toxicants to induce cell mortality and dysfunction.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ST performed the proteomics experiments with nanoparticles, the phagocytosis, rhodamine, NO experiments on the RAW264 cell line, and helped in drafting the manuscript. CAG performed the experiments on primary macrophages, and helped in drafting the manuscript. MCh performed the enzymatic experiments, helped in designing the whole study and in drafting the manuscript, and critically revised the manuscript. HD, JMS and AVD performed and interpreted the mass spectrometry identification in the proteomics experiments, and helped in drafting the manuscript. FP and DH performed the transmission microscopy experiments. AH and NHB performed the zeta potential measurements, the scanning microscopy experiments, and helped in drafting the manuscript. MCh helped in performing the experiments on primary macrophages. VCF performed the proteomics experiments on copper ions and the glutathione dosage experiments on RAW264 cells. TR conceived and designed the whole study, took part in the proteomics and targeted experiments, and drafted the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

ST thanks the Université Joseph Fourier for a PhD fellowship. The financial support of the CEA toxicology program (Nanobiomet and Nanostress grants) is also gratefully acknowledged. Finally the support of the Labex SERENADE (11-LABX-0064) is also acknowledged.

REFERENCES

1. Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., and Donaldson, K. (2010) *J R Soc Interface* 7 Suppl 1, S119-129
2. Teow, Y., Asharani, P. V., Hande, M. P., and Valiyaveetil, S. (2011) *Chem Commun (Camb)* 47(25), 7025-7038
3. Hamilton, J. A. (1980) *Environmental Health Perspectives* 34(FEB), 69-74
4. Moon, E. Y., Yi, G. H., Kang, J. S., Lim, J. S., Kim, H. M., and Pyo, S. (2011) *J Immunotoxicol* 8(1), 56-67
5. Dobrovolskaia, M. A., Germolec, D. R., and Weaver, J. L. (2009) *Nature Nanotechnology* 4(7), 411-414
6. Zolnik, B. S., Gonzalez-Fernandez, A., Sadrieh, N., and Dobrovolskaia, M. A. (2010) *Endocrinology* 151(2), 458-465
7. Di Gioacchino, M., Petrarca, C., Lazzarin, F., Di Giampaolo, L., Sabbioni, E., Boscolo, P., Mariani-Costantini, R., and Bernardini, G. (2011) *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(1 Suppl), 65S-71S
8. Vamanu, C. I., Cimpan, M. R., Hol, P. J., Sornes, S., Lie, S. A., and Gjerdet, N. R. (2008) *Toxicology in Vitro* 22(7), 1689-1696
9. Choi, J., Zhang, Q., Reipa, V., Wang, N. S., Stratmeyer, M. E., Hitchins, V. M., and Goering, P. L. (2009) *Journal of Applied Toxicology* 29(1), 52-60
10. Scheel, J., Weimans, S., Thiemann, A., Heisler, E., and Hermann, M. (2009) *Toxicology in Vitro* 23(3), 531-538
11. Morishige, T., Yoshioka, Y., Tanabe, A., Yao, X. L., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Mukai, Y., Okada, N., and Nakagawa, S. (2010) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392(2), 160-165
12. Park, E.-J., and Park, K. (2009) *Toxicology Letters* 184(1), 18-25
13. Park, E.-J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., and Park, K. (2010) *Toxicology in Vitro* 24(3), 872-878
14. Park, J., Lim, D. H., Lim, H. J., Kwon, T., Choi, J. S., Jeong, S., Choi, I. H., and Cheon, J. (2011) *Chemical Communications* 47(15), 4382-4384
15. Hsiao, J. K., Chu, H. H., Wang, Y. H., Lai, C. W., Chou, P. T., Hsieh, S. T., Wang, J. L., and Liu, H. M. (2008) *NMR Biomed* 21(8), 820-829
16. Palomaki, J., Karisola, P., Pylkkanen, L., Savolainen, K., and Alenius, H. (2010) *Toxicology* 267(1-3), 125-131
17. Yang, C. Y., Tai, M. F., Lin, C. P., Lu, C. W., Wang, J. L., Hsiao, J. K., and Liu, H. M. (2011) *PLoS One* 6(9), e25524
18. Luque-Garcia, J. L., Cabezas-Sanchez, P., and Camara, C. (2011) *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30(5), 703-716
19. Haniu, H., Matsuda, Y., Usui, Y., Aoki, K., Shimizu, M., Ogihara, N., Hara, K., Okamoto, M., Takanashi, S., Ishigaki, N., Nakamura, K., Kato, H., and Saito, N. (2011) *J Proteomics* 74(12), 2703-2712
20. Cha, M.-H., Rhim, T., Kim, K. H., Jang, A.-S., Paik, Y.-K., and Park, C.-S. (2007) *Molecular & Cellular Proteomics* 6(1), 56-63
21. Jeon, Y. M., Park, S. K., Kim, W. J., Ham, J. H., and Lee, M. Y. (2011) *Molecular & Cellular Toxicology* 7(3), 283-289
22. Singh, N., Jenkins, G. J., Asadi, R., and Doak, S. H. (2010) *Nano Rev* 1
23. Lison, D., Laloy, J., Corazzari, I., Muller, J., Rabolli, V., Panin, N., Huaux, F., Fenoglio, I., and Fubini, B.

- (2009) *Toxicol Sci* 108(2), 472-481
24. Guo, K., Pan, Q., Wang, L., and Fang, S. (2002) *Journal of Applied Electrochemistry* 32(6), 679-685
 25. Ben-Moshe, T., Dror, I., and Berkowitz, B. (2009) *Applied Catalysis B-Environmental* 85(3-4), 207-211
 26. Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., and Moller, L. (2008) *Chem Res Toxicol* 21(9), 1726-1732
 27. Prabhu, B. M., Ali, S. F., Murdock, R. C., Hussain, S. M., and Srivatsan, M. (2010) *Nanotoxicology* 4(2), 150-160
 28. Cho, W. S., Duffin, R., Poland, C. A., Howie, S. E., MacNee, W., Bradley, M., Megson, I. L., and Donaldson, K. (2010) *Environ Health Perspect* 118(12), 1699-1706
 29. Fahmy, B., and Cormier, S. A. (2009) *Toxicol In Vitro* 23(7), 1365-1371
 30. Ahamed, M., Siddiqui, M. A., Akhtar, M. J., Ahmad, I., Pant, A. B., and Alhadlaq, H. A. (2010) *Biochem Biophys Res Commun* 396(2), 578-583
 31. Hanagata, N., Zhuang, F., Connolly, S., Li, J., Ogawa, N., and Xu, M. (2011) *ACS Nano* 5(12), 9326-9338
 32. Sabel, C. E., Neureuther, J. M., and Siemann, S. (2010) *Anal Biochem* 397(2), 218-226
 33. Schleicher, U., and Bogdan, C. (2009) *Methods Mol Biol* 531, 203-224
 34. Tarakanova, V. L., Leung-Pineda, V., Hwang, S., Yang, C. W., Matatall, K., Basson, M., Sun, R., Piwnica-Worms, H., Sleckman, B. P., and Virgin, H. W. t. (2007) *Cell Host Microbe* 1(4), 275-286
 35. Repetto, G., del Peso, A., and Zurita, J. L. (2008) *Nat Protoc* 3(7), 1125-1131
 36. Abel, G., Szollosi, J., and Facht, J. (1991) *Eur J Immunogenet* 18(4), 239-245
 37. Rice, G. C., Bump, E. A., Shrieve, D. C., Lee, W., and Kovacs, M. (1986) *Cancer Res* 46(12 Pt 1), 6105-6110
 38. Aude-Garcia, C., Villiers, C., Candeias, S. M., Garrel, C., Bertrand, C., Collin, V., Marche, P. N., and Jouvin-Marche, E. (2011) *Cell Mol Life Sci* 68(4), 687-696
 39. Johnson, L. V., Walsh, M. L., and Chen, L. B. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(2), 990-994
 40. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* 72, 248-254
 41. Gianazza, E., Celentano, F., Magenes, S., Ettori, C., and Righetti, P. G. (1989) *Electrophoresis* 10(11), 806-808
 42. Rabilloud, T., Valette, C., and Lawrence, J. J. (1994) *Electrophoresis* 15(12), 1552-1558
 43. Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. (1997) *Electrophoresis* 18(3-4), 307-316
 44. Luche, S., Diemer, H., Tastet, C., Chevallet, M., Van Dorsseleer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2004) *Proteomics* 4(3), 551-561
 45. Gorg, A., Postel, W., Weser, J., Gunther, S., Strahler, J. R., Hanash, S. M., and Somerlot, L. (1987) *Electrophoresis* 8(2), 122-124
 46. Tastet, C., Lescuyer, P., Diemer, H., Luche, S., van Dorsseleer, A., and Rabilloud, T. (2003) *Electrophoresis* 24(11), 1787-1794
 47. Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006) *Nat Protoc* 1(4), 1852-1858
 48. Storey, J. D., and Tibshirani, R. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16), 9440-9445
 49. Karp, N. A., McCormick, P. S., Russell, M. R., and Lilley, K. S. (2007) *Mol Cell Proteomics* 6(8), 1354-1364

50. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) *Electrophoresis* 20(3), 601-605
51. Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2004) *Proteomics* 4(4), 909-916
52. Haas, I., Shanmugam, S., and Gedanken, A. (2006) *J Phys Chem B* 110(34), 16947-16952
53. Yu, W., Xie, H., Chen, L., Li, Y., and Zhang, C. (2009) *Nanoscale Res Lett* 4(5), 465-470
54. Engels, V., Benaskar, F., Jefferson, D. A., Johnson, B. F., and Wheatley, A. E. (2010) *Dalton Trans* 39(28), 6496-6502
55. Lee, Y., Choi, J. R., Lee, K. J., Stott, N. E., and Kim, D. (2008) *Nanotechnology* 19(41), 415604
56. El Badawy, A. M., Scheckel, K. G., Suidan, M., and Tolaymat, T. (2012) *Sci Total Environ* 429, 325-331
57. Jovanovic, Z., Radosavljevic, A., Kacarevic-Popovic, Z., Stojkovska, J., Peric-Grujic, A., Ristic, M., Matic, I. Z., Juranic, Z. D., Obradovic, B., and Miskovic-Stankovic, V. (2013) *Colloids Surf B Biointerfaces* 105, 230-235
58. Rogero, S. O., Malmonge, S. M., Lugao, A. B., Ikeda, T. I., Miyamaru, L., and Cruz, A. S. (2003) *Artif Organs* 27(5), 424-427
59. Liu, X., Xu, Y., Wu, Z., and Chen, H. (2013) *Macromol Biosci* 13(2), 147-154
60. Risbud, M., Bhonde, M., and Bhonde, R. (2001) *Cell Transplant* 10(2), 195-202
61. Guedes, M., Ferreira, J. M., and Ferro, A. C. (2009) *J Colloid Interface Sci* 330(1), 119-124
62. Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., and Schnekenburger, J. (2009) *Eur J Pharm Biopharm* 72(2), 370-377
63. Diaz, B., Sanchez-Espinel, C., Arruebo, M., Faro, J., de Miguel, E., Magadan, S., Yague, C., Fernandez-Pacheco, R., Ibarra, M. R., Santamaria, J., and Gonzalez-Fernandez, A. (2008) *Small* 4(11), 2025-2034
64. Studer, A. M., Limbach, L. K., Van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E. K., Gerber, L. C., Moch, H., and Stark, W. J. (2010) *Toxicol Lett* 197(3), 169-174
65. Diz, A. P., Carvajal-Rodriguez, A., and Skibinski, D. O. (2011) *Mol Cell Proteomics* 10(3), M110004374
66. Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., and Vulpe, C. D. (2008) *Proteomics* 8(9), 1744-1749
67. Wang, P., Bouwman, F. G., and Mariman, E. C. (2009) *Proteomics* 9(11), 2955-2966
68. Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., and Stark, W. J. (2006) *Environ Sci Technol* 40(14), 4374-4381
69. Tsai, Y. Y., Huang, Y. H., Chao, Y. L., Hu, K. Y., Chin, L. T., Chou, S. H., Hour, A. L., Yao, Y. D., Tu, C. S., Liang, Y. J., Tsai, C. Y., Wu, H. Y., Tan, S. W., and Chen, H. M. (2011) *ACS Nano* 5(12), 9354-9369
70. Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., and Iwahashi, H. (2012) *Chem Res Toxicol* 25(3), 605-619
71. Chevallet, M., Wagner, E., Luche, S., van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2003) *J Biol Chem* 278(39), 37146-37153
72. Sato, H., Ishii, T., Sugita, Y., Tateishi, N., and Bannai, S. (1993) *Biochim Biophys Acta* 1148(1), 127-132
73. Kim, H. S., Manevich, Y., Feinstein, S. I., Pak, J. H., Ho, Y. S., and Fisher, A. B. (2003) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(2), L363-369
74. Baraibar, M. A., Hyzewicz, J., Rogowska-Wrzesinska, A., Ladouce, R., Roepstorff, P., Mouly, V., and

- Friguet, B. (2011) *Free Radic Biol Med* 51(8), 1522-1532
75. Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J., and Ryu, D. Y. (2009) *Toxicol In Vitro* 23(6), 1076-1084
76. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., and Paknikar, K. M. (2008) *Toxicol Lett* 179(2), 93-100
77. Chen, Y., Shertzer, H. G., Schneider, S. N., Nebert, D. W., and Dalton, T. P. (2005) *J Biol Chem* 280(40), 33766-33774
78. Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., Choi, J., and Hyun, J. W. (2011) *Toxicology Letters* 201(1), 92-100
79. Freedman, J. H., Ciriolo, M. R., and Peisach, J. (1989) *J Biol Chem* 264(10), 5598-5605
80. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., and Moller, L. (2009) *Toxicology Letters* 188(2), 112-118
81. Zhang, H., Ji, Z., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., Pokhrel, S., Lin, S., Wang, X., Liao, Y. P., Wang, M., Li, L., Rallo, R., Damoiseaux, R., Telesca, D., Madler, L., Cohen, Y., Zink, J. I., and Nel, A. E. (2012) *ACS Nano* 6(5), 4349-4368
82. O'Reilly, P. J., Hickman-Davis, J. M., Davis, I. C., and Matalon, S. (2003) *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(4), 443-450
83. Chiang, P. K. (1998) *Pharmacol Ther* 77(2), 115-134
84. Min, H. W., Moochhala, S., and Eng, K. H. (2000) *Life Sci* 66(19), 1781-1793
85. Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H. L., Elihn, K., Moller, L., Leygraf, C., and Wallinder, I. O. (2009) *Small* 5(3), 389-399
86. Kim, B. E., Nevitt, T., and Thiele, D. J. (2008) *Nat Chem Biol* 4(3), 176-185
87. Hoogland, C., Mostaguir, K., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., and Appel, R. D. (2004) *Proteomics* 4(8), 2352-2356
88. Park, M., Lynch, I., Ramirez-Garcia, S., Dawson, K. A., de la Fonteyne, L., Gremmer, E., Slob, W., Briede, J. J., Elsaesser, A., Howard, C. V., van Loveren, H., and de Jong, W. H. (2011) *Journal of Nanoparticle Research* 13(12), 6775-6787

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Characterization of the nanoparticles after dispersion by sonication and coating with PVP-40.

A: size distribution of copper nanoparticles after sonication, coating with PVP-40 and dilution in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum

B: SEM of copper nanoparticles

C: size distribution of copper oxide nanoparticles after sonication, coating with PVP-40 and dilution in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum

D: SEM of copper oxide nanoparticles

Figure 2: Determination of the viability of the cells after treatment with copper nanoparticles, copper oxide nanoparticles, and copper(II) chloride.

The viability was measured by trypan blue exclusion.

A: RAW 264 cells

B: primary macrophages derived from bone marrow

Figure 3: Transmission electron microscopy analysis of nanoparticles-treated cells

RAW264 cells were imaged by transmission electron microscopy after treatment with copper oxide nanoparticles for 4 hours (panels A, C and D) and 24 hours (panel B). The copper nanoparticles are concentrated in multivesicular bodies and in lysosomes, as expected for professional phagocytic cells. Cells treated for 24 hours show much larger, fused lysosomes than cells treated for only 4 hours. Various sizes of copper oxide can be seen, from the 200-300 nm aggregates present in the medium (thick arrows) to the 30-50 nm of the initial (thin arrows) and even to smaller sizes such as 10 nm (arrowheads) as can be expected from the intracellular dissolution of the nanoparticles.

Figure 4: Proteomic analysis by 2D electrophoresis

Part A

Total cell extracts of RAW264 cells were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimension covered a 4-8 pH range and the second dimension a 15-200 kDa range. Total cellular proteins (150 µg) were loaded on the first dimension gel, and the spots were detected by silver staining.

A: gel obtained from control cells

B: gel obtained from copper nanoparticles-treated cells

C: gel obtained from copper oxide nanoparticles-treated cells

The arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control condition and the treatments with Cu or CuO nanoparticles. The numbering of the spots is explained on Table 1.

Rectangles **A to D** point to areas with a high density of selected spots, shown on a different figure. Gels coming from cells treated with copper chloride have been omitted for clarity reasons

Part B

Insets from gels displayed on Part A, shown at a higher magnification for more clarity in spot pointing

Figure 5: Analysis of the glutathione-based antioxidant system

This figure shows the variation of the intracellular levels of reduced glutathione, estimated through conjugation with monochlorobimane to form a fluorescent adduct and analysis by a MoFlo cell sorter.

Top panel: distribution of the MCB-GSH adduct fluorescence in control cells (**A**) and cells treated with diethyl maleate (**B**), which acts as a negative control by reacting with reduced glutathione before the cells are treated with monochlorobimane. This experiment allow to define the GSH-high and GSH-low cells by their fluorescence.

Median panel: variation in the intracellular glutathione levels upon treatment with copper nanoparticles, copper oxide nanoparticles, or copper ion. Three independent experiments per condition

C : variation in the percentage of GSH high cells in RAW264 cells, showing the appearance of a population of GSH-low cells, especially in cells treated with copper nanoparticles.

D: variation in the percentage of GSH high cells in primary macrophages, showing the appearance of a population of GSH-low cells, especially in cells treated with copper nanoparticles.

E: variation in the glutathione reductase activity in RAW264 cells treated with copper oxide nanoparticles or with copper ion

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Mann-Whitney test)

F: cell viability upon inhibition of glutathione biosynthesis

Control cells (white bars bars) or cells pre-treated with buthionine sulfoximine to inhibit glutathione biosynthesis grey bars) were treated with various doses of coperpr oxide nanoparticles. Viability measured by trypan blue exclusion

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Mann-Whitney test)

Figure 6: Analysis of the mitochondrial function

The **top two panels** of this figure show the amount of rhodamine internalized in the cells, expressed in percentage of the fluorescence in control cells (3 independent experiments). Fluorescence measurements were carried out on a FACScalibur cell sorter.

A: results obtained with RAW264 cells

B: results obtained with primary macrophages derived from bone marrow

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test)

C: cell survival after treatment with inhibitors of the mitochondrial respiratory chain and subsequent

treatment with copper oxide nanoparticles.

white bars: control cells; grey bars: cells treated with 200nm rotenone; black bars: cells treated with 200nm antimycin A

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Student T- test)

Figure 7: Analysis of the phagocytic capacity

This figure shows the determination of the phagocytic properties of the cells, through ingestion of fluorescent beads and analysis with a FACScalibur cell sorter.

Top panel: distribution of the fluorescence of the cells, showing the negative cells (control at 4°C) and the positive cells (control at 37°C), as well as the raw data obtained for cells treated with copper oxide nanoparticles for 24 hours prior to treatment with the fluorescent beads

Median panel: variation of the phagocytic capacity of the cells under different conditions, expressed in percentage of the control cells. Three independent experiments

A: results obtained with RAW264 cells

B: results obtained with primary macrophages derived from bone marrow (one experiment only for copper nanoparticles)

The results show the strong effect of copper and copper oxide nanoparticles on the phagocytic capacity of the cells, and the absence of effect of the copper ion.

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test)

Bottom panel

C: comparative variation of cell viability and neutral red uptake capacity.

This figure shows that the lysosomal functionality of the cells is altered by the copper oxide nanoparticles (but not the ion), as the neutral red uptake decreases more steeply than the overall cell viability.

Figure 8: analysis of the nitrous oxide production

This figures shows the amount of NO produced by the cells. White bars: without secondary treatment with LPS. Black bars: with secondary treatment with LPS

A: RAW264 cells

B: Primary macrophages derived from bone marrow

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney test)1.

Table 1: Differentially-expressed proteins identified in the proteomic screen

Spot number	Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Cu/ctrl (ratio/p value)	CuO/ctrl (ratio/p value)	Cu2+/ctrl (ratio/p value)	ZrO2/ctrl (ratio/p value)	Number of unique peptides
Oxidative stress								
1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P08228	15924	0.40/0.08	0.33 / 0.05	1.09/0.72	0.824/0.06	7
2	Peroxiredoxin-6	O08709	24854	0.91/0.42	0.75/0.04	0.91/0.55	1.016/0.64	5
3	Peroxiredoxin-1	P35700	22160	2.8/0.04	3.3/0.03	1.0/1.0	1.17/0.21	6
4	Peroxiredoxin-1	P35700	22160	1.28/0.21	2.1/0.002	1.56/0.01	0.921/0.25	7
5	Heme oxygenase 1	P14901	32911	3.8/0.05	3.8/0.02	0.81/0.52	0.805/0.82	1
6	Heme oxygenase 1	P14901	32911	1.47/0.12	1.61/0.02	1.00/0.97	0.732/0.25	2
7	Heme oxygenase 1	P14901	32911	3.2/0.05	1.49/0.23	5.35/0.02		2
8	Heme oxygenase 1	P14901	32911	1.96/0.001	1.93/0.02	2.25/0.04	1.265/0.05	4
9	Heme oxygenase 1	P14901	32911	1.7/0.22	2.1/0.11	1.16/0.75	1.049/0.70	1
10	S-formylglutathione hydrolase	Q9R0P3	31302	1.47/0.03	1.84/0.03	1.23/0.41	0.958/0.70	2
11	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	O09172	30517	1.3/0.04	1.35/0.01	2.38/0.002	0.929/0.15	3
Mitochondrion								
12	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Q8K3J1	24039	0.97/0.6	0.6/0.002	0.98/0.96	0.89/0.14	8
13	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Q9DCT2	30131	1.55/0.03	1.1/0.5	0.8/0.15	0.86/0.06	4
14	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Q9CZ13	52834	1.4/0.005	1.4/0.007	0.72/0.11	1.142/0.21	6
15	Elongation factor Tu, mitochondrial	Q8BFR5	49491	1.3/0.27	1.6/0.05	1.16/0.31	0.797/0.06	3
16	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	P26443	61320	1.016/0.92	1.345/0.1	1.1/0.56	0.99/0.88	2
17	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	P26443	61320	1.32/0.01	1.44/0.04	0.77/0.19	1.095/0.82	2
Cell signalling								
18	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22833	0.73/0.02	0.70/0.01	1.048/0.74	0.973/0.48	3
19	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22833	0.77/0.25	0.606/0.07	0.94/0.8	0.902/0.02	3
20	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	23390	0.67/0.004	0.73/0.04	0.70/0.09	0.947/0.50	4
21	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	23390	0.81/0.07	0.78/0.02	0.95/0.54	0.977/0.40	7
22	Inositol monophosphatase 1	O55023	30437	0.66/0.003	0.67/0.01	0.97/0.74	1.065/0.46	8
23	14-3-3 protein zeta/delta	P63101	27772	0.67/0.06	0.4/0.05	0.80/0.25	0.933/0.16	10
24	14-3-3 protein beta/alpha	Q9CQV8	28069	0.77/0.11	0.66/0.04	0.84/0.55	0.971/0.80	2
25	14-3-3 protein gamma	P61982	28285	0.805/0.004	0.77/0.06	0.74/0.60	1.088/0.42	5
26	14-3-3 protein gamma	P61982	28285	0.77/0.2	0.49/0.015	0.88/0.66	1.09/0.32	7
27	14-3-3 protein beta/alpha	Q9CQV8	28069	0.89/0.45	0.91/0.67	0.91/0.68	0.889/0.25	4
28	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P08752	40472	0.6/0.01	0.55/0.005	0.89/0.23	0.882/0.50	4
29	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P08752	40472	0.8/0.06	0.78/0.11	0.88/0.29	0.924/0.32	5
30	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Q9Z1Z2	38425	0.75/0.02	0.65/0.01	0.98/0.94	0.946/0.52	4

Central metabolism

31	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P14152	36512	0.61/0.045	0.62/0.01	0.9/0.53	0.906/0.19	5
32	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P14152	36512	0.79/0.2	0.63/0.03	1.077/0.61	0.88/0.11	9
33	Alpha-enolase	P17182	47124	0.96/0.65	0.82/0.05	0.87/0.54	0.76/0.08	3
34	Alpha-enolase	P17182	47124	0.9/0.3	0.8/0.05	0.85/0.36	0.942/0.64	3
35	Galactokinase	Q9R0N0	42158	0.77/0.015	0.5/0.001	0.91/0.33	1.011/0.85	5
36	L-lactate dehydrogenase A chain	P06151	36481	0.8/0.03	0.85/0.11	0.80.01	1.066/0.23	7

Protein production and folding

37	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	P63242	16815	0.84/0.2	0.43/0.01	1.07/0.50	0.874/0.14	2
38	Elongation factor 1-beta	O70251	24676	0.7/0.06	0.5/0.015	0.7/0.45	1.023/0.87	5
39	Elongation factor 1-beta	O70251	24676	1.1/0.57	0.8/0.5	0.66/0.45	1.14/0.23	2
40	Elongation factor 1-delta	P57776	31275	0.70/0.07	0.48/0.01	1.033/0.93	1.167/0.21	4
41	Elongation factor 1-delta	P57776	31275	0.79/0.16	0.7/0.1	0.97/0.94	1.059/0.27	4
42	60S acidic ribosomal protein P0	P14869	34256	1.98/0.05	2.3/0.001	2.6/0.007	0.814/0.27	2
43	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P57759	28807	1.33/0.08	1.78/0.01	0.88/0.46	0.875/0.80	5
44	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17954	0.66/0.23	0.5/0.02	1.23/0.57	0.828/0.20	2
45	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17954	0.5/0.03	0.65/0.15	0.88/0.34	0.993/0.92	1

Cytoskeleton and intracellular traffic

46	Tropomyosin alpha-3 chain	Q63610	28989	0.5/0.07	0.45/0.05	0.87/0.30	1.15/0.24	6
47	Tropomyosin alpha-3 chain	Q63610	28989	0.84/0.49	0.825/0.45	1.03/0.67	0.845/0.03	12
48	Vimentin	P20152	53671	0.9/0.22	0.77/0.05	0.643/0.13	0.944/0.40	8
49	V-type proton ATPase subunit H	Q8BVE3	55838	0.77/0.09	0.69/0.01	1.054/0.80	0.835/0.12	2
50	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	Q9R0Q3	22687	1.55/0.04	1.6/0.01	1.13/0.77	1.135/0.26	3

Miscellaneous

51	Chloride intracellular channel protein 1	Q9Z1Q5	26996	0.79/0.09	0.71/0.03	1.09/0.58	0.85/0.14	4
52	Chloride intracellular channel protein 1	Q9Z1Q5	26996	0.86/0.23	0.7/0.03	0.98/0.57	0.982/0.61	5
53	EF-hand domain-containing protein D2	Q4FZY0	26742	0.87/0.21	0.69/0.008	1.025/0.84	1.038/0.62	2
54	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	28768	0.75/0.06	0.66/0.02	0.99/0.95	0.984/0.85	2
55	Farnesyl pyrophosphate synthase	Q920E5	40565	0.8/0.001	0.8/0.04	0.8/0.14	0.984/0.87	2
56	Poly(rC)-binding protein 1	O19048	37480	0.76/0.02	0.79/0.003	1.2/0.24	1.084/0.46	1
58	Ubiquitin thioesterase OTUB1	Q7TQI3	31253	0.77/0.04	0.66/0.04	1.02/0.83	1.015/0.80	2
59	Adenosylhomocysteinase	P50247	47671	0.47/0.004	0.65/0.02	0.9/0.51	0.958/0.47	11
60	Adenosylhomocysteinase	P50247	47671	0.77/0.01	0.78/0.008	1.14/0.03	1.056/0.65	21

Other proteins

61	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17954	0.75/0.15	0.78/0.18	1.012/0.95	0.981/0.74	13
62	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P09671	24585	1.17/0.22	1.08/0.75	0.38/0.11	1.347/0.53	4
63	Peroxiredoxin-2	Q61171	21761	0.92/0.62	0.70/0.23	1.03/0.72	1.02/0.73	7
64	Peroxiredoxin-3	P20108	28109	1.41/0.10	1.30/0.22	1.13/0.12	0.976/0.73	6
65	Ferritin light chain 1	P29391	20785	1.29/0.09	1.31/0.25	1.62/0.025	1.18/0.05	9
66	Eukaryotic initiation factor 4A-III	P38919	46824	1.046/0.75	1.13/0.38	0.97/0.88	0.933/0.55	20
67	Elongation factor 1-gamma	Q9D8N0	50043	1.004/0.98	0.952/0.73	1.0/0.99	0.964/0.65	16

*The accession numbers are those of the SwissProt Database.

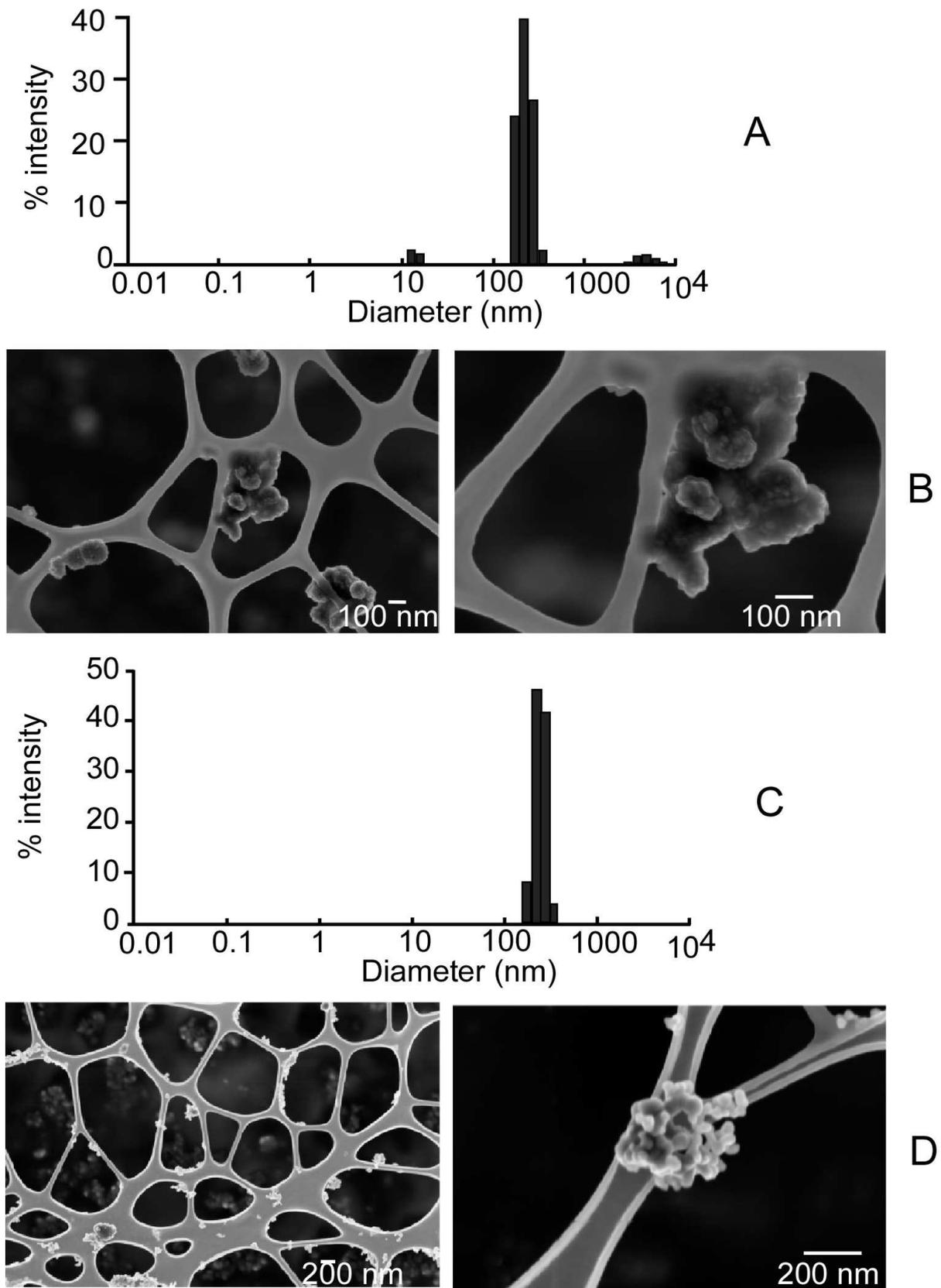


Fig.1

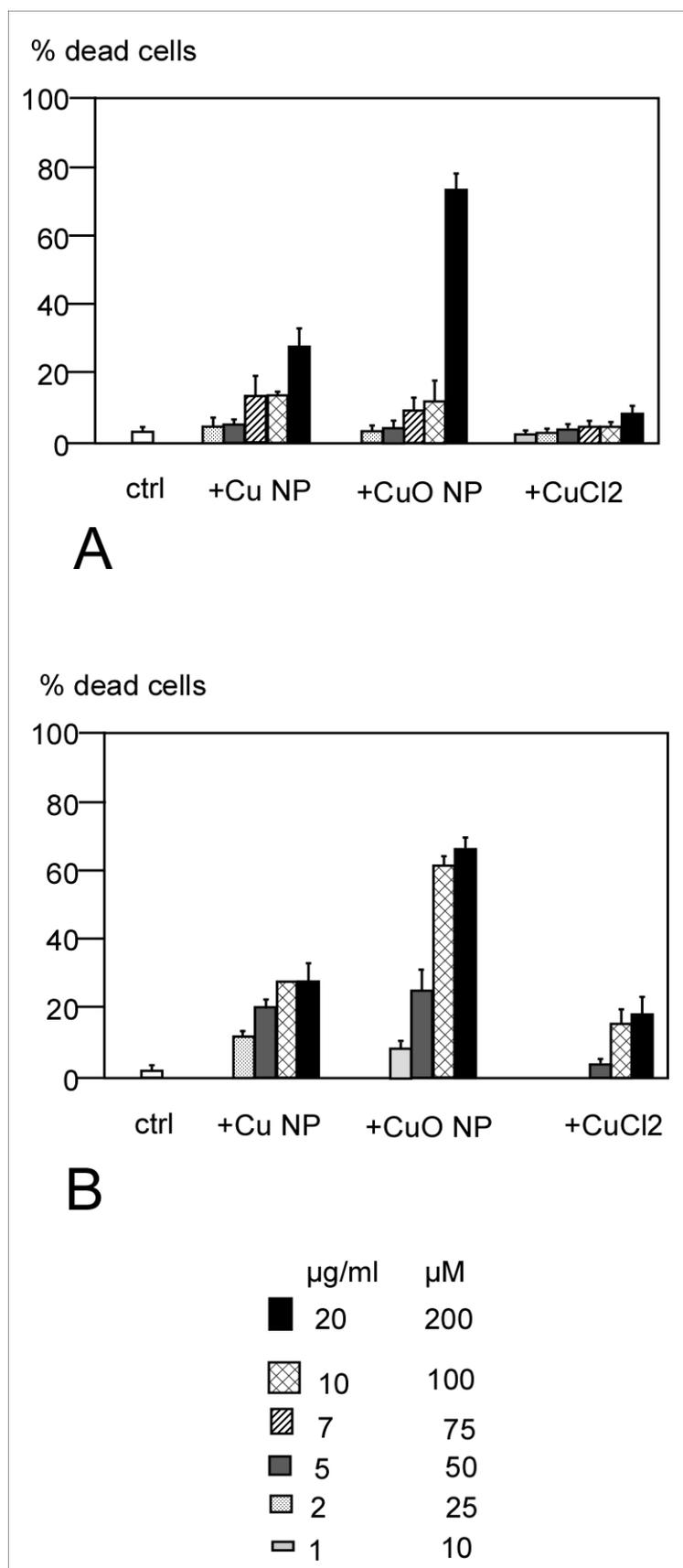


Fig.2

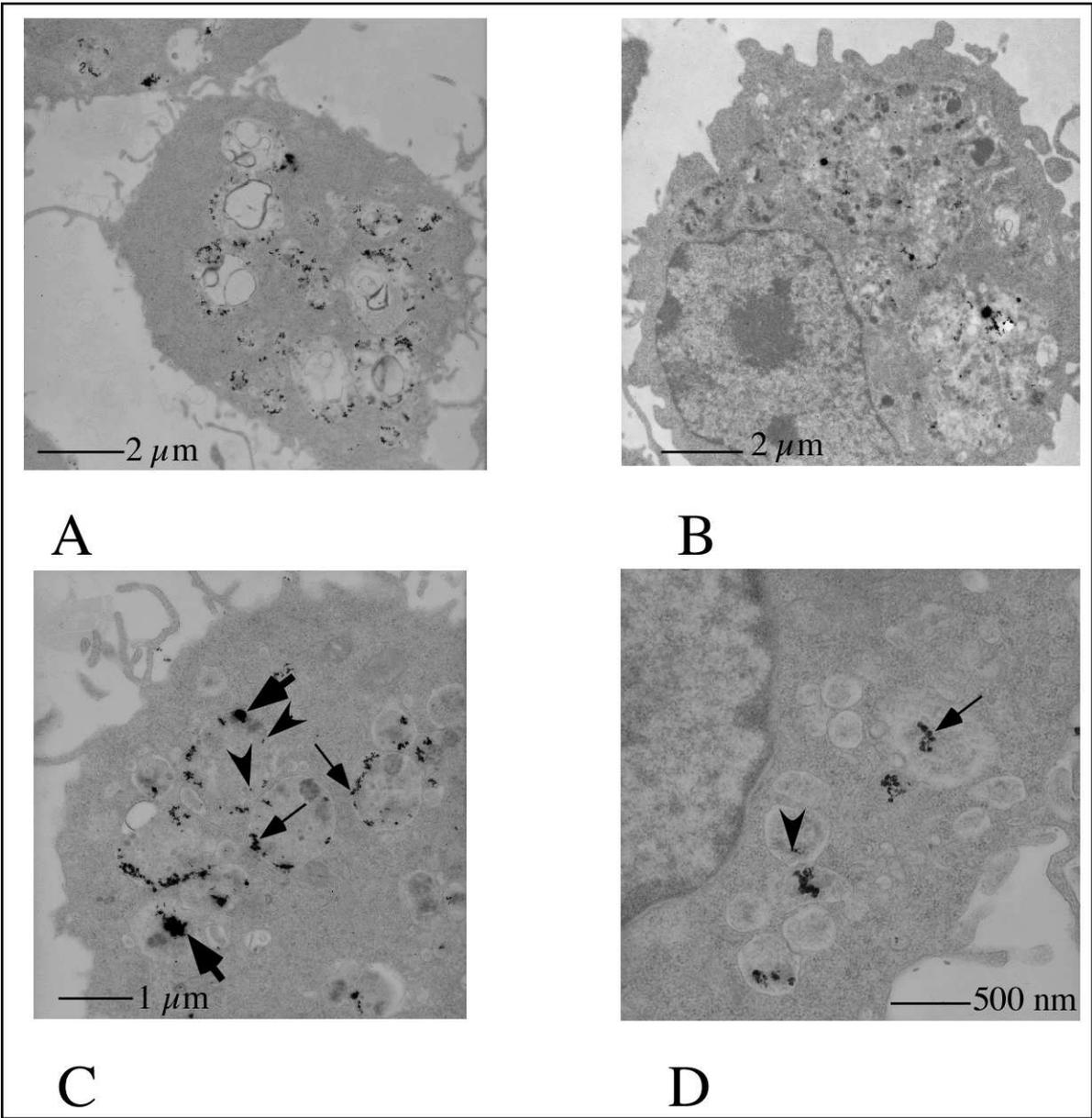


Fig.3

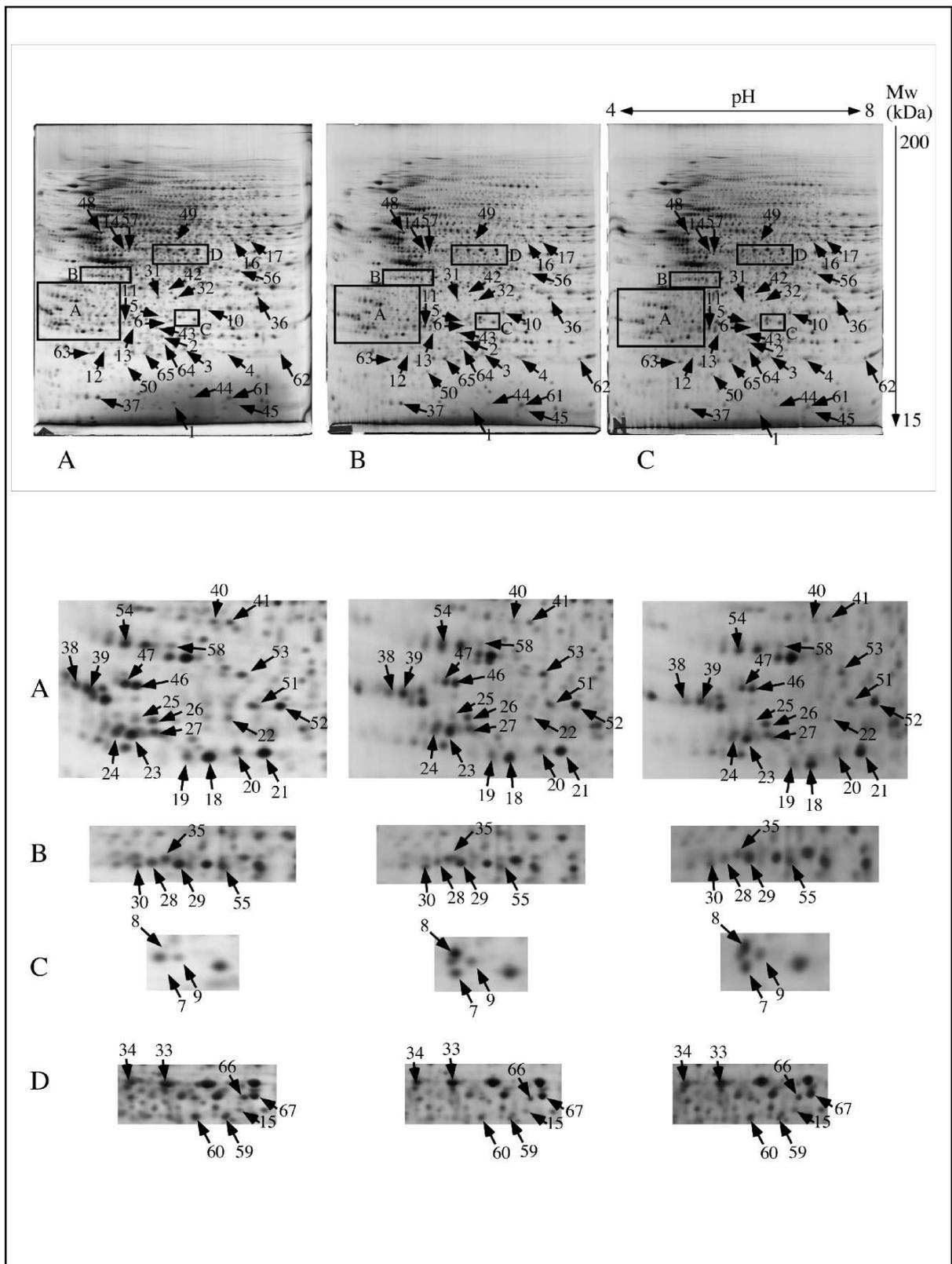


Fig.4

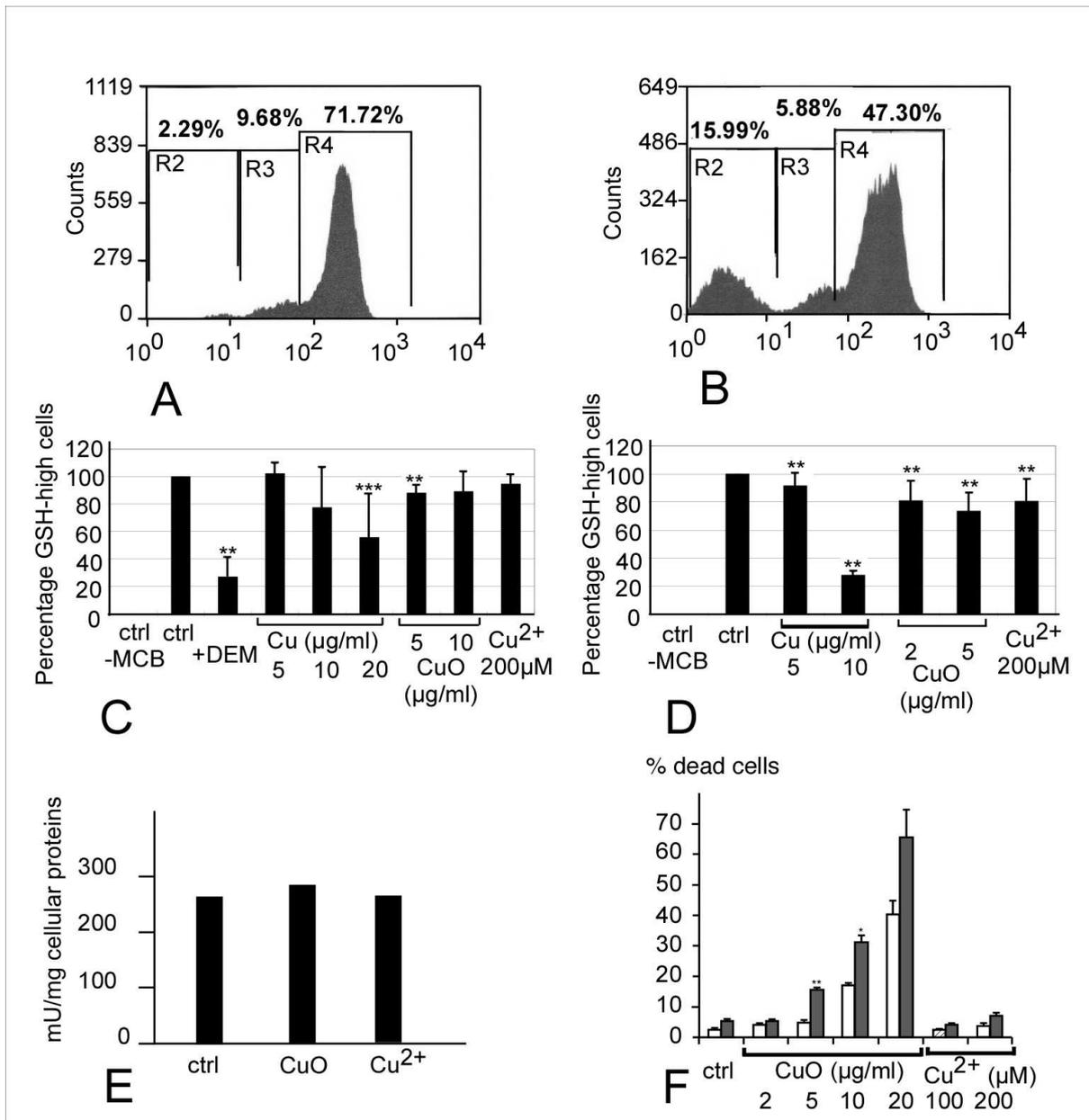


Fig.5

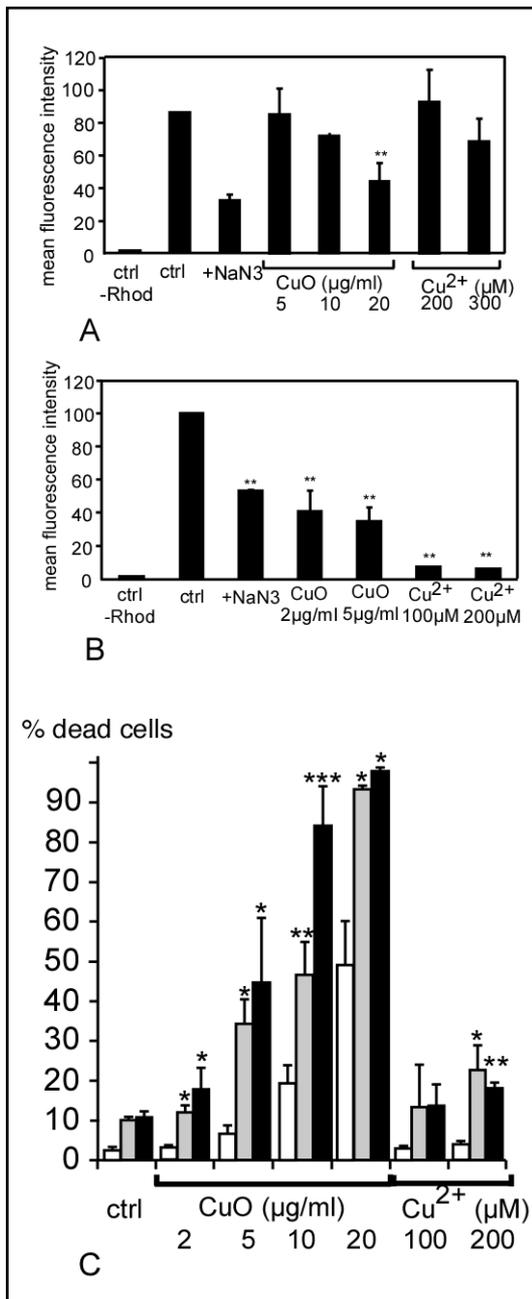


Fig. 6

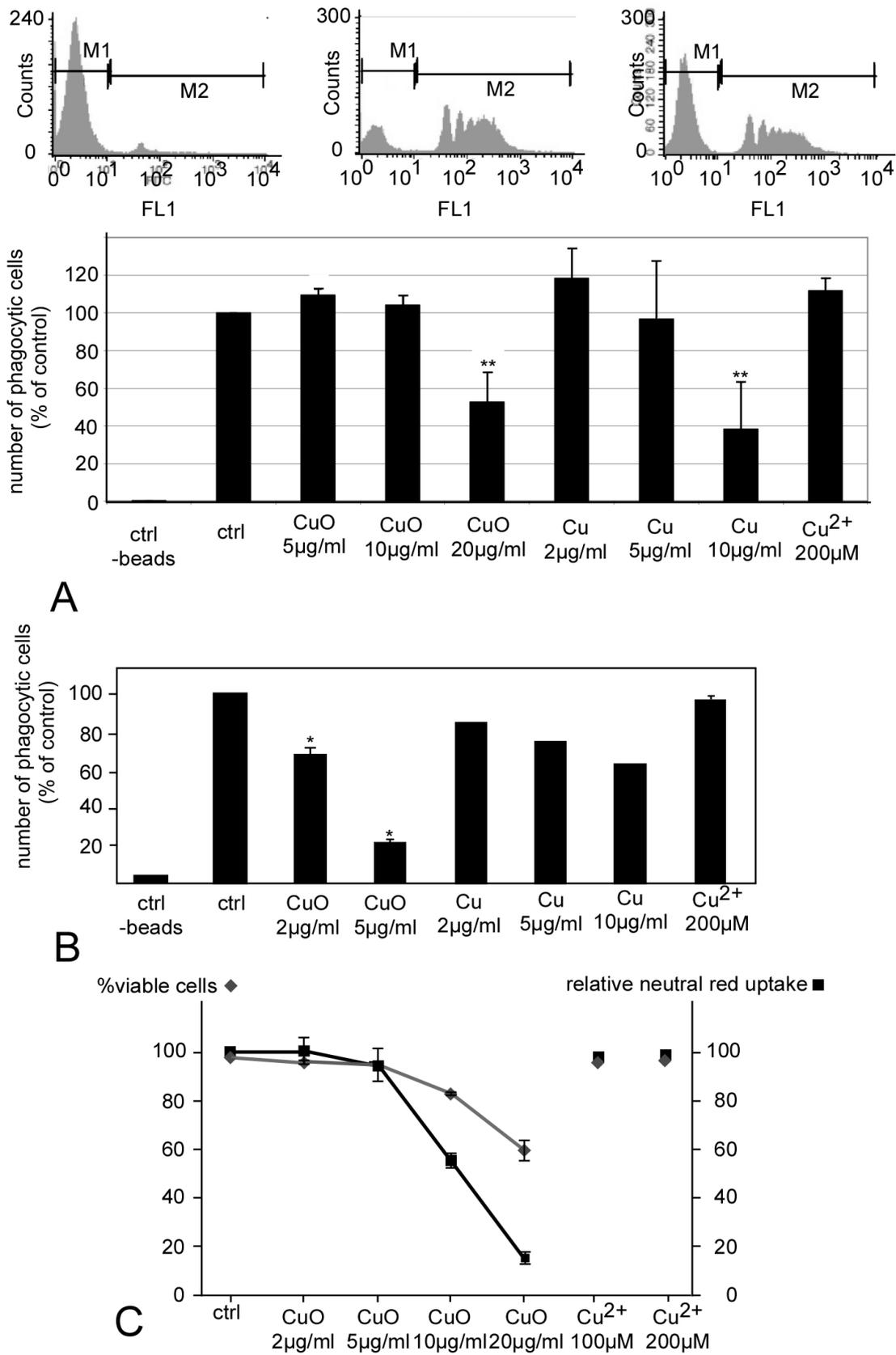


Fig. 7

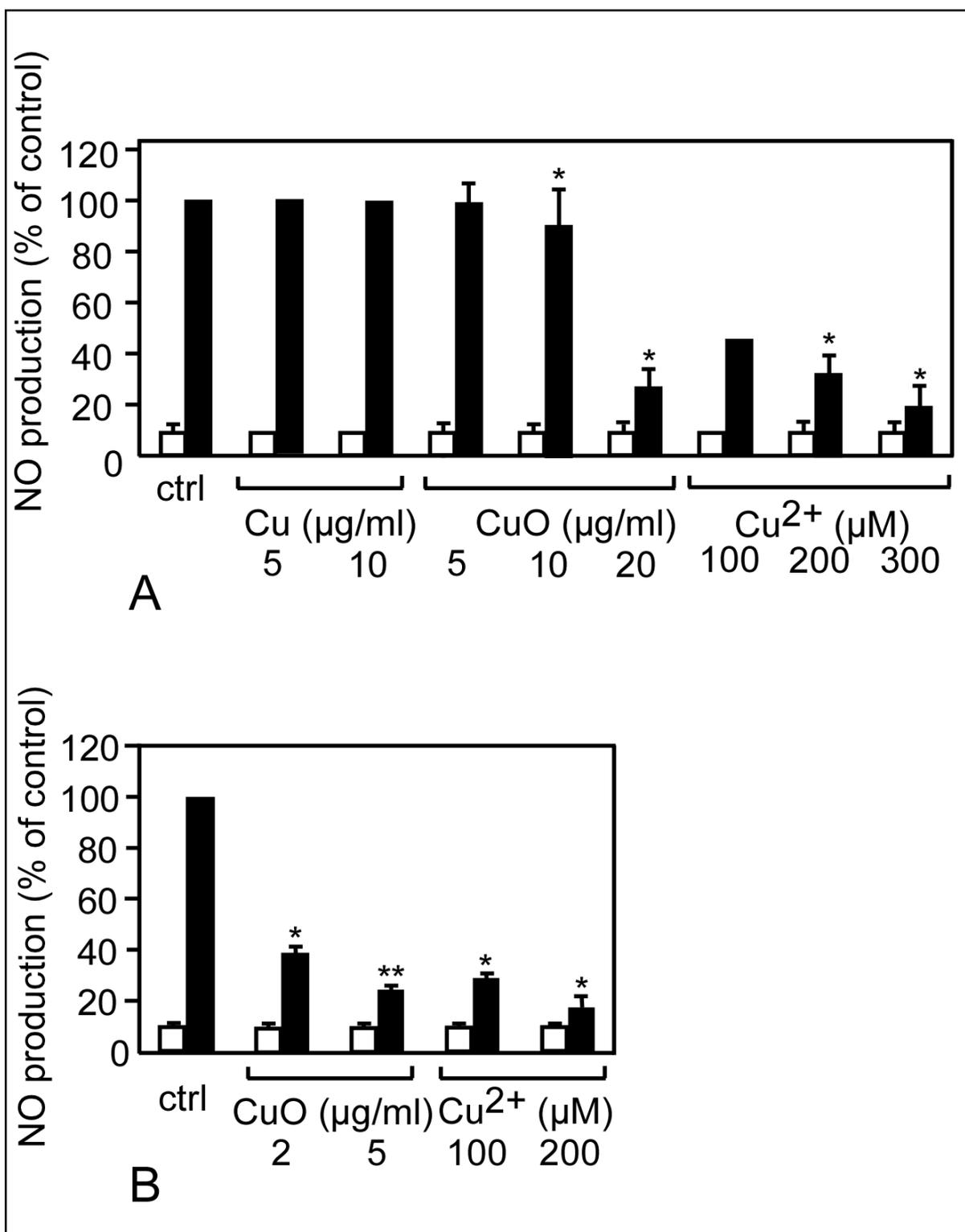


Fig.8

ANNEXE 2 : POSTER DES CONGRES HUPO ET SMAP 2011

Effect Of Copper Nanoparticles On Murine Macrophages

P1135

S. Triboulet^{1*}, C. Aude-Garcia¹, V. Collin-Faure¹, D. Diallo¹, H. Diemer², A. Van Dorsselaer², T. Rabilloud¹

¹CEA/DSV/iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-UJF-CEA 5249, Grenoble, ²IPHC, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR CNRS-Université de Strasbourg 7178, Strasbourg, France

Introduction:

Metallic nanoparticles are more and more widely used (cosmetics, industrial processes...). However, so far, few data are available on their potential impact on health and environment. Thus, it is necessary to study cellular responses to these particles. In this study we analyzed the effects of copper nanoparticles (Cu-NP) on the total proteome of RAW264.7 murine macrophage cell line.

Results:

Among the 2292 detected spots, 28 significant changes were observed: 17 proteins were induced, 11 repressed. The MS identifications suggest that Cu-NP induce oxidative stress and changes in signal transduction, translation machinery, mitochondrial metabolism.... Flow cytometry assays show a decrease in intracellular reduced glutathione levels, and an inhibition of phagocytosis.

Conclusions:

Cu-NP toxicity on macrophages may be mediated by oxidative stress along with alterations in central metabolism and protein biosynthesis processes. The macrophages phagocytosis ability is also decreased. Although more research needs to be carried out, these data provide new insights on the effects of the concerned nanoparticles on immune cells.

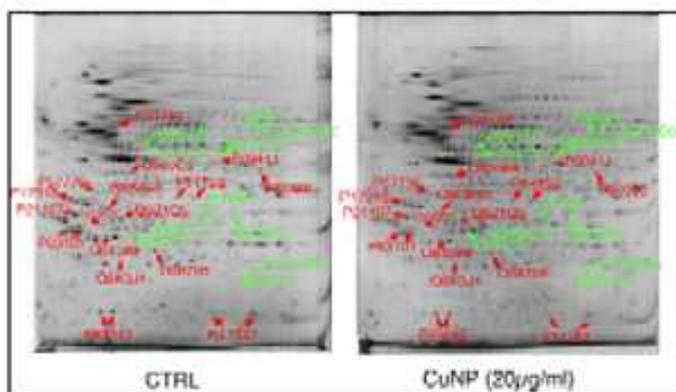


Figure 1: 2-DE gels loaded with 120 µg of total proteins. 1st dimension on 4 mm-wide strips of linear gradient pH 4-8, 4.5% acrylamide. 2nd dimension on 10% acrylamide gels, stained with silver nitrate. Red: decreased. Green: increased.

Materials and Methods:

Proteomic analyses were conducted by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (LC/MS/MS on an Amazon ion trap with a 7 minutes gradient). Gel images were analyzed with the Delta-2D software v.3.6. Targeted assays and functional analyses were also performed using flow cytometry: glutathione levels were measured using the monochlorobimane reagent, and phagocytosis was assayed using 1µm fluorescent beads.

Protein Name	Accession No.	Log2 (CuNP/CTRL)	P-value
Protein production and folding			
Protein Disulfide Isomerase (PDI)	P07203	0.82	0.02
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	1.20 (2.3 CuNP)	0.001*
Protein tyrosine phosphatase (PTP)	P00558	0.48	0.02
Mitochondrial			
Heat shock protein 90 alpha class B member 1 (HSP90α)	P08217	0.97 (0.56 CuNP)	0.002*
Heat shock protein 90 alpha class B member 2 (HSP90β)	P08218	0.96	0.02
Complex III subunit 1 (Cyt b560)	P00124	1.4	0.003
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	1.20 (2.30 CuNP)	0.001*
Heat shock protein 90 alpha class B member 2 (HSP90β)	P08218	1.00	0.01
Central metabolism			
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	P00500	0.81	0.04
Phosphoglucomutase 1 (PGC)	P00500	0.80	0.14
Phosphoglucomutase 2 (PGC2)	P00500	1.20 (2.30 CuNP)	0.001*
Oxidative stress response			
Protein disulfide isomerase (PDI)	P07203	0.82 (0.76 CuNP)	0.002*
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	0.70	0.04
Heat shock protein 90 alpha class B member 1 (HSP90α)	P08217	0.96	0.01
Heat shock protein 90 alpha class B member 2 (HSP90β)	P08218	0.46	0.02
Catalase (CAT)	P00041	0.30	0.04
Signal transduction			
Protein tyrosine phosphatase (PTP)	P00558	0.70	0.02
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	1.20 (2.30 CuNP)	0.001*
Heat shock protein 90 alpha class B member 1 (HSP90α)	P08217	0.91	0.01
Cytoskeleton			
Tubulin beta-3 class III (TUBB3)	P00041	0.14	0.01
Actin (ACTA1)	P00041	0.44 (0.41 CuNP)	0.001*
Mitochondria			
Protein tyrosine phosphatase (PTP)	P00558	0.70 (0.66 CuNP)	0.02*
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	1.20 (2.3 CuNP)	0.001*
Heat shock protein 90 alpha class B member 1 (HSP90α)	P08217	0.46	0.02
Heat shock protein 90 alpha class B member 2 (HSP90β)	P08218	0.70	0.02
Heat shock protein 70 (HSP70)	P04621	0.70	0.004
Heat shock protein 90 alpha class B member 1 (HSP90α)	P08217	0.70	0.02

Table 1: List of the 28 modified proteins upon Cu-NP treatment and their corresponding pathways.

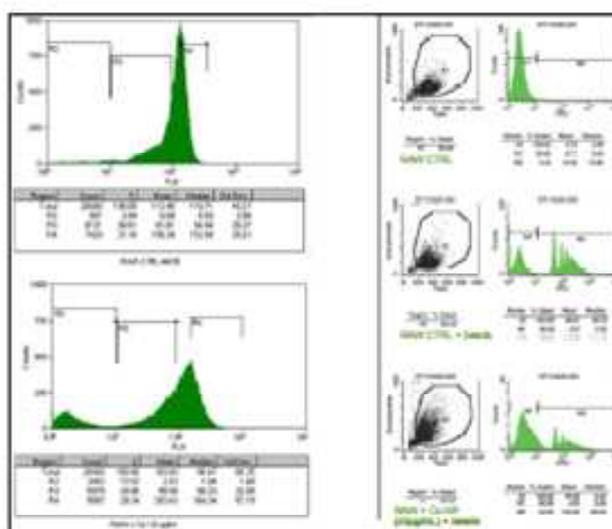


Figure 2: Flow cytometry histograms showing a decrease in reduced glutathione (GSH) level (left panel) and a decrease in phagocytosis rate (right panel) after Cu-NP treatment.

ANNEXE 3 : POSTER DE L'ECOLE D'ETE EN PROTEOMIQUE 2012

Effect Of Metal-based Nanoparticles On Murine Macrophages

S. Triboulet^{1,*}, C. Aude-Garcia¹, V. Collin-Faure¹, D. Diallo¹, H. Diemer², A. Van Dorsselaer², T. Rabilloud¹

¹CEADSV/iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-UJF-CEA 5249, Grenoble, ²IPHC, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR CNRS-Université de Strasbourg 7178, Strasbourg, France

Introduction:

Metallic nanoparticles (NP) are more and more widely used (cosmetics, industrial processes, ...). However, so far, few data are available on their potential impact on health and environment. Thus, it is necessary to study cellular responses to these particles. In this study we analyzed the effects of copper-based nanoparticles (Cu and Cu-NP) on the total proteome of RAW264.7 and J774A.1 murine macrophage cell lines. The proteomic approach was combined to classical biochemical assays to confirm and validate the data.

Materials and Methods:

Proteomic analyses were conducted by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (LC/MS/MS on an Amazon ion trap with a 7 minute gradient). Gel images were analyzed with the Delta-2D software v.3.5. Targeted assays and functional analyses were also performed using flow cytometry: glutathione levels were measured using the monochlorobimane reagent, phagocytosis rates were evaluated using 1 μm fluorescent beads, and mitochondrial transmembrane potential variations were extracted using Rhodamine 123. Nitric oxide production upon LPS induction was also assayed using Griess reagent. All targeted assays were performed on primary macrophages as well.

Results:

Among the 2262 detected spots on the RAW264.7 cell line, 26 significant changes were observed: 17 proteins were induced, 11 repressed. The MS identifications suggest that Cu-NP induce oxidative metabolism, cytoskeleton, translation machinery, mitochondrial metabolism, cytoskeleton... Similar results were obtained for the J774A.1 cell line. Flow cytometry assays show a decrease in intracellular reduced glutathione levels and mitochondrial potential, and an inhibition of phagocytosis and NO production. These effects appear to be specifically followed by the NP, as no or little effect was observed upon ion treatment. These results were confirmed on primary cells.

Conclusions:

Copper-based NP toxicity on macrophages may be mediated by oxidative stress along with alterations in central metabolism and protein biosynthesis processes. The macrophages phagocytosis and NO production abilities, which are essential functions in their role of organism defense, are also decreased. Although more research needs to be carried out, these data provide new insights on the effects of the concerned nanoparticles on immune cells.

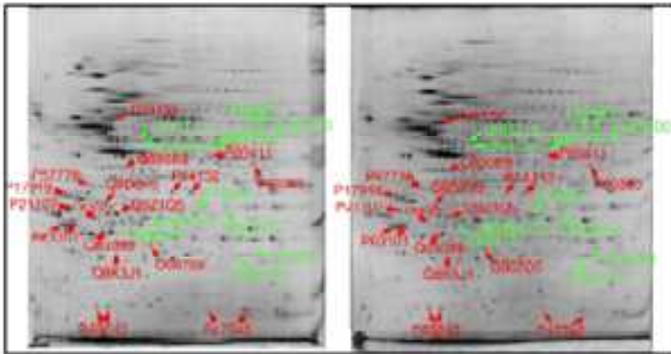


Figure 1: 2-DE gels loaded with 120 µg of total proteins of RAW264.7 cell line. 1st dimension on 4 mm-wide strips of linear gradient pH 4-6, 4.5% acrylamide. 2nd dimension on 10% acrylamide gels, stained with silver nitrate. Red: decreased. Green: increased.

Accession	Protein name	MS/MS	MS/MS change	P value
Protein production and folding				
P08446	Inhibitor factor 1A1	8	0.48	0.02
P07726	Coagulation factor 1 alpha	4	0.78 (0.48/Cu)	0.001
P11742	Protein disulfide isomerase	2	0.68	0.02
Metabolism				
Q9BQJ1	NADH dehydrogenase Complex 11 beta	2	0.67 (0.59/Cu)	0.001
Q9DQ72	NADH dehydrogenase Complex 11 beta	1	1.55	0.01
Q9DQ77	Complex III subunit 1	1	1.4	0.008
Q9B791	Wyo-1 ubiquitin ligase Tu	4	1.23 (1.48/Cu)	0.001
Q9D443	Succinate dehydrogenase 1	4	1.33	0.01
Cellular metabolism				
P11212	Glucose dehydrogenase	2	0.91	0.03
Q9D116	Phosphoglycerate kinase	2	0.85	0.19
Q9D219	Phosphoenolpyruvate carboxylase	2	1.26 (1.08/Cu)	0.001
Oxidative stress response				
Q9B739	Protein disulfide isomerase 1	1	0.50 (0.75/Cu)	0.001
Q9D760	Protein disulfide isomerase 1	4	0.76	0.05
P11881	Glucose dehydrogenase	1	1.48	0.001
Q9D493	Glucose dehydrogenase cytosolic	1	1.85	0.001
Q9D119	Glucose dehydrogenase (cytosolic)	4	1.31	0.04
Signal transduction				
Q9D104	RacGDI 2	1	0.75	0.02
Q9D103	Insulin-like growth factor 1	2	0.82	0.001
Q9D101	IGF-3 protein precursor	2	0.77 (0.48/Cu)	0.01
Q9D075	Farnesyl transferase gamma	2	0.81	0.001
Cytoskeleton				
P07107	Tropomyosin alpha 3	2	0.70	0.01
Q9D102	Vimentin	8	0.84 (0.61/Cu)	0.001
Protein synthesis				
P11896	PCNA	2	0.75 (0.86/Cu)	0.001
Q9D114	Protein synthesis factor 2	1	1.23 (2.13/Cu)	0.01
Q9D424	Protein synthesis factor 2	1	1.85	0.001
Q9D726	Protein synthesis factor 2	1	1.74	0.001
Q9D091	EF-1A1 domain-containing protein 2B	2	0.72	0.001
Q9D092	EF-1A1 domain-containing protein 2B	2	0.72	0.001

Table 1: List of the 26 modified proteins on RAW264.7 cell line upon Cu-NP treatment, and their corresponding pathways.

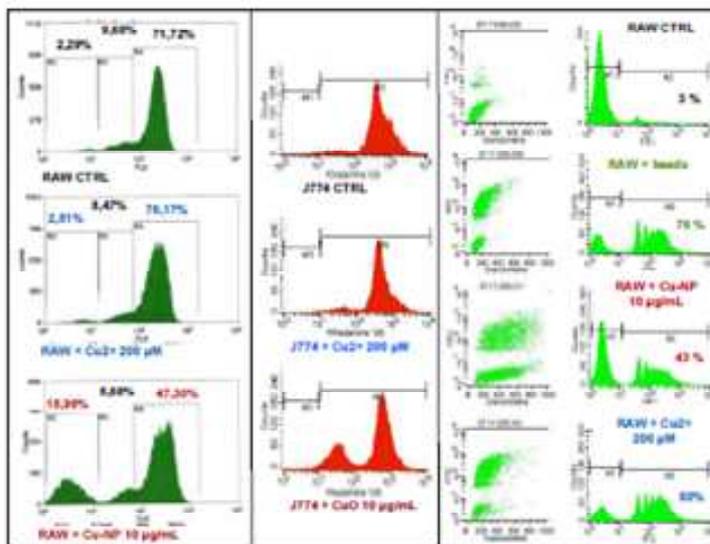


Figure 2: Flow cytometry histograms showing a decrease in reduced glutathione (GSH) level (left panel), a decrease in the mitochondrial transmembrane potential (middle panel) and a decrease in phagocytosis rate (right panel) after copper-based NP treatment. No effect is observed with Cu²⁺ ion treatment.

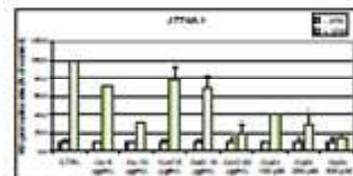


Figure 3: Griess reagent assay on J774A.1 cell line. Histograms showing a decrease in nitric oxide (NO) production after Cu- and Cu-NP treatment.

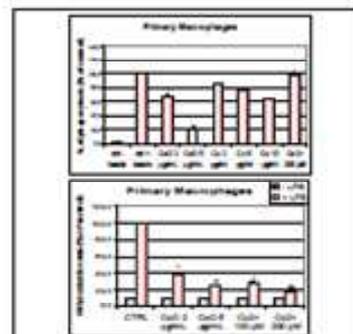


Figure 4: Validation on mice primary macrophages. Histograms showing a dose-dependent decrease in phagocytosis rate (top) and in NO production rate (bottom) after Cu- and Cu-NP treatment.

RESUME

Les nanoparticules (NP) métalliques occupent une place de plus en plus importante, tant dans les procédés industriels que dans la recherche biomédicale. Néanmoins, les données sur leur toxicité potentielle pour les organismes vivants restent insuffisantes, notamment à l'échelle moléculaire. Des exemples historiques montrent que certaines pathologies, comme la silicose et l'asbestose, peuvent être engendrées par l'exposition chronique à des particules inorganiques (silice et fibres d'amiante). Dans les deux cas, la réponse des macrophages alvéolaires est en grande partie responsable de la maladie. Les macrophages sont en effet la première ligne de défense (immunité innée) contre toute attaque exogène, pathogène ou non, du fait de leurs fortes capacités phagocytaires et de leurs propriétés inflammatoires. Ainsi, les objectifs de ces travaux étaient d'étudier les effets de deux types de NP métalliques (Cu/CuO et ZnO) sur deux lignées cellulaires de macrophages murins. Cette étude a été réalisée par une approche protéomique basée sur l'électrophorèse 2D et la spectrométrie de masse, permettant d'accéder de façon reproductible à des données mécanistiques. Les données obtenues ont été validées par plusieurs approches ciblées de biologie cellulaire, sur les lignées ainsi que sur des macrophages primaires. Nos résultats montrent que les deux types de NP engendrent des réponses différentes, bien que leur degré élevé de cytotoxicité soit similaire. Les NP de cuivre induisent un stress oxydant et une réponse mitochondriale intenses, associées à de fortes perturbations de la phagocytose et de la production de certains médiateurs de l'inflammation. Cette toxicité semble être essentiellement liée aux propriétés redox du cuivre, et est spécifique de la forme nanoparticulaire. A l'inverse, le zinc induit des réponses modérées sur les mêmes processus, n'affectant pas *a priori* le rôle immunitaire des macrophages. Cette toxicité n'est pas non plus spécifique des NP, les ions ayant des effets très étendus, liés à leurs interactions avec de nombreuses protéines, perturbant leur fonctionnement normal jusqu'à induire la mort cellulaire. L'ensemble de ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires expliquant la toxicité de ces NP.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles (NPs) are more and more widely used, from industrial processes to biomedical research. However, data on their potential toxicity towards organisms are still lacking, especially regarding molecular mechanisms. It has been proven that some inorganic particles can lead to diseases when tissues are chronically exposed. In the case of pulmonary silicosis and asbestosis, induced by silica particles and asbestos fibers, chronic inflammation through alveolar macrophages is responsible for the disease. Indeed, macrophages are the first defense against exogenous attacks, like pathogens or inorganic compounds, which are eliminated through phagocytosis and inflammatory processes that are part of the innate immune response. Thus, this study aimed at analyzing the molecular effects of both copper- and zinc-based NPs (Cu/CuO and ZnO) on murine macrophages cell lines. To this end, a reproducible proteomic-based approach using 2D electrophoresis and mass spectrometry was used. The proteomic data were validated using targeted approaches on both cell lines and primary macrophages. Our results show that both NPs exert similar high cytotoxicity, but the molecular responses are markedly different. Copper-based NPs strongly induce oxidative stress as well as alterations in mitochondrial metabolism, phagocytosis, and inflammatory mediators' production. These effects seem to be mostly related to the redox properties of copper, and are specific to the NP form. Conversely, zinc induced limited effects on the same processes, thus leading to no significant alterations in macrophages' immune functions. These effects are not NP-specific, since Zn²⁺ ions seem to exert most of them, probably due to their ability to interact with numbers of proteins, slightly altering their normal functions, and eventually leading only to cell death without prior functional alterations. This study allowed us to highlight some molecular mechanisms of both NP's toxicity.