



[60]Fullerène et dérivés : critères de pureté et impact fonctionnel in vivo sur les mitochondries, in vitro et ex vivo sur les cellules de l'allergie

Sanaz Keykhosravi

► **To cite this version:**

Sanaz Keykhosravi. [60]Fullerène et dérivés : critères de pureté et impact fonctionnel in vivo sur les mitochondries, in vitro et ex vivo sur les cellules de l'allergie. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2019. Français. NNT : 2019SACLS047 . tel-02275801

HAL Id: tel-02275801

<https://theses.hal.science/tel-02275801>

Submitted on 2 Sep 2019

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.

[60]Fullerène et dérivés : critères de pureté et impact fonctionnel *in vivo* sur les mitochondries, *in vitro* et *ex vivo* sur les cellules de l'allergie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°571: Sciences Chimiques: Molécules, Matériaux,
Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 11/02/2019, par

Sanaz KEYKHOSRAVI

Composition du Jury :

Philippe Maître Docteur, Université Paris-sud, Paris-saclay	Président du jury
Hassan Allouchi Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Tours	Rapporteur
Samy Gobaa Docteur, Institut Pasteur, Plateforme TBM	Rapporteur
Ivo Rietveld Docteur, Université Paris Descartes	Examineur
Fathi Moussa Professeur, Université Paris-sud, Paris-saclay	Directeur de thèse
Pascal Poncet Docteur, Institut Pasteur, Allergie & Environnement	Co-encadrant
Hélène Sénéchal Docteur, Hôpital Armand-Trousseau, Allergie & Environnement	Membre invité
Abdelhamid Slama Docteur, Hôpital Kremlin-Bicêtre, Laboratoire de Biochimie	Membre invité

Titre : Fullerène et dérivés : critères de pureté et impact fonctionnel *in vivo* sur les mitochondries, *in vitro* et *ex vivo* sur les cellules de l'allergie

Mots clés : Fullerène, allergie, antioxydant, mitochondrie, basophiles, C₆₀

Résumé :

En 1985 Kroto décrit le troisième allotrope du carbone, le fullérène, une sphère de 60 carbones d'1nm de diamètre aux caractéristiques physico-chimiques particulières. La réactivité chimique du C₆₀ est dominée par les réactions d'addition et sa grande affinité pour les radicaux libres grâce à ses 30 double-liaisons. Cette propriété a été explorée dans le stress oxydant, tant *in vitro* qu'*in vivo*, où l'équilibre redox est impliqué, comme dans les situations pathophysiologiques impliquant l'inflammation et la dégénérescence cellulaire. En particulier, un traitement au C₆₀ solubilisé dans de l'huile a permis de prolonger l'espérance de vie chez le rat. Le produit, commercialisé à travers le monde, n'a pas encore fait l'objet d'essai clinique. D'autre part certaines préparations peuvent contenir des impuretés. Il est donc important d'établir des critères de pureté et d'intégrité des préparations de C₆₀.

Ce travail de thèse comporte deux parties. La première, physicochimique, nous a permis d'évaluer la pureté de préparations commerciales de C₆₀ de différentes origines faisant appel à différentes techniques d'analyse: microscopie électronique à balayage, diffraction aux rayons X, calorimétrie différentielle à balayage (DSC), analyse thermogravimétrique (ATG), chromatographie liquide (CLHP) ou en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), ainsi que la spectroscopie ultraviolet-visible ou infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La DSC est la technique de choix pour établir le critère de pureté et la FTIR la plus rapide. La CG-SM est nécessaire à l'identification des impuretés volatiles, tandis que la CLHP permet de détecter les fullérènes lourds et les dérivés du C₆₀.

La deuxième partie a porté sur des aspects fonctionnels des fullérènes et nous avons, pour cela, utilisés des préparations pures selon les critères définis précédemment. Dans un premier temps, nous avons cherché à préciser le sous-compartiment cellulaire ciblé par le C₆₀ injecté *in vivo* chez la souris.

Après administration d'une solution huileuse, les molécules de C₆₀ sont retrouvées dans le foie et la rate, à l'intérieur des cellules, parfois au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique. La présence des molécules de C₆₀, au niveau des mitochondries a été corroboré par la mise en évidence de modifications spécifiques d'activité des enzymes de la mitochondrie (malate déshydrogénase et complexe I de la chaîne respiratoire).

Dans un deuxième temps, nous avons abordé l'effet des fullérènes sur des cellules intervenant dans une dysrégulation immunologique où l'inflammation joue un rôle important : l'allergie. L'évènement cellulaire à l'origine des symptômes allergiques est la libération de médiateurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire lors de l'activation dépendante des IgE des basophiles et des mastocytes. L'effet régulateur de C₆₀ et de quatre dérivés hydrosolubles, le fullérol, la β -cyclodextrine C₆₀, le dendro C₆₀ et le C₆₀ serinol-malonate, a été testé. L'innocuité des dérivés à des concentrations nanomolaires et leur pouvoir inhibiteur sur la dégranulation IgE et non IgE dépendante des lignées mastocytaires de rat a été vérifié *in vitro*. Dans un test d'activation cellulaire mesurant l'expression des marqueurs CD63 et CD203c par cytométrie de flux, nous montrons que les différents dérivés sont capables d'interférer *ex vivo* avec l'activation de basophiles de patients allergiques dans des conditions naturelles de sang total. Les taux d'inhibition dépendent des dérivés et des patients avec un maximum observé à 35% en présence de C₆₀ serinol-malonate. Ces inhibitions ont été reproduites sur des basophiles humains purifiés en étudiant des marqueurs d'activation supplémentaires CD107a et CD69.

Les perspectives de ce travail portent sur la spécificité et les mécanismes d'inhibitions observés au niveau intracellulaire. Elles incluent, par exemple, l'étude des flux de calcium ou des protéines de fusion, ou des facteurs de transcription.

Title : Fullerene and derivatives : Purity criteria and functional impact in vivo on mitochondria, in vitro and ex vivo on allergy related cells

Keywords : Fullerene, allergy, antioxidant, mitochondria, basophil, C₆₀

Abstract : In 1985 Kroto discovered the third allotrope of carbon, fullerene, spherical molecule consists of 60 carbons with 1 nm in diameter with a specific physico-chemical characteristic. The chemical reactivity of C₆₀ is governed by addition reactions and its high affinity for scavenging free radicals thanks to its 30 double bonds. This property has been widely explored in the field of oxidative stress, in vitro and in vivo, where redox balance is involved, as physio-pathological situations involving inflammation and cellular degeneration. In particular, treatment with C₆₀ solubilized in olive oil extended life span in a rat experimental model. The product, marketed worldwide, has not yet been clinically tested. On the other hand, some preparations may contain impurities. It is therefore important to establish criteria for the purity and integrity of C₆₀ preparations.

This thesis work consists of two parts. In the first physico-chemical part, a criterion of C₆₀ purity was established for evaluating the purity of several commercial preparations of C₆₀ with different origins using the following techniques: scanning electron microscopy, X-ray diffraction, Differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), as well as ultraviolet-visible and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The results show that FTIR is the easiest way to control the quality of C₆₀ and GC-MS is necessary for identifying volatile impurities, while HPLC remains essential for detecting other fullerenes and C₆₀ derivatives.

The second part of the thesis deals with functional aspect of fullerenes and for this purpose we used the pure preparation of C₆₀ evaluated according to the previously defined criteria.

In a first chapter, to precise the sub-cellular compartment targeted, the C₆₀ dissolved in olive

oil were in vivo injected in mice. After administration, C₆₀ molecules were visualized in the liver and in the spleen, inside the cells and sometimes in mitochondria and endoplasmic reticulum. The targeting of [60]fullerene to the mitochondria was confirmed by a specific modification of the activities of mitochondrial enzymes (malate dehydrogenase and complex I of respiratory chain).

In a second chapter we studied the effect of fullerenes on cells involved in an immune dysregulation where inflammation plays a role: allergy. The cellular mechanism at the basis of allergic symptoms is the release in circulation and tissues of mediators of inflammation and immune response from IgE-dependent activation of basophiles and mast cells. The regulatory effects of [60]fullerene and 4 hydrosoluble derivatives, fullerol, β -cyclodextrin [60]fullerene, dendro [60]fullerene and [60]fullerene serinol-malonate, were tested. In vitro experiments showed an absence of toxicity at nanomolar concentrations and inhibitory abilities on the IgE-dependent and -independent activation of the rat mast cell line (RBL). In a cellular activation test monitoring the expression of the degranulation and activation markers CD63 and CD203c on basophiles, by flow cytometry, we show that the various fullerenes are able also to inhibit the ex vivo activation of basophiles from peanut allergic patients in a natural physiological environment: in whole blood. Inhibition rates depend on patients and derivatives with a maximum inhibition observed at 35% in presence of [60]fullerene serinol-malonate. These inhibitions were reproduced on purified human basophiles by studying further activation markers CD107a and CD69.

Working perspectives will be on the specificity and the mechanisms of inhibition by studying intracellularly calcium influx or the expression of fusion proteins and transcription factors.

Table des matières

Remerciement	6
Introduction générale	10
Chapitre I.....	16
1. Propriété physico-chimiques.....	18
2. Applications biomédicales potentielles des fullerènes – Toxicité et comportement <i>in vivo</i>	21
2.1. Applications biomédicales.....	21
2.2. Toxicité, pharmacocinétique et bio-distribution.....	28
Objectifs du travail	29
Chapitre II.....	30
Abstract	36
Introduction	37
Results	39
Studies in the solid state	39
Morphology of the samples	39
Crystallographic studies	40
Differential Scanning Calorimetry	42
Thermogravimetric results	44
Infrared spectroscopy	45
Studies in solution	46
High-Pressure Liquid Chromatography	48
GC-MS analyses	50
Conclusion.....	53
Experimental section	53
Materials	53
Scanning Electron Microscopy	54
High Resolution X-ray Powder Diffraction.....	54
Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	54
Thermogravimetry.....	54
Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	55
Reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to diode array detection.....	55
UV-vis spectrophotometry	55
Gas chromatography coupled with mass spectrometry	56
Statistical analysis	56
Acknowledgements	56
References	57
Chapitre III.....	61
Introduction	62
Le stress oxydatif	63
Mitochondrie.....	67

La chaîne respiratoire	70
Cycle Krebs	76
Matériels et Méthodes	78
Expérimentation animale	78
Enzymologie de la chaîne respiratoire	79
Concentration de protéines	79
Résultats	84
Complexe I	84
Complexe II	85
Complexe III	86
Complexe IV	87
Complexe V	88
Complexes I+III	89
Complexes II+III	90
Citrate synthase	91
Aconitase	92
Isocitrate déshydrogénase (IDH)	93
Alpha-Cétoglutarate déshydrogénase	94
Fumarase	95
Malate déshydrogénase (MDH)	96
Lactate déshydrogénase (LDH)	97
Microscopie Electronique à Transmission (TEM)	98
Conclusion et discussion	100
Chapitre IV	102
Allergie	105
Basophiles et mastocytes	107
Anticorps	110
Fullerènes et Allergie	112
Fullerenes inhibit <i>ex vivo</i> activation of peanut allergic patient's basophil	116
Abstract	116
1. INTRODUCTION	118
2. MATERIAL AND METHOD	119
2.1- [60]fullerene and fullerenes derivatives	119
2.2- Cell cultures	120
2.3- Cell viability using MTT reduction assay	121
2.4. β -hexosaminidase release assay	121
2.5- Calcium ionophore assay	122
2.6- Pollen and peanut allergic patients	122
2.7- Peanut and pollen extracts	123
2-8- Basophil activation test (BAT)	123
2.9. SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting	124
3. RESULTS	125
3.1- Fullerenes do not modify allergens and do not interfere with allergen-IgE binding	125
3.2- Toxicity of fullerene is derivative- and cell line-dependent.	125
3.4. Inhibition of IgE dependent activation of human basophile is patient- and derivative-dependent ...	126

4. DISCUSSION	128
5. References	130
<i>Effet du [60]fullérène et de ses dérivés sur la dégranulation de basophiles humains purifiés et sur des cellules dendritiques humaines purifiées provenant de donneurs non allergiques</i>	<i>142</i>
<i>Effet des dérivés du fullerène sur la dégranulation de cellules d'une lignée de mastocytes (RBL SX38) ayant le récepteur humain aux IgE</i>	<i>152</i>
<i>Conclusion et perspectives</i>	<i>161</i>
<i>Références</i>	<i>167</i>
<i>Annexe</i>	<i>184</i>
Liste des publications et des communications.....	185

***To my mother,
and to the memory of my father,***

*For their endless love,
support and encouragement.
Thank you both for giving me strength
to reach for the stars and chase my dreams;*

to my husband,

who made it all possible;

to my little Daniel,

who makes it all worthwhile;

Thanks to

my beloved family,

*Behnam,
for making so many things possible, for your tender love and for your support.*

*Sahereh, Sahameh, Firouzeh, Behnaz, Faezeh,
Farnam, Amirmohamad,
Ehsan, Amir, Mahdi, Ali*

*for your endless love, for your support and for putting me up when I needed a
break from the thesis work.*

*And my father-in-law and mother-in-law
for your words of encouragement! Your love and extensive support have been
ever-present in this important time of my life, for which I am eternally grateful.*

Remerciement

Je voudrais d'abord remercier le Pr **Hassan Allouchi** et le Dr **Samy Gobaa** pour avoir accepté de relire ma thèse et d'en être les rapporteurs. La version finale a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques précieuses.

Je tiens à remercier **Dr Philippe Maître** d'avoir accepté d'être président du jury et je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Je voudrais remercier en premier lieu mon directeur de thèse, le **Pr Fathi Moussa**, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour ses conseils scientifiques tout au long de ces quatre années de thèse, ses qualités pédagogiques et scientifiques, et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Merci infiniment pour les nombreuses fois que tu m'as encouragé à avancer, j'ai apprécié tes mots d'encouragement pendant mon congé maternité, ils m'ont donné beaucoup de motivation. Merci pour ton attention, ta gentillesse et pour tes petites questions concernant mon bien-être pendant mon travail à l'hôpital Bicêtre et à l'hôpital Trousseau. Enfin, les relectures et corrections de ce mémoire pendant les vacances de fin d'année ont été appréciables.

C'est grâce à tes collaborations que j'ai pu découvrir le monde de la biologie cellulaire, de l'immunologie et de l'allergie dans deux laboratoires bien équipés au sein des équipes expertes des hôpitaux Armand Trousseau et du Kremlin-Bicêtre, ainsi que les collaborations avec le **Pr René Céolin** à SANOFI et le **Dr Ivo Rietveld** à l'Université de Rouen qui m'ont permis d'enrichir mes expériences en chimie physique. Je remercie chaleureusement **Ivo**, avec qui nous avons effectué de nombreuses séances de travail à l'IUT d'Orsay, à la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry et à l'université de Rouen et qui m'a aidé pendant l'élaboration de ma thèse, par son

intérêt à l'avancement de mon travail, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de mon article.

Merci à tous pour tout cela.

Je souhaite remercier tout particulièrement les **Drs Pascal Poncet** et **Hélène Sénéchal** qui m'ont encadré tout au long de ces trois dernières années de thèse au sein de l'équipe « Allergie et Environnement » dans le laboratoire de biochimie à l'hôpital Armand-Trousseau. Vous vous êtes toujours intéressés à l'avancée de mes travaux, et avez toujours été disponibles, à l'écoute de nombreuses questions d'une chimiste qui a découvert le monde de la biologie et l'immunologie avec vous. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que vos conseils sont pour beaucoup dans ce travail. Votre capacité d'analyse et votre enthousiasme m'ont montré que le monde de la recherche pouvait être un univers passionnant. Enfin, vos nombreuses relectures et corrections de cette thèse ont été très appréciables. Je vous remercie du fond du cœur pour votre sympathie, votre gentillesse, votre écoute et votre soutien qui m'ont beaucoup aidé pour tenir jusqu'au bout, mais aussi pour les bons moments que nous avons eu ensemble et pour tous les sourires que vous m'avez faits surtout pendant les moments difficiles. Un grand merci à toi **Hélène**, pour le temps que tu as pris à relire une grande partie de ce mémoire pendant les fêtes de fin d'année, je sais que tu as fait beaucoup d'effort pour comprendre le sens souvent tortueux de mes phrases. Et encore une fois merci du fond du cœur d'avoir fait tout ce que tu as pu pour m'aider à reprendre le travail durant mon congé maternité.

C'est également grâce à vos collaborations avec le **Dr Jagadeesh Bayry** et **Anupama Karnam** de l'université Paris Descartes, et avec la **Dr Karine Adel-Patient** et **Sandrine Ah-Leung** de l'INRA (CEA de Saclay), ainsi que les différentes réunions avec le **Dr Ulrich Blank**, les **Drs Iris-Karina Madera-Salcedo** et **Shamila Vibhushan** de l'hôpital Bichat-Claude-Bernard (18^e arrondissement de Paris) que j'ai eu des expériences très enrichissantes en biologie cellulaire et en allergologie et je tiens à remercier vivement toutes ces personnes.

Hélène et **Pascal**, pour tout cela merci. Cette thèse vous doit beaucoup.

J'adresse mes sincères remerciements à **Dr Rémy Couderc** qui m'a accueilli au sein de son laboratoire de biochimie bien équipé à l'hôpital Armand-Trousseau, pour ses conseils précieux et pour toutes les discussions concernant cette recherche qui m'ont permis à avancer dans cette thèse. Je tiens aussi à remercier **Marie-Ange Selva** pour ses nombreuses aides, pour sa disponibilité et pour sa gentillesse, ainsi que tout le personnel et les stagiaires du laboratoire de biochimie avec qui j'ai pu passer de bons moments et des séances de travail dans une excellente ambiance. Enfin, je remercie vivement ma chère **Magali Niasme Grare** pour son soutien, ses conseils, ses encouragements et sa sympathie pendant toute la durée de mon travail à l'hôpital Trousseau.

Je tiens à remercier **Dr Jean-Marc Busnel** et **Rihane Arif** de la société Beckman Coulter de Marseille, avec qui j'ai eu l'occasion d'apprendre la technique cytométrie de flux et le test d'activation de basophile, pour les conseils et de nombreuses discussions concernant cette recherche qui m'a permis d'avancer dans cette partie de thèse.

Je remercie **Dr Abdelhamid Slama** d'avoir co-encadré ce travail de thèse dans son équipe spécialisée et centrée sur le diagnostic biochimique et moléculaire des maladies héréditaires du métabolisme énergétique avec atteinte hépatique et/ou neuromusculaire, (Laboratoire de Biochimie de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre).

Je remercie également **Dr Pauline Gaignard** pour ses conseils et son aide, ainsi que tous les membres du laboratoire de biochimie de l'hôpital Bicêtre, notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et les autres simplement pour les bons moments partagés.

Je remercie vivement **Jeannôt Bleton** pour ses aides dans l'avancement de cette recherche mais aussi pour les bons moments qu'il nous a fourni lors des pauses thés. J'ai effectué de nombreuses séances de travail permettant d'éclaircir la partie

GC-MS de l'étude sur la pureté du C₆₀. Sa vision très imagée et enthousiaste m'a permis de travailler toujours dans la bonne humeur et j'ai beaucoup appris à ses côtés. Je tiens à lui rendre hommage lui qui ne pourra pas être présent à ma soutenance.

Je tiens à remercier **Alain Tchapla**, pour ses nombreux conseils scientifiques, pour le temps qu'il m'a consacré pour répondre à mes questions qui m'ont permis de progresser. Merci pour tous tes mots d'encouragement et merci d'avoir été toujours présent à mon côté pour me soutenir.

Je remercie vivement **Sylvie Héron** pour ses aides qui m'ont permis d'avancer dans ma thèse. Merci pour tes conseils et tes soutiens qui m'ont beaucoup aidé, merci d'avoir été toujours présente à côté de moi pour me soutenir.

Je remercie chaleureusement **Caroline, Kaouther** (ma sœur de cœur), **Marine, Ninette**, et **Myriame** des filles pas comme les autres, qui ont su me soutenir, me supporter et m'encourager surtout durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables. Merci pour votre sympathie et votre gentillesse, merci d'avoir été toujours présentes à côté de moi et à mon écoute. Votre soutien m'a poussé pour aller jusqu'au bout. Merci à ma chère **Yvonne** pour sa gentillesse et pour ses cadeaux délicieux qui m'ont donné de la force à tenir jusqu'au bout. Je remercie chaleureusement **Philippe, Zhou, Nizar, Cally, Dorra, Seif, Arnold, Grazieli, Naira, Aurélien, Samia, Rémy, Marie** et tous les stagiaires du LETIAM pour la bonne ambiance de travail mais également pour les nombreux bons moments passés ensembles.

Enfin, je remercie également tous mes chers copains et copines qui m'ont permis d'oublier momentanément le travail dans des soirées, repas, sorties ou autres : **Farzaneh, Alireza, Diana, Aaron, Mahdokht, Audrey, Aurélia, Jérémy, Mélissa** et **Nicky**.

Introduction générale

Depuis sa découverte en 1985, le [60] fullerène ou C_{60} (1) a suscité un grand intérêt dans le domaine des applications biomédicales, lié à trois propriétés intrinsèques (2). La première réside dans la géométrie tridimensionnelle de la molécule. De par sa taille et de par sa propension à engager les liaisons de type van der Waals, le C_{60} peut pénétrer dans les sites actifs de certaines enzymes, comme par exemple la protéase du VIH, et inhiber leurs activités (3, 4). La deuxième propriété est liée à la capacité du C_{60} à promouvoir la formation d'oxygène singulet, après excitation par la lumière (5). Ainsi, plusieurs de ses dérivés ont été proposés pour la thérapie photo-dynamique (2). Enfin, la troisième propriété est tout simplement liée à la réactivité chimique du C_{60} , dominée par les réactions d'addition. Grâce à ses 30 double-liaisons, le C_{60} a une affinité incomparable pour les radicaux libres (6,7). Ainsi, plusieurs équipes indépendantes utilisant différents modèles expérimentaux ont proposé d'innombrables applications biomédicales potentielles liées à cette propriété. Parmi ces applications, l'hépatoprotection et la neuroprotection sont les plus citées (8–16). D'autres applications dans le domaine de la lutte contre le stress oxydatif ont été proposés tels que l'inhibition de l'apoptose (17), la lutte contre le cancer (18–20), voir même la lutte contre l'acné et la chute des cheveux (2,21). De même, certains dérivés auraient des activités antimicrobienne (22) et antivirale (22–24). De ce fait, il n'est guère surprenant, d'apprendre que le C_{60} et ses dérivés peuvent même prolonger l'espérance de vie dans de nombreux modèles expérimentaux mettant en jeu plusieurs clades (26–28). La plupart de ces applications potentielles ont été déjà pressenties dans la première revue générale consacrée à ce sujet en 1996 (29).

Par ailleurs, plusieurs équipes indépendantes, utilisant divers modèles expérimentaux, ont montré que le C_{60} est dénué de toute toxicité aiguë ou chronique (30). Bien que les fullerènes soient disponibles à l'achat sur Internet, en solution dans différentes huiles, ils n'ont cependant pas fait à ce jour l'objet d'études pouvant conduire à la conception de nouveaux agents thérapeutiques.

Introduction générale

De fait de nombreuses étapes sont nécessaires avant de considérer une utilisation possible des fullerènes en tant que médicament. L'expérimentation animale permet, dans un premier temps, grâce au paramètre de la DL50 (dose létale pour laquelle 50% des animaux meurent) de définir la toxicité du candidat médicament pour différentes espèces aux sensibilités variables. Sont étudiés par là-même, sa bio-distribution et son élimination (deux paramètres pharmacocinétiques), son mécanisme d'action au niveau moléculaire, sa durée d'action *in vivo*, ses voies d'administration optimales, ses effets secondaires et ses interactions avec d'autres médicaments. Une fois ces données obtenues, on pourra passer à l'expérimentation humaine qui se déroule en 4 phases :

- **Phase I** : Détermination des doses tolérées chez des volontaires sains en administration unique. Une étude pharmacocinétique y est associée.
- **Phase II** : Evaluation de l'intérêt thérapeutique du médicament testé chez l'animal. Cette phase peut se répartir en deux sous phases, IIA chez des sujets sains, IIB chez des sujets malades.
- **Phase III** : Evaluation de l'intérêt thérapeutique et de la tolérance du médicament. Se fait sur des effectifs plus grands, représentatifs des sujets à traiter. L'administration est prolongée et peut comprendre une comparaison avec des traitements d'efficacité démontrée.
- **Phase IV** : Peut se faire après l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour mieux connaître les effets indésirables, mieux connaître l'intérêt thérapeutique dans les conditions de l'AMM. Une phase de pharmacovigilance se met alors en place.

Quelques points des premières étapes chez l'animal sont déjà réalisés pour les fullerènes (2,27,28).

En réalité, si le C₆₀ pur est dénué de toute toxicité, son mode de préparation peut conduire à des impuretés résiduelles pouvant induire une certaine toxicité. En effet, les agrégats de

C₆₀ peuvent véhiculer des solvants résiduels et surtout des substances toxiques, comme tout autre agrégat de matériau hautement adsorbant (31). Cette propriété explique à elle seule le retard et les déceptions enregistrées dans le domaine des applications biomédicales du C₆₀. La publication de quelques résultats erronés de toxicité liés à l'utilisation de préparations impures de C₆₀, ont été un obstacle majeur au développement d'agent thérapeutiques à base de C₆₀ (30). Il a fallu plus d'une décennie pour montrer que ces résultats étaient dus aux impuretés présentes dans les préparations et non au C₆₀ lui-même (30–33).

Or, depuis la publication des effets du C₆₀ sur la durée de vie dans un modèle expérimental chez le rat (27,28), une myriade de « *start-ups* » s'est spécialisée dans la vente et la diffusion à l'échelle mondiale de solutions de C₆₀-huile d'olive sous la désignation de compléments alimentaires, sans aucun essai préclinique préalable. Ce qui est regrettable car le moindre incident de toxicité, condamnerait définitivement l'utilisation ultérieure de cette substance tant prometteuse dans de nombreux domaines de la santé et du bien-être.

S'il est pratiquement impossible d'arrêter la vente de ces produits, il est urgent de pouvoir au moins contrôler leur qualité, afin d'informer et de protéger les utilisateurs potentiels. Étant donné que les échantillons de C₆₀ les plus purs peuvent encore contenir des impuretés (34–37) et des solvants résiduels (37–40), il est nécessaire d'établir un critère de pureté pour les préparations du C₆₀. Cependant, si les propriétés physico-chimiques du C₆₀ sont actuellement bien connues, rien n'est encore établi quant aux critères de pureté d'un échantillon de C₆₀. Ce point constitue l'un des objectifs principaux de ce travail de thèse.

De ce fait, le premier chapitre de ce travail thèse a été consacré à l'évaluation de plusieurs techniques analytiques pour l'établissement d'un critère de pureté d'une préparation de C₆₀. Notamment, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage (MEB), la diffraction des rayons X à haute résolution (HR-XRD), la calorimétrie différentielle (DSC), l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

pour l'évaluation de la pureté à l'"état solide". Et, nous avons aussi utilisé la spectrophotométrie UV-Visible, la chromatographie en phase liquide (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) pour les études de la pureté du C₆₀ "en solution".

Dans le deuxième chapitre de ce travail de thèse nous avons cherché à comprendre le mécanisme d'action du C₆₀. En effet, si l'intérêt du C₆₀ dans la lutte contre le stress oxydatif est actuellement bien établi, il n'en est pas de même de son mécanisme d'action, qui reste encore obscure. Dès lors, nous avons essayé, dans un premier temps, d'identifier les sous-compartiments cellulaires ciblés par le C₆₀ après son administration sous forme de solution huileuse, dans un modèle expérimental *in vivo* chez la souris.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons utilisé le C₆₀, le plus pur défini par les critères décrits dans le chapitre 1 (préparation S2), et certains de ses dérivés synthétisés par nos partenaires, en France et à l'étranger (le CNRS à Paris 6 ; l'University d'Erlangen-Nürnberg, Allemagne ; Rice University, Huston, Texas, USA et Suzhou Dade Carbon Nanotechnology, Chine), pour étudier son mécanisme d'action *in vitro* et *ex vivo*, dans un modèle expérimental de l'allergie. En effet, un dérivé hydroxylé du C₆₀ a montré des interactions spécifiques avec les cellules jouant un rôle important dans les pathologies dans lesquelles l'inflammation joue un rôle important, notamment dans l'allergie (41–44). L'allergie est associée à une réponse inflammatoire liée à l'activation de cellules de type basophile et mastocyte qui induit la libération de médiateurs de l'inflammation et de la réponse immune. L'effet du C₆₀ et de ses dérivés, le C₆₀-β-cyclodextrine (CNRS, Paris 6), le dendro-fullerène (Allemagne), le serinyl-malonate (USA) et les fullérénols (Chine) ont été évalués dans des modèles *in vitro* sur les lignées cellulaires mastocytaires et *ex vivo* sur des patients allergiques.

Introduction générale

Cependant, pour bien comprendre les objectifs de nos travaux, il est nécessaire de rappeler quelques notions sur les propriétés physico-chimiques du C_{60} ainsi que sur les applications biomédicales potentielles proposées jusqu'à ce jour.

La fin de ce mémoire sera consacrée à la conclusion générale et aux perspectives de ce travail.

Chapitre I

- **Rappels de quelques notions concernant les propriétés physico-chimiques des fullerènes et leurs applications potentielles dans le domaine biomédical**
- **Objectifs du travail**

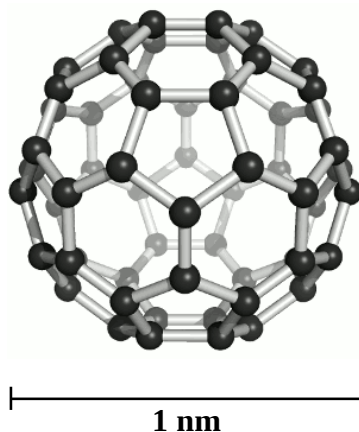
Le carbone est le quatrième élément le plus abondant dans l'univers et l'élément essentiel dans le domaine du vivant. Néanmoins, la découverte relativement récente par Kroto et al. (1) du fullerène C_{60} , le troisième allotrope du carbone, après le diamant et le graphite, a impulsé un nouvel essor, incomparable, dans tous les domaines de la recherche sur cet élément. Tant et si bien que le C_{60} est maintenant considéré comme un des éléments fondateurs des nouvelles nanotechnologies.

Le nom de «fullerène» a été donné à cette famille de molécules en hommage à l'architecte R. Buckminster Fuller inventeur du dôme géodésique, de structure tridimensionnelle comparable, qui a été utilisée pour la construction du pavillon des États-Unis à l'exposition universelle de 1967 à Montréal (1,45). Le nom «Buckyball» ou «Buckminster-fullerene» a été spécifiquement attribué au [60]fullerène ou C_{60} , le composé le plus abondant et le plus stable de la famille des fullerènes. La molécule C_{60} , semblable à une cage de carbone, forme une très petite nanostructure de 0,71 nm de diamètre de haute symétrie (structure icosaédrique), fournissant une cavité interne capable de contenir une grande variété d'atomes tel que Sc, Y, La, Ca, Sr, Ba, Li Ce et Kr (46,47). Dans cette structure, un polygone avec 60 sommets et 32 faces, dont 12 pentagones et 20 hexagones, toutes les valences sont satisfaites par deux liaisons simples et une double liaison.

Nous débuterons ce chapitre par un rappel de quelques notions concernant les propriétés physico-chimiques du C_{60} et les impuretés éventuelles présentes dans les échantillons de C_{60} , avant d'exposer ses applications potentielles dans le domaine biomédical et ensuite nous exposerons les objectifs de ce travail.

1. Propriété physico-chimiques

Chaque fullerène contient $2(10 + M)$ atomes de carbone qui correspond à 12 pentagones et M hexagones. Ce principe de construction est une conséquence simple du théorème d'Euler, d'où le plus petit fullerène que l'on puisse imaginer est le C_{20} . À partir de C_{20} , à l'exception de C_{22} , tous les groupes de carbone à éléments pairs peuvent former au moins une structure de fullerène. Avec l'augmentation de M , le nombre d'isomères de fullerène possibles augmente de façon spectaculaire, passant de 1 pour $M = 0$ à plus de 20 000 pour $M = 29$ et ainsi de suite (48,49). L'isomère C_{60} en forme de ballon de football [60]fullerène est le plus petit fullerène stable. La structure du C_{60} a été déterminée théoriquement (50,51) et expérimentalement (52–54). Ces investigations confirment la structure icosaédrique du C_{60} qui a deux caractéristiques particulières : *i*: tous les douze pentagones sont isolés par des hexagones et *ii*: les liaisons aux jonctions de deux hexagones (6-6 liaisons) sont plus courtes que les liaisons aux jonctions d'un hexagone et un pentagone (5-6 liaisons).



Le [60]fullerène est le seul isomère de C_{60} et en même temps le plus petit fullerène possible, qui suit la «règle du pentagone isolé» (IPR) (55,56). L'IPR explique la structure stable du fullerène ayant tous les pentagones isolés par des hexagones, par comparaison avec une structure probable ayant des pentagones adjacents qui serait moins stable. Une déstabilisation

provoquée par des pentagones adjacents est possible en raison de systèmes 8 π -électrons du type de pentalène, ce qui conduit à la résonance de déstabilisation. Ainsi, des angles de liaison forcés peuvent augmenter l'énergie de déformation. La formation de la structure IPR s'accompagne d'une amélioration de la sphéricité des molécules. La forme sphérique distribue la déformation et minimise la contribution anisotrope à l'énergie de déformation (57). L'alternance de la longueur de la liaison dans C_{60} montre que les doubles liaisons sont situées à la jonction des hexagones (6-6 doubles liaisons) et qu'il n'y a pas de doubles liaisons dans les anneaux pentagonaux. Chaque hexagone de C_{60} présente une cyclohexatriène- et chaque pentagone a un caractère [5]radialène (57).

Le fullerène le plus stable après le C_{60} qui respecte la loi IPR est le C_{70} (58). Sa structure a été calculée (59) et déterminée par cristallographie aux rayons X (60,61). La géométrie du C_{70} est très similaire à celle du C_{60} et contrairement au C_{60} , ce fullerène a une ceinture équatoriale composée d'hexagones fusionnés.

Le nombre possible d'isomères de fullerènes sans aucune contrainte diminue considérablement si on ne permet que les structures confirmées par IPR. Compte tenu du fait que les structures à coque ouverte sont évitées (49,62,63) et que le nombre de doubles liaisons dans les pentagones est minimisé (64), le nombre d'isomères autorisés est encore réduit. Avec cette contrainte, le nombre n pour les fullerènes stables (C_n) peut être $n = 60, 70, 72, 76, 78, 84, \dots$ (49). Le nombre d'isomères de fullerène autorisés est alors un pour C_{60} , un pour C_{70} , un pour C_{76} , cinq pour C_{78} , 24 pour C_{84} et 46 pour C_{90} (49,65).

Les recherches sur les propriétés physiques à la fois en solution et à l'état solide ont été principalement réalisées sur le C_{60} et dans une moindre mesure sur le C_{70} , car ce sont les fullerènes les plus abondants. La chaleur de formation du C_{60} et du C_{70} a été déterminée expérimentalement par calorimétrie à 10,16 kcal/mol par atome de carbone pour le C_{60} et à 9,65 kcal/mol par atome de carbone pour le C_{70} (66). Les fullerènes sont donc thermodynamiquement moins

stables que le graphite et le diamant. En augmentant la taille du fullerène, on s'attend à ce que le contenu énergétique des sphères atteigne asymptotiquement celui du graphite (67,68).

Afin de modifier chimiquement les fullerènes, dans la plupart des cas, il est nécessaire qu'ils soient en solution. En outre, pour les extractions ou les séparations chromatographiques, la solubilité joue un rôle crucial. La solubilité du C_{60} dans divers solvants organiques a été systématiquement étudiée (69–71). Dans les solvants polaires et à liaison H, tels que l'acétone, le tétrahydrofurane ou le méthanol, le C_{60} est essentiellement insoluble. Il est peu soluble dans les alcanes, la solubilité augmentant avec le nombre d'atomes. Dans les solvants aromatiques et dans le disulfure de carbone, on observe en général une solubilité appréciable. Une augmentation significative de la solubilité se produit lors du passage des benzènes aux naphthalènes (70).

Les spectres d'absorption électronique (58) du C_{60} et du C_{70} se caractérisent par plusieurs absorptions plus fortes entre 190 et 410 nm ainsi que par certaines transitions interdites dans la partie visible du spectre. Pour C_{60} , l'affectation des transitions a été effectuée en utilisant les résultats des calculs théoriques (72,73). Les absorptions entre 410 et 620 nm dans le visible est responsable de la couleur violette du C_{60} et de la couleur rouge du C_{70} . Les fortes absorptions de C_{60} se situent à 213, 257 et 329 nm (avec $\epsilon_{\max}$ =135000, 175000 et 51000, respectivement) et il existe une bande faible intéressante, à 404 nm. Les faibles épaulements sur les bandes 214 et 329 nm semblent être réelles. Une absorption large très faible est également observée entre 440 et 670 nm qui présente des maxima à 500, 540, 570, 600 et 625 nm (74).

La forme solide de C_{60} a une structure cubique à faces centrées (Fcc) à température ambiante (75) qui apparaît brun ou noir avec l'épaisseur croissante de film avec le point de fusion élevé ($> 280^{\circ}\text{C}$) (74). La densité à l'état solide d_{fcc} est de $1,68 \text{ g cm}^{-3}$. Quatre molécules équivalentes sont contenues dans un cube unitaire avec une longueur de bord $a = 14,198 \text{ \AA}$, aux centres d'origine et de face. En raison des faibles interactions intermoléculaires, les molécules sphériques du fullerène tournent presque librement à température ambiante (76).

2. Applications biomédicales potentielles des fullerènes – Toxicité et comportement *in vivo*

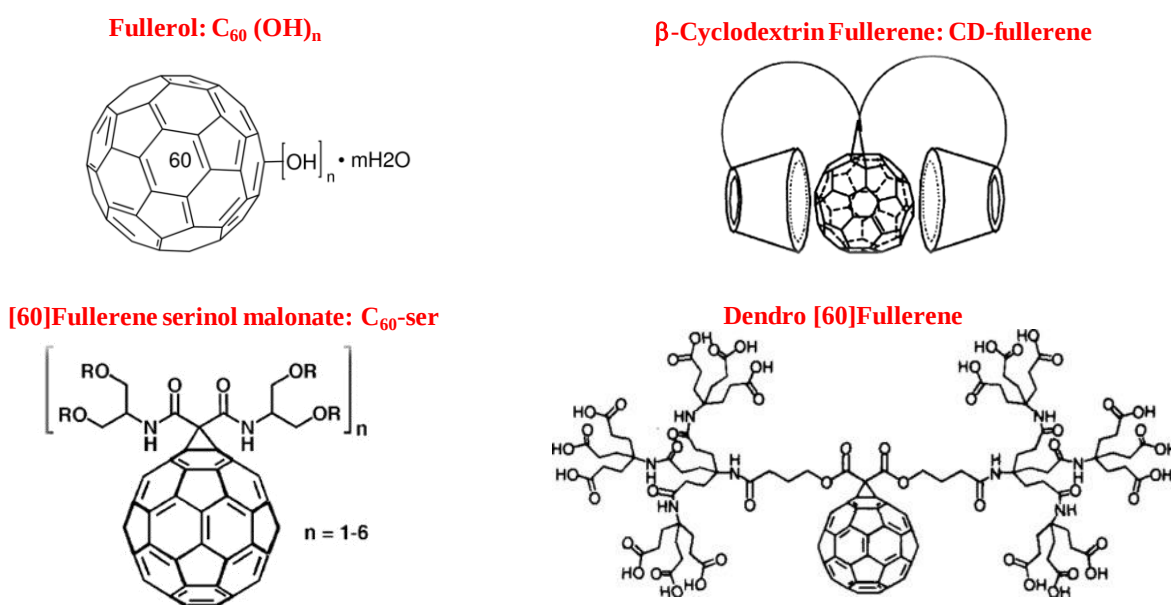
2.1. Applications biomédicales

Les fullerènes ont montré de nombreux effets désirables dans la chimie, la physique, la biologie et en médecine. Parmi ses activités la possibilité d'employer le C₆₀ en tant que cytoprotecteur peut être considérée comme l'une des applications les plus séduisantes et l'une des plus étudiées depuis la publication des travaux qui a analysé la capacité de fullerène de piéger les espèces réactives d'oxygène (ROS) (8). La réactivité et les applications des fullerènes ont été explorées depuis leur découverte en 1985 (1). Aujourd'hui la chimie des fullerènes a été intensément développée, bien qu'il soit encore possible de trouver de nouvelles réactions (77). Les principaux efforts sont maintenant consacrés à élargir les applications de la famille des fullerènes et de ses dérivés.

L'obstacle principal aux essais biologiques *in vitro* à base de fullerènes a été l'insolubilité dans les milieux aqueux. Les premières études sur la modification de la surface du fullerène par polyhydroxylation et hexasulfobutylation ont produit des fullerènes hydrosolubles présentant une bonne distribution biologique et une bonne pénétration cellulaire (8,78–86). Quelques années après la préparation de quantités utiles de fullerènes par synthèse, des dérivés hydrosolubles de [60]fullerènes ont été préparés. Les fullerènes fonctionnalisés contenant différents groupes polaires, tels que des acides aminés ou des acides carboxyliques, ou un polymère avec des groupes polaires ont des propriétés amphiphiles et sont partiellement solubles en solutions aqueuses. Plusieurs protocoles de synthèse originaux ont été bien établis pour la combinaison des propriétés structurales, physico-chimique et électronique uniques des fullerènes avec les caractéristiques particulières des groupes adduits qui conduisent éventuellement au développement de nouveaux matériaux ayant un potentiel énorme dans des applications technologiques et biologiques. Une grande variété de dérivés hydrosolubles de fullerène ont été spécifiquement

Chapitre I

conçus et synthétisés avec succès, fournissant des applications prometteuses dans divers domaines des nanotechnologies, biotechnologies et dans le domaine biomédical. Parmi ces activités nous allons citer ci-après les propriétés les plus importants démontrées par différents groupes de recherche indépendants. Dans le schéma ci-dessous quatre dérivés hydrosolubles du C_{60} qui ont été utilisé dans cette étude.



Plusieurs études ont confirmé la capacité du fullerène et ses dérivés à piéger les radicaux libres (9–11) et ont une activité antioxydante (12). Des espèces réactif d'oxygène (ROS) et/ou des radicaux $^{\circ}OH$ et $^{\circ}OOH$ peuvent se fixer sur la cage C_{60} en attaquant les doubles liaisons de C_{60} qui est en déficit d'électrons par une réaction nucléophile et cela conduit à la formation d'époxyde de fullerène [$C_{60}O_n$]. Par ailleurs, une répétition d'attaque du $^{\circ}OH$ (ou $^{\circ}OOH$) sur le $C_{60}O$ à travers une réaction de substitution (SN_2) peut donner lieu à une époxydation, ce qui produit des groupes époxydes successifs, par exemple, $C_{60}O_2$ et $C_{60}O_3$ (Figure 1) (87).

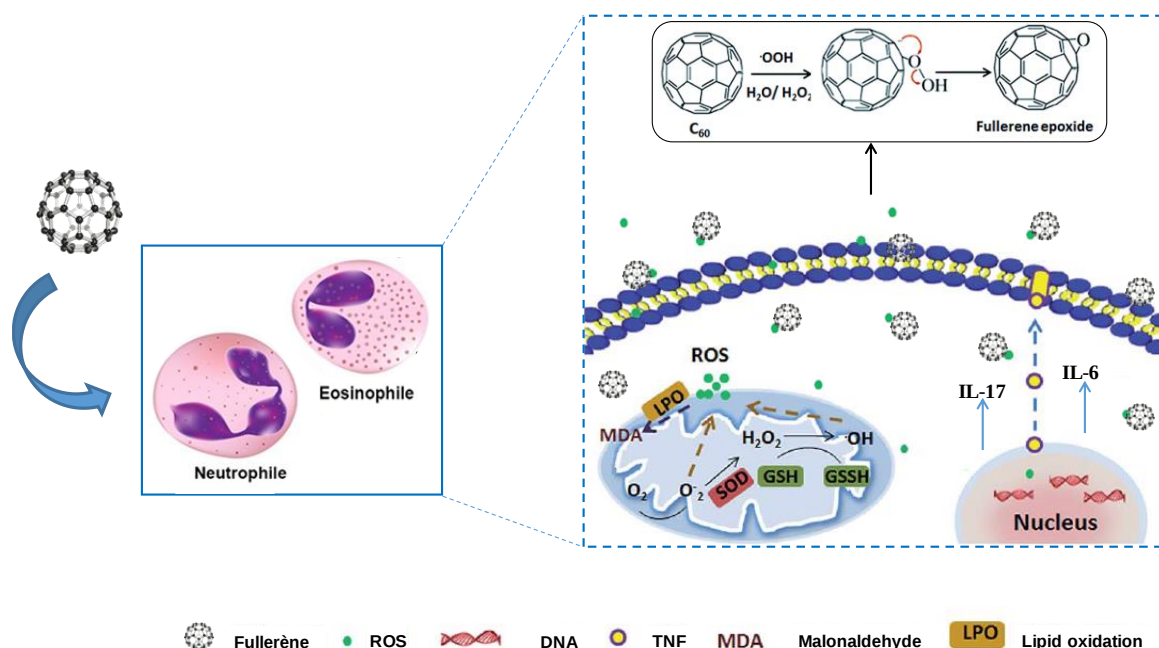


Figure 1. Mécanisme possible de la réaction du fullerène avec les ROS (88).

Les propriétés antioxydantes des dérivés hydrosolubles de fullerènes, principalement les dérivés contenant de l'acide tris-malonique et du dendrofullerène, ont été étudiées précisément (13). Dans la série proposée, les dendrofullerènes sont plus actifs que les dérivés poly-adduits et, parmi les fullerènes poly-adduits, les composés anioniques offrent une protection plus élevée que les composés cationiques (14).

Les travaux ont démontré que le fullerénol induit un retard de vieillissement chez le ver *Caenorhabditis elegans*, pris en tant que modèle, et il n'a pas d'influence sur la croissance ni sur son développement. Les études complémentaires ont démontré que le fullerénol protège le ver *C. elegans* dans des conditions de stress (26).

Les dérivés du C₆₀ ont montré différentes activités cytoprotectrices (89,90), antimicrobienne contre divers micro-organismes (22,24,91) et antivirale (23,25,92–94). Il convient de noter qu'une toxicité générale plus élevée a été observée pour les dérivés cationiques par rapport aux dérivés anioniques (30). Le dérivé du fullerène, le fullerène-alanine, a montré une activité anti-apoptotique (17,95) et le nC₆₀ a provoqué le blocage de prolifération cellulaire et l'autophagie dans les cellules tumorales (18). D'autres études ont confirmé l'effet anti-tumoral des

fullerènes (19,20,96,97). Plusieurs autres travaux ont montré un nouvel aspect de l'interaction de dérivés du fullerène, comme les aminofullerènes, avec l'ADN en tant que vecteur de transfection par endocytose des cellules de mammifères (98–100).

Les dérivés de fullerènes ont démontré un niveau d'efficacité neuroprotectrice et ont efficacement réduit la mort neuronale (15,16). Ils ont aussi montré des effets bénéfiques dans les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (101–103). (101–103). Ces molécules, en se liant à une protéine ou une enzyme (13,104) peuvent augmenter leur stabilité dans des conditions extrêmes, ce qui peut avoir un impact sur leur utilisation dans de nombreux domaines allant de la conception d'outils de diagnostics ou de capteurs (105,106). Ils peuvent augmenter la croissance des cheveux dans les modèles de souris ou dans les modèles des cellules de peau humaine en culture (21).

Le processus **inflammatoire**, une réponse biologique naturelle, est essentiel à la survie des organismes, jouant un rôle important à la fois sur la santé et la maladie. L'inflammation est essentielle pour éliminer les agents pathogènes et favoriser la réparation des tissus lésés. Cependant, une inflammation excessive ou persistante peut contribuer à des lésions tissulaires, à la pathogénèse et à l'exacerbation des maladies. L'inflammation se produit lorsque les tissus vasculaires sont soumis à des stimuli nuisibles et sert à la défense contre les microbes et les tissus endommagés. Ce processus peut être bénéfique pour l'hôte lors de la cicatrisation et des infections, mais peut être préjudiciable s'il n'est pas contrôlé. S'ils ne sont pas contrôlés, ces processus inflammatoires peuvent contribuer à une grande variété de maladies humaines, y compris les maladies inflammatoires chroniques, telles que l'arthrite et les maladies inflammatoires de l'intestin, ainsi que les maladies cardiovasculaires (athérosclérose) ou bien encore l'allergie. Les mécanismes à l'origine de l'inflammation comprennent une série complexes d'événements, y compris l'œdème, le stress oxydatif, le recrutement, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules du système immunitaire. La réponse inflammatoire se produit

généralement en trois phases distinctes. Au début, il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire qui entraîne un œdème suivi d'une deuxième phase d'infiltration des leucocytes. Enfin, la formation de granulomes et la réparation des tissus se produisent (107,108).

Les fullerènes ont montré des capacités à inhiber la réponse inflammatoire dans différents modèles expérimentaux. Parmi ces travaux celui de Huang et al. ont montré qu'un dérivé du C₆₀ inhibe simultanément la production de TNF- α et de NO induit par administration de lipopolysaccharide (LPS) (42). D'autre part, l'effet du fullerène sur un modèle d'inflammation bien établi chez la souris a été évalué et a montré que les fullerènes peuvent réduire significativement la réponse inflammatoire cutanée (43). Après une étude réalisée en 2008 sur l'effet de fullerènes sur un modèle de souris *in vivo*, avec une inflammation induite par le quartz, il a été montré que le nombre des neutrophiles pulmonaires chez les souris prétraitées au fullérenol a été diminué par rapport aux témoins non-traités (44,109). Dans une étude réalisée sur différents types du stress oxydatif, deux modèles sur les cellules RAW 264.7 ainsi les cellules pulmonaires isolées du rat, le fullérenol a inhibé le stress oxydatif cellulaire induit par H₂O₂ et par le sodium nitroprusside (SNP). Il a diminué la production des ROS et il a augmenté la stabilité du potentiel de la membrane mitochondriale (110). D'autre dérivés du fullerène ont bloqué la production des ROS, le potentiel de la membrane mitochondriale et la production du TNF- α dans une étude faite sur les cellules mastocytaires de l'homme et de la souris et dans les fibroblastes synoviaux des patients ayant une arthrite. Les dérivés ont aussi inhibé la libération des médiateurs de l'inflammation dans les mastocytes et ont diminué le taux du TNF- α sérique dans un modèle d'arthrite chez la souris (111). L'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales traitées dans des conditions d'inflammation avec le fullérenol était identique aux molécules exprimées par les cellules témoins. Dans la même étude le fullérenol a modulé l'expression du glutathione (GSH), un antioxydant important, dans les barrières hématoencéphaliques. Les ré-

sultats démontrent que le fullérenol peut contrebalancer le stress oxydatif dans les cellules endothéliales microvasculaires dans le cas de multiple sclérose (112). Une autre dérivé du C₆₀ a réduit l'inflammation du côlon et a amélioré l'état de oxydo-réduction du foie en stimulant le système de défense antioxydant (113). Une solution aqueuse de fullerène nC₆₀ a inhibé significativement la production d'IgE spécifiques dans un modèle de souris de dermatite atopique. De plus, dans cette étude il a été démontré que le taux des interleukines IL-4 et d'IL-5 ont diminué significativement après le traitement avec le nC₆₀ (114).

L'hypersensibilité de type I est une **réaction allergique**. L'exposition à l'allergène peut se faire par ingestion, inhalation, injection ou contact direct. La différence entre une réponse immunitaire normale et une réponse d'hypersensibilité de type I réside dans le fait que les plasmocytes sécrètent des anticorps de type IgE qui se lient aux mastocytes et aux basophiles lors d'un premier contact avec l'allergène. La réexposition à l'allergène déclenche une réaction allergique, dans laquelle les **mastocytes** et les **basophiles**, déjà sensibilisés, libèrent de médiateurs inflammatoires tel que l'histamine, la sérotonine, la protéase (tryptase, chymase, β -hexosaminidase), le facteur d'activation plaquettaire (ou PAF), les prostaglandines, les leucotriènes, les cytokines (y compris TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-13), des composés vasodilatateurs, l'héparine et l'anticoagulant. Ceux-ci provoquent une inflammation au niveau du site lorsque le flux sanguin vers les tissus affectés augmente. La réaction peut être locale ou systémique. Les symptômes varient d'une irritation légère à la mort subite après un choc anaphylactique. En effet, de nombreux médicaments contre les allergies visent à neutraliser (antihistaminiques, antagonistes des récepteurs H1) ou à prévenir cette réponse immunitaire (108). Parmi les produits étudiés afin d'inhiber la réaction allergique et/ou la dégranulation des cellules impliquées dans l'allergie, les fullerènes ont montré une activité antiallergique, pour la première fois en 2007, après l'étude sur des mastocytes humains et des basophiles du sang périphérique (41). Dans cette étude la croissance cellulaire était régulière en présence du fullerène. L'incubation avec

les fullerènes des cellules mastocytaires et des basophiles circulants a montré une inhibition de la dégranulation de ces cellules et de la production des cytokines. Dans des expériences *in vivo*, l'administration de dérivés de fullerène chez la souris a inhibé l'anaphylaxie sans présenter d'effets toxiques (41). Dans un autre travail, l'asthme a été induit sur un modèle de souris qui ont été ensuite traité avec un dérivé du fullerène. L'inflammation des voies respiratoires, le taux sérique d'IgE et des cytokines inflammatoires sont significativement réduits (115). D'autres études ont confirmé que des dérivés du fullerène peuvent inhiber la libération des médiateurs d'inflammatoire des mastocytes pulmonaires humains en culture (116). Dans une étude complémentaire faite par la même équipe, les dérivés du fullerène ont inhibé la dégranulation et la production des cytokines dans les mastocytes de la peau humaine et dans les basophiles en culture. Dans le même travail l'effet des dérivés du fullerène sur l'anaphylaxie a été évalué *in vivo* chez les souris (117).

2.2. Toxicité, pharmacocinétique et bio-distribution

Concernant la toxicité du C₆₀, sa pharmacocinétique et sa bio-distribution, les études consacrées aux deux derniers points restent très rares. Notre équipe a publié en 2008 (30) une revue générale très détaillée et un article décrivant, pour la première fois, la pharmacocinétique, la bio-distribution et l'élimination du C₆₀ après administration orale ou intra-péritonéale (27,28). Le contenu de ces deux papiers concernant ces aspects du comportement du C₆₀ in vivo peut être résumé ainsi

1. Le C₆₀ est dénué de toute toxicité, aiguë ou chronique, chez les rongeurs. Ce qui n'est pas le cas de ses dérivés, dont certains peuvent être très toxiques. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs équipes indépendantes dans différents modèles expérimentaux chez des organismes appartenant à différents clades.
2. Le C₆₀ est doué de propriétés anti-radicalaires, inégalées. Notamment, il est plus actif in vivo que tous ses dérivés essayés par d'autres auteurs, jusqu'à ce jour.
3. Le C₆₀ est éliminé après administration à un organisme vivant, en quelques heures
4. Le C₆₀ est bien absorbé par voie intestinale et
5. Le C₆₀ peut prolonger de plus de 45 pour cent l'espérance de vie des rongeurs, après administration réitérée à faibles doses par voie orale (B2-B4).

Objectifs du travail

Ce rappel bibliographique montre clairement que :

1. si le C_{60} pur est dénué de toxicité, il n'en est pas de même des échantillons impurs. Or, le développement de toute application dans le domaine biomédical est tributaire de cet aspect.
2. si l'intérêt du C_{60} dans la lutte contre le stress oxydatif est actuellement bien établi, il n'en est pas de même de son mécanisme d'action, qui reste encore obscure.

De ce fait, l'objectif de ce travail a été double. Le premier vise à évaluer les outils analytiques pour déterminer un critère de pureté pour les préparations commerciales de C_{60} . Le second est dédié à l'exploration du mécanisme d'action du C_{60} dans la lutte contre le stress oxydatif.

Dans la suite de ce mémoire, nous exposerons d'abord notre contribution à l'établissement d'un critère de pureté avant d'exposer les résultats obtenus sur l'exploration du mécanisme d'action.

Chapitre II

Purity assessment of [60]fullerene samples

Les fullerènes peuvent être produits directement par synthèse ou ils peuvent être produits après l'utilisation et/ou la destruction de matériaux à base de carbone (118) lors des phénomènes naturels et des activités humaines. Les incendies de forêts, les éruptions volcaniques (119–121), sont les sources naturels par lesquelles les fullerènes peuvent être produits. Les activités humaines qui conduisent à la production des fullerènes peuvent entraîner la formation de sous-produits pendant la combustion des matières carbonées et pendant le trafic routier (par exemple, la combustion de carburant (122)).

Au cours de la phase de découverte, les fullerènes ont été produits en évaporant une électrode de graphite dans une atmosphère d'hélium. Cependant, de nombreuses autres approches ont été utilisées pour la production de fullerènes telles que l'ablation laser, l'évaporation par bombardement électronique, l'évaporation par l'énergie solaire (123), le chauffage résistif du graphite, la décharge d'arc entre électrodes de graphite (35,36), le chauffage inductif incomplet, la combustion d'hydrocarbures (39,57,121), la pyrolyse d'hydrocarbures aromatiques comme le naphthalène (124) et par synthèse organique (57,125).

Alors que par combustion et méthode synthétique, seuls 0,1 à 1% en poids de carbone sont transformés en fullerènes, par décharge en arc ou chauffage résistif, des fullerènes peuvent être obtenus en quantités beaucoup plus importantes de 10 à 30% en poids. Selon la «règle du pentagone isolé» (IPR) (126), le C_{60} est le plus stable parmi les fullerènes et les méthodes de production conduisent souvent à des mélanges contenant environ 80 à 90% en poids de C_{60} (127).

La méthode principale de production de quantités macroscopiques de fullerènes est basée sur la décharge en arc et le chauffage résistif du graphite dans une atmosphère d'hélium (78). Dans l'étape suivante, la vapeur est condensée et les fullerènes sont extraits par sublima-

tion en gradient (128) ou par extraction en solvant des suies obtenues (34,39,78,129). En sublimation de gradient, C_{60} peut être sublimé directement de la suie par chauffage à 400 °C sous vide ou dans une atmosphère inerte (78).

Généralement, l'extraction par solvant est utilisée avec des solvants appropriés tels que le toluène (extraction Soxhlet) ou le benzène. La solution est concentrée par évaporation et séparée soit par des méthodes chromatographiques (34), avec des solvants organiques tels que l'hexane et/ou le toluène comme éluant (130), soit par chromatographie liquide à perméation de gel (GPC) avec du toluène comme solvant (131), ou par la différences de réactivité chimique entre les fullerènes comme dans la complexation avec $AlCl_3$ (57). Bien que la chromatographie semble être un outil de séparation efficace, la décomposition des fullerènes et l'adsorption sur la phase stationnaire ont été rapportées (129,132–135).

Le C_{60} est soluble dans un certain nombre de solvants tels que le CS_2 , le toluène, l'hexane et le benzène, ce qui facilite la croissance cristalline à partir d'une solution par une lente évaporation (78,136). Cependant, les cristaux de C_{60} issus d'une solution sont souvent contaminés par d'autres espèces de fullerènes et/ou par un solvant résiduel. Les impuretés peuvent occuper des sites interstitiels dans le cristal C_{60} ou se lier chimiquement au fullerène. En revanche, le C_{60} extrait par solvant et séparé des autres fullerènes par des méthodes chromatographiques peut également être purifié par sublimation à 560-620°C, ce processus se termine par la condensation du C_{60} en cristaux presque sans défaut (137).

Il a été démontré que les échantillons de C_{60} les plus hautement purifiés (préparés par chromatographie suivie d'une sublimation) peuvent encore contenir des impuretés telles que des particules de graphite, d'autres fullerènes tels que C_{70} (10-20% en poids), C_{76} et C_{84} (moins de 1% en poids) et des fullerènes encore plus grands (34), ainsi que des nanotubes de carbone (35,36).

Même lorsque d'autres fullerènes ont été éliminés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC), les solvant résiduel tel que le toluène, le benzène, la pyridine, le disulfure de carbone (38), l'heptane, l'hexane, le 1,2,3,5-tétraméthylbenzène ou l'éther peuvent encore rester (39,40). Des impuretés produites par des réactions chimiques entre les fullerènes et les solvants au cours de la phase d'extraction ont été aussi rapportées (34). En outre, bien que la sublimation soit connue pour produire des cristaux de C_{60} sans solvants, l'analyse par spectroscopie infrarouge à haute résolution par perte d'électrons a démontré que des hydrocarbures peuvent encore être présents dans l'échantillon (37). L'analyse thermogravimétrique (ATG) et les données de spectrométrie de masse ont confirmé que le toluène peut rester adsorbé sur la poudre de C_{60} jusqu'à des températures de 600°C (37,40).

La pureté de la tige de graphite utilisée pour la synthèse des fullerènes est essentielle pour un rendement optimal et pour réduire les impuretés, car la présence de composés contenant de l'hydrogène pendant la synthèse peut entraîner la formation de carbones aromatiques polycycliques et diminuer le rendement en fullerènes (138,139). De plus, des quantités non-négligeables de trace des éléments tels que Ar, Au, Br, Cl, Cu, K, Mn, Na, V et Zn peuvent être présentes dans C_{60} purifié et affecter les propriétés optiques, magnétiques et électriques de fullerènes (140).

Les oxydes de fullerènes peuvent être obtenus en tant que sous-produits de la synthèse du C_{60} . L'oxydation de l'une des 30 doubles liaisons carbone équivalentes de C_{60} donne une structure époxyde (141,142). En présence d'oxydants tels que l'ozone (143), le peroxyde organique (144), le diméthyldioxirane (145), le cytochrome P450 (146) et le méthyltrioxorhénium-peroxyde d'hydrogène (147), l'époxydation des fullerènes pourrait se produire. De plus, une dégradation photochimique du C_{60} après exposition à la lumière pendant 10 à 16 heures a été rapportée, indiquant que la fragmentation de la cage de fullerène pourrait être une source d'impureté si le C_{60} n'est pas conservé au noir et sous vide (148).

Il apparait par conséquent que les modes préparatoires peuvent conduire à des préparations de fullérènes impures. Les effets toxiques du fullerène montrés par certaines publications (149–151) ont été reliés aux impuretés présentes dans les échantillons utilisés (26–28,32,152–154). Aucun critère de pureté officiel n'existe actuellement bien que les propriétés physico-chimique du C₆₀ soient bien connues. Étant donné les nombreuses applications biomédicales ont été proposé pour le C₆₀ (et ses dérivés de synthèse) tel que l'hépatoprotection (27,28,153), la neuroprotection (103,155), les effets anticancéreux et antimicrobiens (4,24,156–158), l'activité anti-inflammatoire (111,113,114) et même la prolongation de l'espérance de vie (26–28) des préparations de fullérènes à la pureté et la qualité certifiées sont indispensables. C'est pourquoi, dans le premier volet de cette thèse, nous avons évalué les différentes techniques physico-chimiques afin de proposer des critères de pureté.

A purity criterion for medicinal [60]fullerene in urgent need of regulatory considerations

Sanaz Keykhosravi,[†] Ivo B. Rietveld,[‡] Diana Couto,[†] Josep Lluís Tamarit,[¥]
Maria Barrio,[¥] René Céolin,[†] Fathi Moussa.^{†*}

Article : soumis à ACS omega

[†]LETIAM, EA7357, IUT d'Orsay, Université Paris Sud, Plateau de Moulon, 91400 Orsay, France

[‡]Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Université Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. And, Normandie Université, Laboratoire SMS – EA 3233, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan, France.

[¥] Grup de Caracterització de Materials, Departament de Física and Barcelona Research Center in Multiscale Science and Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya, EEBE, Campus Diagonal-Besòs, Av. Eduard Maristany 10-14, 08019 Barcelona, Catalonia, Spain.

* to whom correspondence should be addressed

Abstract

Since the publication of the effects of [60]fullerene (C_{60}) on the lifespan of rats a myriad of start-ups went ahead selling C_{60} -olive oil solutions worldwide without any approved preclinical study. Although pure C_{60} is not toxic, C_{60} aggregates may contain toxic substances like any other highly adsorbing material. Indeed, during the last decade, the use of impure C_{60} preparations by some authors has raised doubts about the safety of C_{60} , which has been a major obstacle to the development of C_{60} -based drugs. While it is nearly impossible to stop the sale and distribution of C_{60} products with toxic impurities, in order to protect potential users, it is necessary to at least provide the tools to verify the quality of such products. Therefore, a purity criterion for C_{60} is urgently needed.

The physicochemical properties of C_{60} are well known; however, only two studies have been devoted to the analysis of the purity of a C_{60} sample. Here we have evaluated several techniques to verify the purity of four representative commercially available C_{60} samples, all labelled with a purity over 99.5 %. The techniques involve (a) the solid state including scanning electron microscopy (SEM), high-resolution X-ray powder diffraction (HR-XRD), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and (b) solution including reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and UV-Vis spectrophotometry. After evaluating the advantages and limitations of each technique, our results show that DSC is the best candidate to establish a straight-forward purity criterion based on the sc-fcc transition of C_{60} , while FTIR is the easiest way to control the quality of C_{60} during the fabrication process. However, even the color of a C_{60} sample may already provide a clue on its purity as highly pure, crystalline C_{60} has a metallic black appearance.

Introduction

Since the early nineties [60]Fullerene (C_{60}), the most abundant fullerene, has attracted intense interest in the field of biomedical applications (1,2) related to the three main properties of C_{60} . The first one is associated with its geometry. Due to its shape and size, C_{60} can fit inside the active site of some enzymes such as HIV protease, thus inhibiting their activity (3). Also, the fullerene cage can encapsulate metal atoms such as rare-earth elements. The obtained endohedrals can then be used for imaging and radiotherapy (4). The second property is related to the fact that through light exposure C_{60} can sensitize singlet oxygen formation (5), which has led to some C_{60} derivatives to be proposed as drug-candidates for photodynamic therapy (2,6). The third property is the chemical reactivity of this molecule that is dominated by addition reactions (7) including free radical scavenging. (8,9) Hence, dozens of well-characterized derivatives have been synthesized (7,10-12) and have been proposed for countless biomedical applications (2). The first review on this subject published more than 20 years ago had already depicted all potential biomedical applications, thus predicting that fullerenes will lead to a large panel of new drug candidates (6).

One of the most investigated properties in the field of biomedical applications is the unparalleled affinity of C_{60} for radicals (8,9). As C_{60} is not soluble in water and only soluble in some organic polar solvents, chemists resorted to its water-soluble derivatives frequently arguing that only those can be used for biomedical purposes (6). While it is of importance to study the chemical reactivity of C_{60} , the idea that biomedical applications may be hindered by water-insolubility of this molecule is obviously wrong. Indeed, it has been shown since the early 1990s that C_{60} can be easily absorbed by living organisms (13). Moreover, it has been shown more recently that C_{60} is more active in free-radical scavenging than its derivatives (14).

To sum it up, countless potential biomedical applications have been reported for C₆₀ and its derivatives during the last two decades (2,15) ranging from anti-inflammatory and anti-allergic effects to protection against ionizing-radiation-induced mortality and neuroprotection, through control of the acnes vulgaris and even the potentiation of hair growth (2). Most of these beneficial effects are related to its ability to scavenge free radicals.(159) Hence, several independent teams from different countries, using a large panel of experimental models, have demonstrated that various synthetic compounds with the C₆₀ moiety in common can promote and sustain good health. Thus, it is not surprising that pristine C₆₀ has been shown to extend the expected lifespan of mammals (16,17). What, then, prevents the transformation of all these promises into reality? (18) What prevents the occurrence of legal C₆₀-based drugs? In fact, a main obstacle is the concern about fullerene toxicity raised by some studies conducted with contaminated fullerene samples (19,20).

Nowadays, a series of tests conducted by several independent teams have confirmed the safety of pure C₆₀ in a large panel of experimental models encompassing different clades (21). Nevertheless, a certified toxicity study is still lacking. Also, C₆₀ aggregates may convey toxic elements as any other aggregated material (20). Besides, since the publication of the effects of C₆₀ on lifespan of rats (16,17) a myriad of start-ups has started selling on a worldwide scale C₆₀-olive oil solutions presumably for research only (2). In order to avoid any new toxicity alerts like the one that occurred in 2004 (19), which would definitively condemn the use of fullerenes in the biomedical realm, a quality testing tool is urgently needed. To this purpose, it is of importance to define a purity criterion for C₆₀ and to develop some simple tools to check the purity of C₆₀ samples.

While the physicochemical properties of C₆₀ are well known, only two studies have been devoted to the analysis of the purity of C₆₀ samples (23,24). After comparing the performances

of several characterization techniques including fast atomic bombardment (FAB)-Mass spectrometry, FTIR, and UV-VIS spectrometry, and scanning electron microscopy (SEM), the first study concluded that thermal analysis is a powerful technique for analyzing the purity of C₆₀-samples (24). The second report, published eleven years later, concluded that only chromatographic analysis, as currently mentioned in the certificates of C₆₀ samples, is not sufficient for detecting all impurities. According to the authors, it is necessary to use in addition to chromatography a method of mass spectrometry (22).

In this work we used several methods in the solid state, including scanning electron microscopy (SEM), high-resolution X-ray powder diffraction (HR-XRD), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as well as in solution, including reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and UV-Vis spectrophotometry, to compare the purity of four C₆₀-samples from different origins. The main objective of this work was to select the best and the simplest tools to verify the purity of a C₆₀ sample.

Results

Studies in the solid state

Morphology of the samples

The four investigated C₆₀ samples, S1, S2, S3, and S4 consist of fine powders exhibiting dark grey to black color for the S1, S2, and S4 samples or a clear brownish hue for the S3 sample. In order to further investigate their crystallinity we examined the samples by electron microscopy. SEM photographs (Figure 1) show that the C₆₀ particles of all samples exhibit the usual shapes (25-27) of face-centered cubic C₆₀ microcrystals, i.e. twinned cuboctahedra with well-developed (111) faces while the (100) faces are mostly absent. Closer analysis reveals that

samples S1 and S2 consist of grains of nearly uniform size of about 150 μm in diameter. For the samples S3 and S4, the size distribution is much more polydisperse containing grains of various sizes and particles of 1 μm or less in diameter adsorbed at the crystal surfaces. In particular in sample S4 aggregates of small cubic crystallites can be observed (Figure 1).

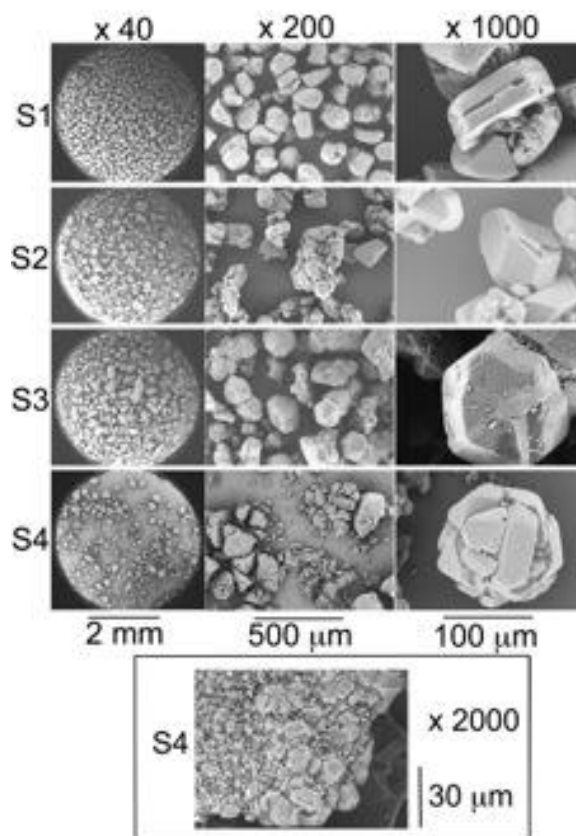


Figure 1. Scanning electron microscopy photographs of crystalline C_{60} powders of samples S1, S2, S3, and S4 with different magnifications. The inset shows the photograph of an aggregate of C_{60} crystals found in sample S4.

Crystallographic studies

Figure 2 shows the high-resolution X-ray powder diffraction (XRD) patterns of the 4 samples obtained at 300 K. All samples exhibit the same profile as far as the peak positions are concerned, and the difference, if any, consists of small changes in relative intensities probably due to preferred orientation of the unground crystallites introduced in the Lindemann capillaries. In addition, it can be observed that sample S3 may contain some amorphous material or

very small crystals as a slight amorphous halo can be observed around $20^\circ 2\theta$ (The step observed at $4^\circ 2\theta$ is due to the alignment of the diffractometer).

The four diffraction patterns are identical to the theoretical pattern. Moreover, none of these four patterns exhibits the “*asymmetric ‘shoulder’ superimposed on the normal (111) Bragg reflection*” described previously (5,28) and frequently ascribed to stacking faults and/or residual impurities by several authors (29,31).

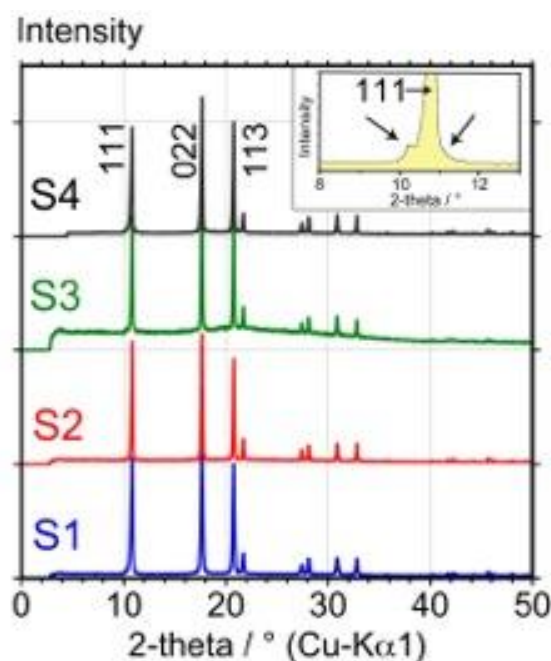


Figure 2. High-resolution X-ray powder diffraction patterns of samples S1, S2, S3, and S4, obtained at 300 K. The arrows in the inset show how stacking faults and impurities modify the profile of reflection 111.

The lattice parameter **a** of fcc C_{60} at 300 K has been refined for each sample using the pattern matching tool of the FullProf program (32). It has led to the following values: S1: $14.1747(9) \text{ \AA}$, S2: $14.1829(7) \text{ \AA}$, S3: $14.1950(12) \text{ \AA}$, and S4: $14.1707(11) \text{ \AA}$.

As the level of crystalline impurity observed by this technique can be as low as 1% for an acquisition time of at least one hour, large amounts of crystalline impurities in the form of solvates are clearly not present, although small amounts below the detection limit of 1% cannot

be excluded. Moreover, comparing the obtained lattice parameters with those of $C_{60}O$ reported in the literature ($a/\text{\AA} \approx 14.15 - 14.21$), (33) it is clear that the presence of C_{60} epoxide in the fcc lattice of C_{60} cannot be excluded as a result of the insignificant difference in unit-cell parameters. Its presence should be investigated by other techniques.

Hence, with XRD, it can be confirmed that no significant crystalline impurities are present in the solid samples, however sample 3 contains some amorphous (non-crystalline) material.

Differential Scanning Calorimetry

Although the melting temperature of fcc C_{60} remains unknown, because it sublimes or decomposes before melting, early DSC studies have shown that a first-order transition into a simple cubic (sc) structure occurs on cooling, which reverts back to the fcc phase at 257.1 K on reheating (34,35). Using a large single crystal, it was found that the onset temperature of this transition occurs at 261.4 K with an enthalpy change of $9.0 \pm 0.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($12.5 \pm 0.7 \text{ J g}^{-1}$) including a 2.2 kJ mol^{-1} (3 J g^{-1}) pre-transitional effect starting at about 220 K. If the pre-transitional effect is not taken into account, the enthalpy change of the endothermic peak at 261.4 K was found to be $9.5 \pm 0.7 \text{ J g}^{-1}$. Figure 3 shows the results obtained on heating with the four studied samples and the temperature and enthalpy changes with uncertainties of $\pm 1 \text{ K}$ and $\pm 5\%$ of the enthalpy value are summarized in Table 1.

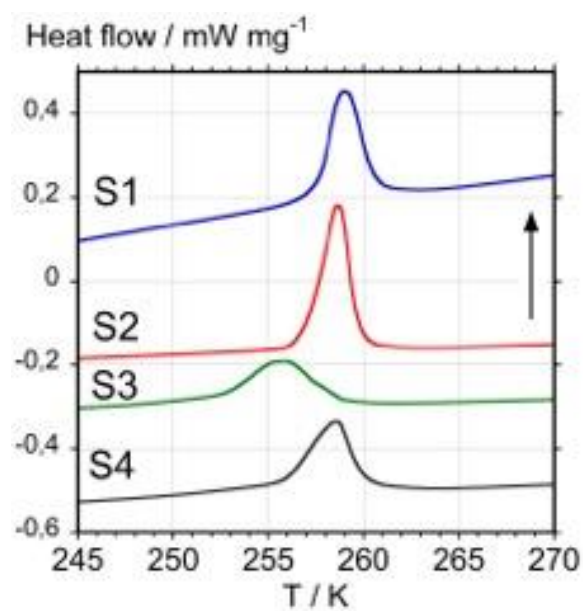


Figure 3. Differential scanning calorimetry curves obtained with samples S1, S2, S3, and S4 at a heating rate of 10 K min^{-1} . The vertical arrow indicates the endothermic direction.

Table 1. Temperature and enthalpy changes

Samples	T onset/ °C (K)	$\Delta H / \text{J} \cdot \text{g}^{-1}$
S1	-15.1 (258.0)	8.4
S2	-13.1 (260.0)	9.2
S3	-18.5 (254.6)	6.8
S4	-15.9 (257.2)	6.9

Considering that an enthalpy change and an onset temperature closest to the result for the single crystal are indicative of a higher purity, it can be concluded that samples S1 and S2 clearly have a higher purity than the other two samples S3 and S4. For S3, the decrease in enthalpy fits the XRD observation of the presence of amorphous material, although the lowering of the transition temperature also points to the presence of impurities, whereas in the case of S4, a possible presence of impurities may explain the lowering of the value of the transition enthalpy.

Thermogravimetric results

Thermogravimetric measurements have been run from room temperature to 673 K (Figure 4). C_{60} samples were placed in pierced aluminum pans and an empty pan was used as a control. It can be seen (Figure 4) that no significant weight loss occurs up to about 600 K with S1, S2 and S3. In contrast, sample 4 exhibits a sudden weight loss of about 2 % in the 350-450 K range that can be ascribed to molecular materials with a relatively high vapor pressure, which are most likely residual solvents trapped in the fcc lattice. The weight loss of about 1% in the 600-650 K range observed for S1 cannot be explained by the loss of residual solvent, since volatile organic solvents used to extract and purify C_{60} , when trapped in the fcc lattice, are known to leave the C_{60} lattice in the temperature range of 300-450 K.

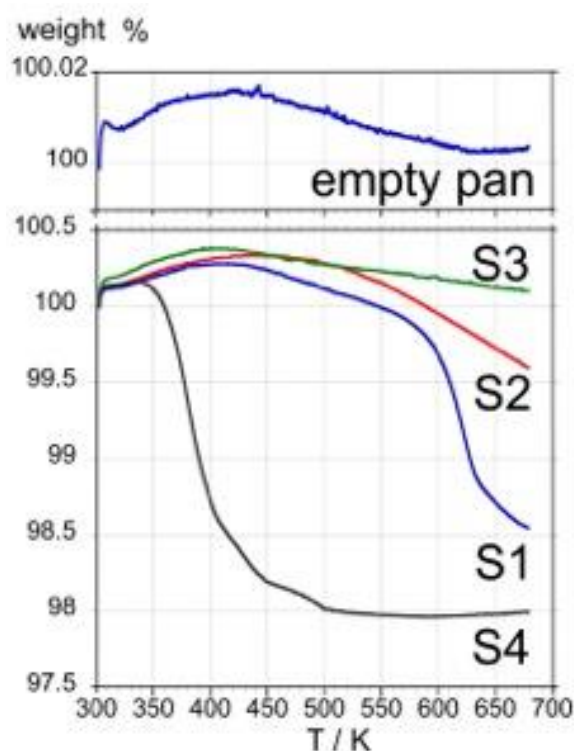


Figure 4. Thermogravimetry curves obtained with samples S1, S2, S3, S4, and an empty pan at a heating rate of 10 K min^{-1} .

Thus, TGA experiments confirm that samples S1 and S2 possess a high purity. The fact that no mass loss was found for sample S3, which clearly contains impurities following the DSC results, can tentatively be explained by impurities composed of polymer-like C₆₀ substances, possibly induced by light exposure (36). The presence of volatile impurities are confirmed for sample S4.

Infrared spectroscopy

To investigate in particular the impurities of sample S3 in the solid state, also in relation to its clear brownish hue, FTIR was used. FTIR has been used before to compare the purity of C₆₀ samples and the presence of additional peaks in C₆₀ spectra has been reported for certain samples (23,24). Figure 5 shows the representative spectra of the samples S1 and S3. The peaks at 526, 575, 1181 and 1427 cm⁻¹ correspond to C₆₀ vibrations (Figure 5A) (37,38). Both samples exhibit additional peaks at 2850-3000 cm⁻¹, which can be ascribed to saturated C-H bonds (39), as well as some peaks at 796, 1044, 1259 cm⁻¹, which can be ascribed to methyl-siloxane derivatives (40). Moreover, for sample S3 additional peaks at 669, 738, 775, and 802 cm⁻¹ most likely related to aromatic C-H vibrations (Fig. 5B) were also observed. These latter peaks closely correspond to those typical for toluene and xylene (39), indicating that despite the absence of weight loss, sample S3 contains small amounts of aromatic solvents, whereas sample S1 does not.

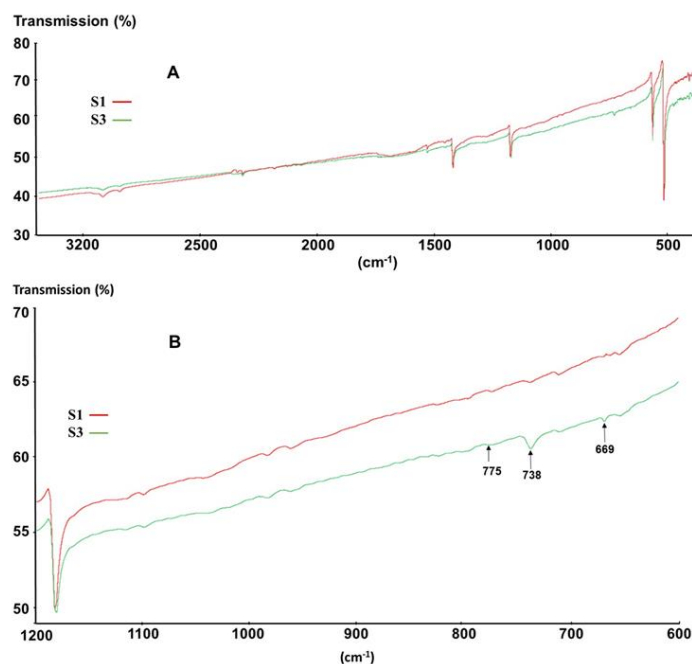


Figure 5. (A) FTIR spectra of S1 (red) and S3 (green). (B) Magnification of (A).

Taking the results of the solid-state studies in consideration, it is clear that samples S1 and S2 are the purest, whereas samples S3 and S4 contain some impurities. It is however not possible to determine the identity of these impurities, which will be carried out below with a further series of analytical methods.

Studies in solution

Considering that impurities that interact with C_{60} will mainly consist of aromatic molecules, which absorb in the UV domain, their presence will affect the molar absorptivity of C_{60} -samples. Thus, UV-Vis spectroscopy could be considered as one of the simplest tools to check the purity of a C_{60} -sample.

Figure 6A show the representative UV-Vis spectrum of a toluene solution of the studied samples. The observed spectral features agree with those previously observed by other authors (41,42). The absence of absorption bands at 424 and at 496 nm characteristic of $C_{60}O$ (43)

clearly indicate that this impurity can only be present at concentrations below the limit of detection.

Figure 6C shows the comparison between the calculated molar absorptivity of each sample at 336 nm. The obtained data clearly show that while there is a significant difference between samples S1 and S3, and S2 and S3, there is no significant difference between S4 and the 3 other samples, probably because of the low concentration of impurities in these samples. Indeed, the within-run ($n = 6$) and between-run ($n = 6$) precisions of the method under our conditions are of 0.1 % and 0.5 %, respectively. Further analyses in other solvents such as hexane or methanol may provide additional information (44,45). However, C_{60} is sparingly soluble in these solvents and therefore high precision results may be difficult to obtain rapidly.

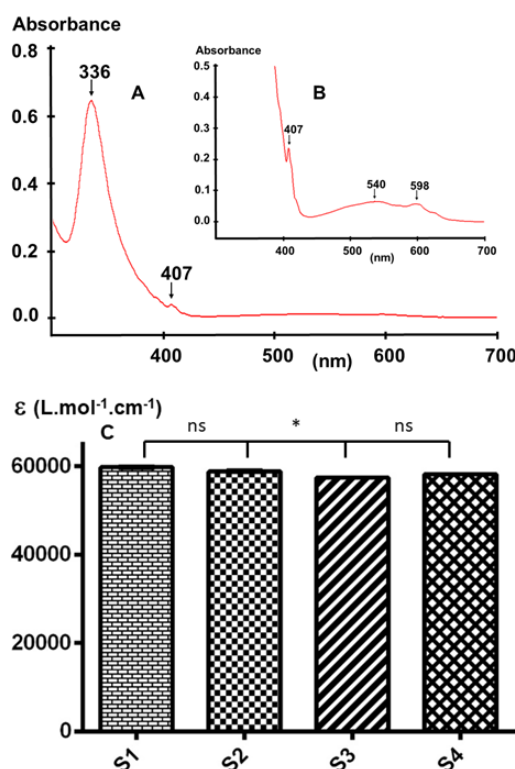


Figure 6. Representative UV-Visible spectrum of (A) a C_{60} sample, (B) magnification of (A), and (C) comparison between the molar absorptivity of the four samples. (ns = not significant).

High-Pressure Liquid Chromatography

HPLC is commonly used to check the purity of C_{60} samples, notably in order to check the presence of higher fullerenes and/or C_{60} derivatives. Hence, we analyzed the samples by HPLC coupled to diode array detection with a previously validated method (46) with a minor modification. Notably, we doubled the column length in order to enhance the resolution to better separate possible impurities eluting before C_{60} . Such impurities should include peaks corresponding to more polar compounds such as oxide derivatives. However, other aromatic compounds such as benzene and anthracene derivatives cannot be detected under these chromatographic conditions because of the UV cut-off of the toluene based mobile phase (47).

Injecting a 5 mg/L C_{60} solution showed no additional peaks thus indicating the absence of significant amounts of higher fullerenes or C_{60} -oxides in the samples. Nevertheless, the injection of an overloading C_{60} concentration (Figure 7A) shows at least 6 minor peaks (Figure 7A, insert I₁) eluting before the C_{60} peak. Based on their spectral features (Figure 7A, insert I₂), these minor peaks can be ascribed to C_{60} -oxides (43).

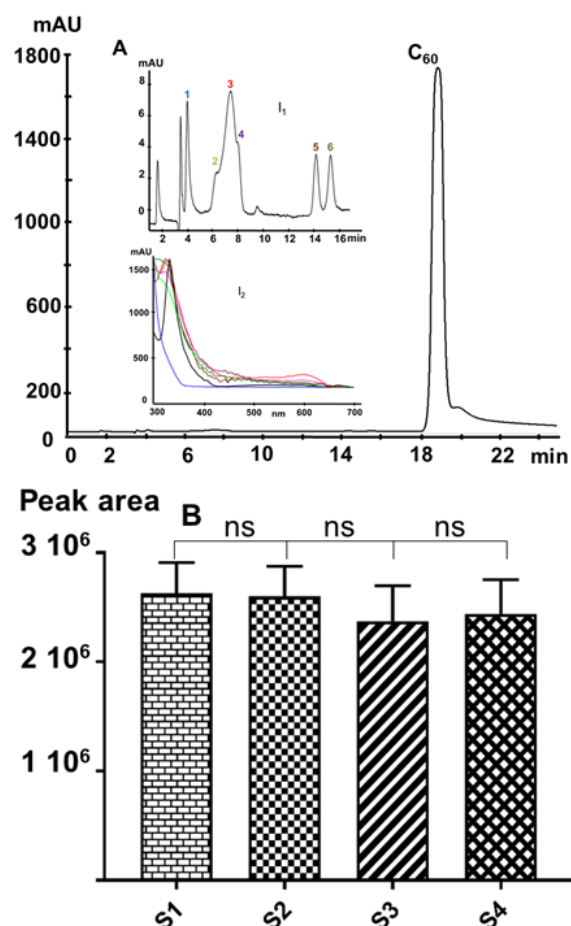


Figure 7. Representative RP-Chromatographic profile of a C₆₀ sample: (A) 45 mg/l (the shoulder and the tailing peak are due to mass overload), (I₁) magnification of (A), and (I₂) extracted spectra of 1 to 6 peaks. (B) Comparison between the (peak area/ C₆₀-concentration) ratios of the four samples injected at a concentration of 5 mg/l. (ns = not significant).

Figure 7B summarizes the comparison between the area/concentration ratios of each C₆₀ sample. With a maximum imprecision of 5.8 % (n = 6 for 3 different days), the data of HPLC analyses show no significant differences between the considered samples.

While HPLC is the most appropriate technique to verify the eventual presence of higher fullerenes and/or C₆₀-derivatives such as C₆₀-O derivatives in a C₆₀ sample, the precision of this technique cannot provide a quantitative comparison between the studied samples. These data agree with those published previously (23).

GC-MS analyses

As TGA and FTIR data suggest the presence of volatile impurities, GC-MS has been performed in order to identify them.

Figure 8 shows the obtained GC-MS chromatographic profiles. They clearly show the presence of several volatile impurities (Table 2) namely benzene, naphthalene, phthalate, and siloxane derivatives. These semi-quantitative analyses confirm the data obtained by the analyses in “solid state” indicating that the samples can be classified as a function of their purities as follow: $S1 > S2 > S4 > S3$. Notably, the S3 and S4 samples contain considerable amounts of xylene and toluene as compared to the S1 and S2 samples.

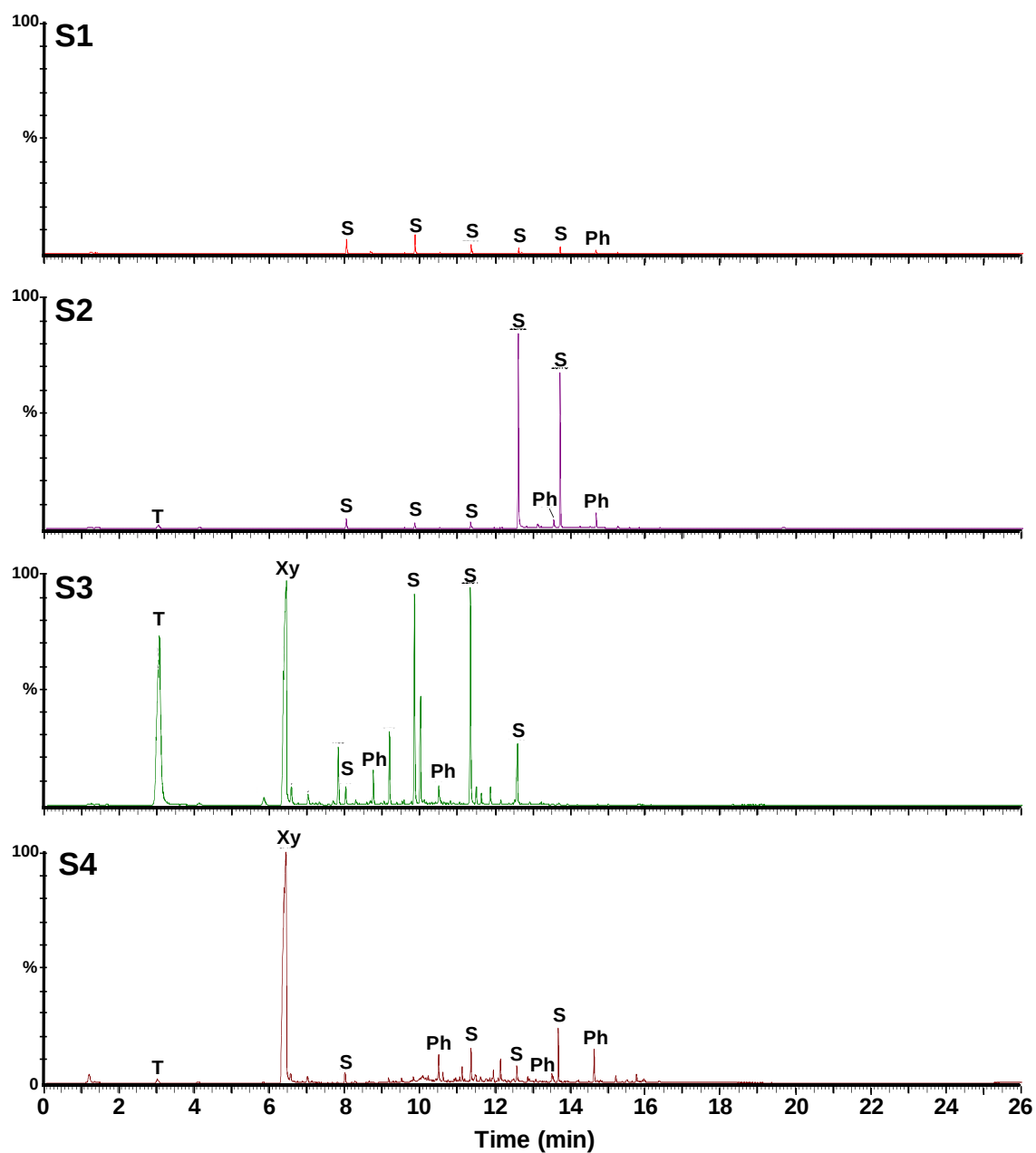


Figure 8. GC-MS Chromatograms of the four C₆₀ samples (T: Toluene, Xy: Xylene, S: Siloxane derivatives, Ph: Phthalate derivatives).

Chapitre II

Table 2. Detected impurities in the four C₆₀ samples (Semi-quantitative aspect; - absence; and + presence)

	S1	S2	S3	S4
Toluene	-	+	+++	+
Xylene	-	-	+++	+++
Trimethyl-benzene	-	-	±	-
Tetra-methyl-benzene	-	+	+++	-
Penta-methyl-benzene	-	-	+	-
Hexa-methyl-benzene	-	-	+	-
Hydroxylated toluene	-	-	-	+
Dichlorobenzene	-	-	±	-
Methylbenzaldehyde	-	-	+	-
Hydroxymethylbenzoic acid	-	-	+	-
Naphthalene	-	-	+	-
Methylnaphthalene	-	-	+++	++
Dimethylnaphthalene	-	-	+	+
Trimethylnaphthalene	-	-	+	-
Tetramethylbiphenyl	-	-	-	+
Dibuthyl Phtalate	±	+	±	+++
Phthalic acid, isobuthyl octadecyl ester	++	+++	±	+++
Diethyl Phthalate	±	++	±	++
Benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester	-	++	-	++
Octamethylcyclotetrasiloxane	++	-	++	-
Decamethylcyclopentasiloxane	++	+	+++	+
Dodecamethylcyclohexasiloxane	+	+	+++	++
Tetradecamethylcycloheptasiloxane	+	+++	+++	++
Hexadecamethylcyclooctasiloxane	+	+++	±	+++
Octadecamethylcyclononasiloxane	+	++	-	++

The obtained results could be used, after appropriate calibration and validation of the GC-MS method, to quantify the residual solvents and other volatile impurities in a C₆₀ sample.

Conclusion

The results in this paper demonstrate the advantages and limitations of each technique to characterise and evaluate the purity of C₆₀ samples. The data show that while DSC is probably the most appropriate technique to establish a simple purity criterion for C₆₀ samples based on the sc-fcc transition temperature and enthalpy change, FTIR provides a rapid assessment of the kind of impurities present in the C₆₀ samples during the production process. Finally, GC-MS provides the most detailed picture of the various volatile molecular impurities that can be found in the different C₆₀ samples, whereas HPLC provides information on the presence of higher fullerenes and oxidized/and or functionalized fullerene species.

Nonetheless, it should not be forgotten that even the visual aspect of the samples can already provide clues about the quality as sample S3, which contains most kinds of impurities and is least crystalline, possesses a brownish color, whereas the highly crystalline samples S1 and S2 containing very few molecular impurities have a black metallic appearance.

Experimental section

Materials

Commercial C₆₀ samples with different degrees of purity as specified by the manufacturers: S1 (99.98 %); S2 (> 99.98 %); S3 (99.9 %); and S4 (99.5 %) were used for this study.

Toluene was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and acetonitrile from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Both solvents were of high purity grade (99.9 %) and were used without further purification.

Scanning Electron Microscopy

Electron microscopy images have been obtained using a Hitachi TM-1000 (Japan) tabletop scanning electron microscope with a scanning voltage of 15 kV. To improve the quality of C₆₀ sample images, their surface was coated with a thin layer of gold.

High Resolution X-ray Powder Diffraction

X-ray powder diffraction was carried out on a transmission mode diffractometer using Debye–Scherrer geometry equipped with cylindrical position sensitive detectors (CPS120) from INEL (France) containing 4096 channels (0.029° 2 θ angular step) with monochromatic Cu K α_1 ($\lambda = 1.5406$ Å) radiation. Unground specimens were introduced in a Lindemann capillary (0.5 mm diameter) rotating perpendicularly to the X-ray beam during the experiments to improve the average over the crystallite orientations. All samples were measured at 300 K for at least one hour. External calibration using the Na₂Ca₂Al₂F₁₄ cubic phase mixed with silver behenate was performed by means of cubic spline fittings. The XRD patterns data were analyzed with FullProf v2.05.18 (32).

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC measurements at normal pressure were performed by means of a Q100 thermal analyzer from TA-Instruments (USA) under He flux at cooling then heating rates of 5 K min⁻¹ in the temperature range from 303 K to 213 K. Samples masses (≈ 5 mg) were weighed with a micro-balance sensitive to 0.01 mg and sealed in aluminum pans of 30 mL inner volume. Indium was used as a standard for the calibration of temperature and enthalpy change.

Thermogravimetry

Thermogravimetric measurements were performed by means of a Q50 system from TA Instruments (USA) under nitrogen flux from room temperature to 673 K. Heating rates of 10 K·min⁻¹ and sample masses of ca. 5 mg were used.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR analyses were performed on tablet transmission sampling mode. Tablets were prepared by mixing ~1 mg of C₆₀ sample powder with 10 mg of KBr powder and then analyzed in a PerkinElmer Frontier IR/FIR (Perkin ELMER, France) instrument in a 400-4000 cm⁻¹ ranges.

Reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to diode array detection

Chromatographic analyses were performed as previously described (46) with minor modifications. We used a longer column (25 cm instead of 12.5 cm) packed with the same stationary phase in order to better separate possible impurities eluting before C₆₀. The mobile phase consisted of a mixture of toluene/acetonitrile (42/58, v/v) and was delivered by a P100 Spectra-System pump connected to a UV6000 LP diode array detector (Thermo Spectra-System LC, Courtaboeuf, France). All chromatographic analyses were performed at 30°C with a flow rate of 0.8 mL/min.

Working solutions of 1, 2, 5 and 45 mg/L were prepared daily by appropriate dilution of the stock solution (100 mg/L) in the mobile phase before injection of 20 µL into the HPLC system (n = 6 injections for each solution and every day during 6 days).

UV-vis spectrophotometry

For the UV-Vis spectrophotometry, stock solutions (100 mg/L) were prepared by dissolving each C₆₀ sample in toluene. After stirring for 3 days, working solutions of 8 and 50 mg/L were prepared daily after appropriate dilution in toluene and scanned (300 to 700 nm) by an Agilent Varian 50 Bio spectrophotometer. Direct detection was recorded at 336 nm, and 407 nm.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry

Two measurement series have been carried out with GC-MS, using a headspace trap method. C₆₀ impurities were detected by the HS-trap GC-MS equipped with a 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Elite-5MS column (Perkin ELMER, France) in the trap temperature range between 40-280°C. C₆₀ powder was placed in a closed vial, which was loaded into a thermostatic oven and heated at 160°C for 20 min. A needle was then lowered into the headspace of the vial, which was pressurized with He as a carrier gas at 35 psi for 1.5 min. While the needle was still in the vial, the carrier flow to the vial was interrupted and by lack of external pressure, the already pressurized headspace vapor was forced to escape through the needle and the trap at 40°C, where the compounds in the vapor were adsorbed. This was repeated 4 times, removing practically the entire analyte vapor from the sample vial. The analytes were thus pre-concentrated in the trap for desorption. The trap was heated to 280°C at 20 psi sweeping the desorbed analytes out of the trap and into the column at 10 psi for GC analysis. The analytes were separated on the non-polar capillary column (active phase: CP Sil 5 CB). The oven was heated from 40 °C to 220 °C with a heating rate of 4 °C min⁻¹.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using one-way ANOVA test with 95% confidence interval (Graphpad prism 7, Graphpad software, San Diego, CA, USA), and a *p* value of 0.05 (or less) was considered statistically significant (for at least *n* = 6).

Acknowledgements

The authors thank Nicolas Couvrat from SMS laboratory, University of Rouen for the TGA measurements. They also express their gratitude to Marc-Antoine Perrin, Benoit Robert and Patrick Dorion from Sanofi R&D for their kind and helpful support with a number of characterization experiments.

References

- (1) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* 1985, 318, 162–163. <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- (2) Moussa, F. [60]Fullerene and Derivatives for Biomedical Applications. In *Nanobiomaterials*; 2018; pp 113–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00005-2>.
- (3) Sijbesma, R.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Castoro, J. A.; Wilkins, C.; Friedman, S. H.; DeCamp, D. L.; Kenyon, G. L. Synthesis of a Fullerene Derivative for the Inhibition of HIV Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115 (15), 6510–6512. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>.
- (4) Wilson, L. J.; Cagle, D. W.; Thrash, T. P.; Kennel, S. J.; Mirzadeh, S.; Alford, J. M.; Ehrhardt, G. J. Metallofullerene Drug Design. *Coord. Chem. Rev.* 1999, 190–192 (1999), 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00080-6).
- (5) Arbogast, J. W.; Darmanyan, A. P.; Foote, C. S.; Rubin, Y.; Diederich, F. N.; Anz, S. J.; Alvarez, M. M.; Whetten, R. L. Photophysical Properties of C60. *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 11–12. <https://doi.org/10.1021/j100154a006>.
- (6) Jensen, A. W.; Jensen, A. W.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I.; R, S. Review Article Biological Applications of Fullerenes. *Bioorganic Med. Chem.* 1996, 4 (6), 767–779.
- (7) Hirsch, A. The Chemistry of the Fullerenes. *Chem. Fullerenes* 1994, 1–203. <https://doi.org/10.1002/9783527619214>.
- (8) Krusic, P. J.; Wasserman, E.; Keizer, P. N.; Morton, J. R.; Preston, K. F. Radical Reaction of C60. *Science* 1991, 254 (5035), 1183–1185.
- (9) McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S. C60 as a Radical Sponge. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114 (11), 4412–4414. <https://doi.org/10.1021/ja00037a064>.
- (10) Diederich, F.; Thilgen, C. Covalent Fullerene Chemistry. *Science* 1996, 271 (5247), 317–324.
- (11) Prato, M. Fullerenes and Related Structures. Springer 1999, 199, 173–187.
- (12) Martín, N. New Challenges in Fullerene Chemistry. *Chem. Commun.* 2006, No. 20, 2093–2104. <https://doi.org/10.1039/b601582b>.
- (13) Moussa, F.; Trivin, F.; Céolin, M.; Hadchouel, P. Y.; Sizaret, V.; Greugny, C.; Fabre, C.; Rassat, A.; Szwarc, H. Early Effects of C60 Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C60 Toxicity. *Fuller. Sci. Technol.* 1996, 4 (1), 21–29.

- (14) Gharbi, N.; Pressac, M.; Hadchouel, M.; Szwarc, H.; Wilson, S. R. [60]Fullerene Is an in Vivo Powerful Antioxidant With No Acute or Subacute Toxicity. *Nano Lett.* 2005, 5 (12), 2578–2585. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>.
- (15) Goodarzi, S.; Da Ros, T.; Conde, J.; Sefat, F.; Mozafari, M. Fullerene: Biomedical Engineers Get to Revisit an Old Friend. *Mater. Today* 2017, 20 (8), 460–480. <https://doi.org/10.1016/j.mat-tod.2017.03.017>.
- (16) Baati, T.; Bourasset, F.; Gharbi, N.; Njim, L.; Abderrabba, M.; Kerkeni, A.; Szwarc, H.; Moussa, F. The Prolongation of the Lifespan of Rats by Repeated Oral Administration of [60]Fullerene. *Biomaterials* 2012, 33 (19), 4936–4946. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>.
- (17) Baati, T.; Bourasset, F.; Gharbi, N.; Njim, L.; Abderrabba, M.; Kerkeni, A.; Szwarc, H.; Moussa, F. Corrigendum to “The Prolongation of the Lifespan of Rats by Repeated Oral Administration of [60]Fullerene” [*Biomaterials* 33 (2012) 4936-4946]. *Biomaterials* 2012, 33, 6292–6294. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>.
- (18) Kepley, C. Fullerenes in Medicine; Will It Ever Occur? *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2012, 3 (6). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000e111>.
- (19) Rittner, M. N. Confusion in the Mass Media. *Nanoparticle news* 2004, 5.
- (20) Szwarc, H.; Moussa, F. Toxicity of [60] Fullerene : Confusion in the Scientific Literature. *J. Nanosci. Lett.* 2011, 1 (1), 61–62.
- (21) Kolosnjaj, J.; Szwarc, H.; Moussa, F. Toxicity Studies of Fullerenes and Derivatives. In *Bio-application of Nanoparticles*; 2007; pp 1–13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76713-0_13.
- (22) 10/09/2018. <https://www.google.com/search?q=C60-oliv+oil&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>.
- (23) Gerasimov, V. I.; Matuzenko, M. Y.; Proskurina, O. V. Purity Analysis of Trade Production C60 Fullerene. *Mater. Phys. Mech.* 2012, 13, 181–185.
- (24) Mukhopadhyay, K.; Dwivedi, C. D.; Mathur, G. N. Quality Assessment of Fullerene Samples Using Thermal Technique. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2001, 64, 765–771. <https://doi.org/10.1023/A:1011556714473>.
- (25) Sunagawa, I. Growth and Morphology of Crystals. *Forma* 1999, 14 (358), 147–166. <https://doi.org/10.1088/0031-8949/2006/T126/028>.
- (26) Yosida, Y. Morphology of C60 Single Crystals. *Jpn. J. Appl. Phys.* 1992, 31 (6B), L807.

- (27) Li, J.; Mitsuki, T.; Ozawa, M.; Horiuchi, H.; Kishio, K.; Kitazawa, K.; Kikuchi, K.; Achiba, Y. Growth and Morphology of C60 and C70 Single Crystals. *J. Cryst. Growth* 1994, 143, 58–65. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(94\)90367-0](https://doi.org/10.1016/0022-0248(94)90367-0).
- (28) Arbogast, J. W.; Foote, C. S. Photophysical Properties of C70. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 8886–8889. <https://doi.org/10.1021/ja00023a041>.
- (29) Heiney, P. A.; Fischer, J. E.; McGhie, A. R.; Romanow, W. J.; Denenstein, A. M.; McCauley Jr., J. P.; Smith, A. B.; Cox, D. E. Orientational Ordering Transition in Solid C60. *Phys. Rev. Lett.* 1991, 66 (22), 2911–2914. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.66.2911>.
- (30) Bensch, W.; Werner, H.; Barti, H.; Schlogl, R. Single-Crystal Structure of C60 at 300 K Evidence for the Presence of Oxygen in a Statically Disordered Model. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 1994, 90 (18), 2791–2797.
- (31) Vaughan, G. B. M.; Chabre, Y.; Dubois, D. Effect of Stacking Disorder on the Orientational Ordering Transition of Solid C60. *Europhys. Lett.* 1995, 31 (9), 525.
- (32) Rodríguez-Carvajal, J. Recent Advances in Magnetic Structure Determination by Neutron Powder Diffraction. *Phys. B* 1993, 192, 55–69. [https://doi.org/10.1016/0921-4526\(93\)90108-I](https://doi.org/10.1016/0921-4526(93)90108-I).
- (33) Cheng, A.; Klein, M. L. C60O: A Molecular Dynamics Study of Rotation in the Solid Phase Solid Phase. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992, 88 (14), 1949–1951. <https://doi.org/10.1039/ft9928801949>.
- (34) A. Dworkin, H. Szwarc, S. Leach, J.P. Hare, T.J. Dennis, H.W. Kroto, R. Taylor, D. R. M. W. Thermodynamic Evidence for a Phase Transition in Crystalline Fullerene C60. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. Paris* 1991, 312 (2), 979–982.
- (35) J. De Bruijn, A. Dworkin, H. Szwarc, J. Godard, R. Céolin, C. Fabre, A. R. Thermodynamic Properties of a Single Crystal of Fullerene C60: A DSC Study. *Europhys. Lett.* 1993, 24 (7), 551–556.
- (36) A.M. Rao, P. Zhou, K-A. Wang, G.T. Hager, J.M. Holden, Y. Wang, W.T. Lee, X-X. Bi, P.C. Eklund, D.S. Cornett, M.A. Duncan, I. J. A. Photoinduced Polymerization of Solid C60 Films. *Science* 1993, 259, 955–957.
- (37) Fulde, M.; Klitzing, P. von; Cardona, K. *Electronic Properties of Fullerenes*; Springer Berlin Heidelberg, 1993.
- (38) Hebard, A. F.; Haddon, R. C.; Fleming, R. M.; Kortan, A. R. Deposition and Characterization of Fullerene Films. *Appl. Phys. Lett* 1991, 59 (17), 2109.
- (39) Wilmschurst, J. K.; Bernsein, H. J. The Infrared and Raman Spectra of Toluene, Toluene-a-d, m-Xylene and m-Xylene-Aa-D. *Can. J. Chem.* 1957, 35, 911–925.

- (40) Silva, F. A. B.; Chagas-Silva, F. A.; Florenzano, F. H.; Pissetti, F. L. Poly(Dimethylsiloxane) and Poly[Vinyltrimethoxysilane-Co-2-(Dimethylamino) Ethyl Methacrylate] Based Cross-Linked Organic-Inorganic Hybrid Adsorbent for Copper(II) Removal from Aqueous Solutions. *J. Braz. Chem. Soc.* 2016, 27 (12), 2181–2191. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160110>.
- (41) Leach, S.; Vervloet, M.; Desprès, A.; Bréheret, E.; Hare, J. P.; John Dennis, T.; Kroto, H. W.; Taylor, R.; Walton, D. R. M. Electronic Spectra and Transitions of the Fullerene C₆₀. *Chem. Phys.* 1992, 160, 451–466. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(92\)80012-K](https://doi.org/10.1016/0301-0104(92)80012-K).
- (42) Törpe, A.; Elton, D. J. B. Improved Spectrophotometric Analysis of Fullerenes C₆₀ and C₇₀ in High-Solubility Organic Solvents. *Anal. Sci.* 2015, 31 (February), 125–130.
- (43) Creegan, K. M.; Robbins, J. L.; Robbins, W. K.; Millar, J. M.; Sherwood, R. D.; Tindall, P. J.; Cox, D. M. Synthesis and Characterization of C₆₀O, the First Fullerene Epoxide. *Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 1103–1105.
- (44) Hare, J. P.; Kroto, H. W.; Taylor, R. Preparation and UV/Visible Spectra of Fullerenes C₆₀ and C₇₀. *Chem. Phys. Lett.* 1991, 177 (4–5), 394–398. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(91\)85072-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(91)85072-5).
- (45) Bensasson, R. V.; Bienvenue, E.; Dellinger, M.; Leach, S.; Seta, P. C₆₀ in Model Biological Systems. A Visible-UV Absorption Study of Solvent-Dependent Parameters and Solute Aggregation. *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 3492–3500. <https://doi.org/10.1021/j100064a035>.
- (46) Moussa, F.; Pressac, M.; Genin, E.; Roux, S.; Trivin, F.; Rassat, A.; Céolin, R.; Szwarc, H. Quantitative Analysis of C₆₀ Fullerene in Blood and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode-Array and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* 1997, 696, 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00228-4).
- (47) Moldoveanu, S. C.; David, V. Solvents, Buffers, and Additives Used in the Mobile Phase. In *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*; 2017; pp 393–450. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00013-5>.

Chapitre III

Étude de l'effet du C₆₀ sur l'activité mitochondriale chez la souris (Étude *in vivo*)

Introduction

Le fullerène n'est actif que sous forme soluble. Sa solubilité est faible et lente dans les milieux aqueux et biologiques, le phénomène empêche le contrôle de sa fraction active avec précision (153), le C₆₀ a été dissout dans l'huile d'olive afin de déterminer sa bio-distribution et son élimination *in vivo* (27,160). La pharmacocinétique du C₆₀ dissous dans l'huile d'olive (0,8 mg/ml) a été caractérisée après administration orale (o.g.) et intrapéritonéale (i.p.) chez le rat (4 mg/kg). Dans cette étude, le volume de distribution apparent de C₆₀ après l'administration i.p. a été rapporté plus élevée que le volume sanguin chez le rat (161), ce qui indique que le C₆₀ a été bien distribué dans les tissus. La valeur de distribution apparente après o.g. a été moins importante.

Au jour 1 après administration, les teneurs en C₆₀ dans le foie et la rate ont représenté respectivement 0,14% et 0,18% de la dose administrée par voie orale et 4,73% et 1,55% par voie i.p., respectivement. Après 7 jours, les teneurs en C₆₀ dans le foie et la rate ont représenté respectivement 0,39% et 0,51% de la dose totale administrée par voie orale et à 5,54% et 2,39% par voie i.p. respectivement. Tandis qu'au jour 1 et 7 de son administration, la teneur en C₆₀ dans le cerveau a représenté moins de 0,01% de la dose administrée après o.g. alors que ces valeurs ont été supérieures à 0,12% après administration intrapéritonéale. Selon cette étude la teneur maximum du C₆₀ a été observée par administration intrapéritonéal et dans la rate, le foie, le cerveau et le sang, respectivement. L'effet du C₆₀ sur l'activité de l'enzyme alanine aminotransférase (ALT), en tant que marqueur biochimique des lésions hépatiques(162), a été étudié et a confirmé la protection du foie des rats par C₆₀ contre la toxicité de CCl₄. En outre, il a déjà été montré que C₆₀ réagit à l'intérieur des cellules du foie avec la vitamine A après une réaction de type Diels-Alder chez la souris et chez le rat (153,163). Les résultats de cette étude ont confirmé l'effet antioxydant du C₆₀ et même son effet modulateur sur l'état redox intracellulaire même en l'absence de CCl₄ (153).

La lésion hépatique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est un modèle très classique largement utilisé pour le dépistage de médicaments hépato-protecteurs (164,165). L'hépatotoxicité aiguë du CCl_4 réside dans sa biotransformation en radicaux libres trichlorométhyle ($\text{CCl}_3^\bullet$) ou trichloroperoxyde (CCl_3O_2) produits par le système de cytochrome P450 oxygénase du réticulum endoplasmique, qui provoque un stress oxydatif et des dommages à la membrane (166). Ces radicaux libres provoquent une peroxydation lipidique qui entraîne des lésions hépatocellulaires et favorise la formation de tissus enflammés qui conduit à la suite d'une réponse inflammatoire déclenchée par des cellules inflammatoires résidentes et une lésion hépatique aiguë induite par le CCl_4 (167,168).

C_{60} et certains de ses dérivés s'accumulent principalement dans le foie et la rate des rongeurs (27,153,160,163,169), et les teneurs en C_{60} dans les poumons et les reins sont probablement plus faibles que dans les foies et les rates (170,171). Celle-ci a été confirmée par la protection du foie de rat contre la toxicité induite par CCl_4 (27,160). Nous nous sommes donc concentrés uniquement sur ces deux organes au cours de ce travail pour étudier l'effet du C_{60} sur les enzymes des cellules du foie pour trouver le mécanisme possible de la protection du foie par C_{60} et voir les cellules de la rate au microscope électronique après l'accumulation importante du C_{60} dans cet organe.

Le stress oxydatif

La production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) est une conséquence du métabolisme aérobie. Les ROS comprennent les radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($^{\bullet}\text{OH}$), ainsi que des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), etc. Pour être protégé contre la toxicité de l'oxygène, notre organisme a développé des défenses antioxydantes comprenant des enzymes (par exemple la glutathion

peroxydase), des protéines (par exemple la ferritine), des vitamines (A, C, E) et des oligo-éléments (sélénium). A l'état physiologique, tous ces antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production de ROS. Un stress oxydatif sera défini en cas de déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des formateurs. Chaque individu n'a pas le même potentiel antioxydant en raison des différences dans le mode de vie (par exemple, le tabagisme), le régime alimentaire, la morphologie génétique et les conditions de vie environnementales (172).

Les ROS sont formés à partir des activités de transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale suite à une fuite inévitable d'électrons sur l'O₂ pour former H₂O, ou encore en tant que sous-produit de diverses voies métaboliques localisées dans différents compartiments cellulaires. Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est pas parfait, car 2 à 3% de l'oxygène est transformé en espèces réactives de l'oxygène, ce qui augmente la génération de ROS (173). Tous les ROS à fortes concentrations sont extrêmement nocifs pour les organismes. Lorsque le niveau de ROS dépasse les mécanismes de défense, une cellule est dite en état de «stress oxydatif». La production accrue de ROS lors de stress environnementaux peut constituer une menace pour les cellules en provoquant la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, des dégâts aux acides nucléiques, l'inhibition de l'enzyme, l'activation de la voie de l'apoptose et finalement la mort des cellules. Le piégeage ou la détoxification des ROS en excès est obtenu grâce à un système antioxydant efficace comprenant des antioxydants non-enzymatiques et enzymatiques. Divers travaux ont signalé des activités accrues de nombreuses enzymes du système de défense antioxydant dans les cellules afin de lutter contre le stress oxydatif. En réalité, la détermination du statut de stress oxydatif est de plus en plus importante en tant qu'outil permettant de prévenir certaines maladies. Ceci est suggéré par de nombreuses études *in vivo* montrant que les personnes ayant de faibles concentrations plasmatiques en antioxydants (vitamines A, C et E) ou des taux élevés en marqueurs oxydants des lipides courent

un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer que les personnes ayant un régime alimentaire équilibré (172).

Le paradoxe de la vie aérobie, ou «paradoxe de l'oxygène», est que les organismes aérobies eucaryotes supérieurs ne peuvent exister sans oxygène, or l'oxygène est intrinsèquement dangereux pour leur existence. La réduction tétravalente concertée de l'oxygène par la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie pour produire de l'eau est considérée comme un processus relativement sûr; cependant, la réduction univalente d'oxygène génère des intermédiaires réactifs. L'environnement réducteur du milieu cellulaire offre de nombreuses possibilités à l'oxygène de subir une réduction univalente non programmée. Ainsi, le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle extrêmement réactif sont des produits courants de la vie en milieu aérobie, et ces agents semblent être responsables de la toxicité de l'oxygène. Pour survivre dans un environnement aussi hostile à l'oxygène, les organismes vivants génèrent - ou recueillent auprès de leur environnement - une variété de composés antioxydants solubles dans l'eau et dans les lipides. De plus, une série d'enzymes antioxydants, dont le rôle est d'intercepter et d'inactiver les intermédiaires réactifs de l'oxygène, est synthétisée par tous les organismes aérobies connus. Bien qu'ils soient extrêmement importants, les enzymes et composés antioxydants ne sont pas totalement efficaces pour prévenir les dommages oxydatifs. Pour faire face aux dégâts qui se produisent encore, une série d'enzymes d'élimination/réparation des dégâts, pour les protéines, les lipides et l'ADN, est synthétisée. Enfin, étant donné que les niveaux de stress oxydant peuvent varier de temps en temps, les organismes sont capables de s'adapter à ces stress fluctuants en induisant la synthèse d'enzymes antioxydants et d'enzymes d'élimination/réparation des dégâts. Dans un monde parfait, l'histoire se terminerait ici. Malheureusement, la biologie est rarement aussi précise. La réalité semble être que, malgré les vaillants mécanismes d'antioxydant et de réparation décrits ci-dessus, les dommages oxydatifs restent un résultat inévitable de l'existence aérobie (174).

Le stress oxydatif et les dommages oxydatifs associés sont des médiateurs des lésions cellulaires dans de nombreuses pathologies, de maladies et de syndromes dégénératifs, notamment les suivants: mutagenèse, transformation cellulaire et cancer; l'athérosclérose, l'artériosclérose, les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux et les lésions d'ischémie/re-perfusion; les maladies inflammatoires chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux et le rhumatisme psoriasique; problèmes inflammatoires aigus, tels que la cicatrisation des plaies; des stress photo-oxydants pour les yeux, tels que la cataracte; des troubles du système nerveux central, tels que certaines formes de sclérose latérale amyotrophique familiale, certaines crises convulsives liées à la glutathion peroxydase, la maladie de Parkinson et la démence d'Alzheimer; et une grande variété de troubles liés à l'âge, y compris peut-être même des facteurs sous-jacents au processus de vieillissement lui-même. Certaines de ces maladies ou troubles liés à l'oxydation peuvent être exacerbés, voire initiés, par de nombreux pro-oxydants environnementaux et/ou médicaments et aliments pro-oxydants. Les effets exceptionnellement nocifs du stress oxydatif sur les neurones résultent principalement de la diminution de la capacité du système nerveux central à prévenir les dommages oxydatifs. Les mitochondries semblent être à la fois la source principale et la cible des ROS intracellulaires (175). Un excès de ROS pourrait provoquer une dépolarisation mitochondriale associée à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et à la libération ultérieure de petites molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, entraînant l'activation de cascades et l'apoptose. À son tour, l'effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale déclenche une augmentation de la génération de ROS par la chaîne de transfert d'électrons, fournissant ainsi un mécanisme de rétroaction positive pour une production accrue de ROS conduisant à de nouvelles lésions mitochondriales et cellulaires. Les thérapies ciblées contre les ROS sont très prometteuses pour minimiser les lésions cellulaires dues au stress oxydatif et autres troubles dépendant de ROS. En raison de leur capacité à s'associer aux mitochondries et à atténuer les

ROS plus efficacement que les antioxydants classiques, un grand intérêt porte sur la valeur protectrice d'une grande variété de composés antioxydants, en particulier les dérivés hydrosoluble de fullerènes et le C₆₀ vierge, qui peuvent renforcer de manière significative la résistance biologique aux oxydants (8–14,175,176).

Mitochondrie

Les mitochondries ont suscité l'intérêt des biochimistes depuis plus de 50 ans. Ils ont été étudiés de manière intensive au cours des dernières décennies, notamment parce qu'ils sont abondants et peuvent être facilement isolés de différents tissus. Aujourd'hui les méthodes de l'analyse de la chaîne respiratoire mitochondriale sont appliquées au diagnostic des pathologies mitochondriales. Les mitochondries ont un diamètre d'environ 0,5 à 1 µm et une longueur pouvant atteindre 7 µm. Leur forme et leur nombre par cellule dépendent du tissu. Ils peuvent apparaître comme des sphères, des bâtonnets ou des corps filamenteux, mais l'architecture générale est la même. Le nombre de mitochondries par cellule varie en fonction des besoins en énergie : les tissus ayant une capacité élevée à effectuer des fonctions métaboliques aérobies telles que les muscles squelettiques ou les reins auront un plus grand nombre de mitochondries. Les mitochondries ont deux membranes composées chacune d'une double couches phospholipidiques (*Figure 1*). Les deux membranes ont une apparence et des propriétés physico-chimiques très distinctes, déterminant ainsi la fonction biochimique de chaque membrane. La membrane interne entoure et convole dans la matrice mitochondriale, formant des crêtes. Cela sert à augmenter la surface de la membrane interne, qui porte la principale machine enzymatique de la phosphorylation oxydative (177–180).

La membrane externe est largement perméable aux ions et aux grosses molécules. La membrane mitochondriale interne est beaucoup moins perméable aux ions et aux petites molécules que la membrane externe, fournissant ainsi une compartimentation par séparation de la

matrice de l'environnement cytosolique. Cette compartimentation est une caractéristique centrale de la conversion de l'énergie libre dérivée des substrats oxydables.

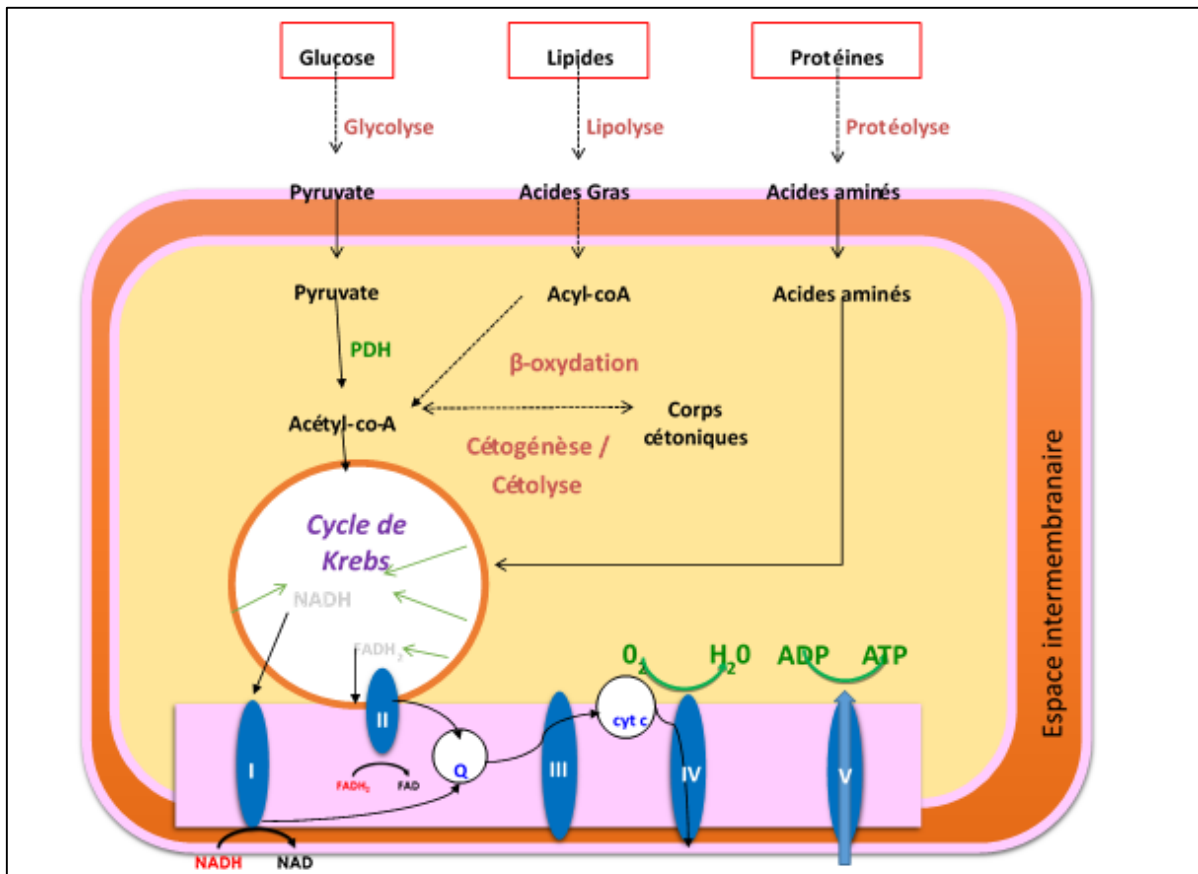


Figure 1. Mitochondrie. Le pyruvate par la glycolyse se transforme en acétyl-coA par PDHc. L'acétyl-coA entre dans le cycle Krebs (acide tricarboxylique : TCA). Les équivalents réduits NADH et FADH₂ produits par TCA entrent dans la chaîne respiratoire. Les complexes de la chaîne respiratoire (complexes I, II, III et IV) réduisent l'O₂ en créant un gradient de protons. Le complexe V se sert du gradient de proton pour produire de l'ATP. (178)

La membrane mitochondriale interne est en fait un isolant électrique et une barrière chimique. Des transporteurs d'ions sophistiqués existent pour permettre à des molécules spécifiques de traverser cette barrière. Il y a plusieurs systèmes d'antiport intégrés dans la membrane interne, permettant l'échange d'anions entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Des exemples sont un échangeur phosphate-OH₂, l'adénine nucléotide translocase (qui échange spécifiquement l'adénosine diphosphate (ADP) pour l'adénosine triphosphate (ATP), les mono-, di- et tricarboxylates et la navette aspartate-glutamate.

Chapitre III

La matrice mitochondriale contient une gamme d'enzymes, qui font partie des principales voies métaboliques telles que l'oxydation des glucides, des lipides et des acides aminés ([Figure 1](#)). La machinerie enzymatique de la phosphorylation oxydative, conduisant à la production d'ATP, se situe principalement dans la membrane mitochondriale interne.

En raison de sa composition, la membrane mitochondriale interne est imperméable à la plupart des solutés et des ions. L'échange de certains métabolites et ions entre la matrice et le cytosol est facilité par un certain nombre de systèmes de transport. Les métabolites transportés à travers la membrane mitochondriale interne sont principalement sous forme anionique. La gamme des transporteurs d'anions dans la membrane mitochondriale interne dépend du tissu et de sa fonction particulière ([177–180](#)).

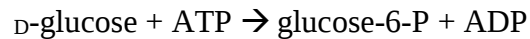
Le transport des cations monovalents est étroitement contrôlé. Le potentiel de la membrane mitochondriale entraînerait une accumulation d'ions tels que K^+ si ceux-ci pouvaient s'infiltrer accidentellement dans la matrice, elle entraînerait un gonflement des mitochondries (en raison de l'absorption d'eau concomitante). Pour éviter cela, les mitochondries utilisent un transporteur qui échange K^+ ou Na^+ de la matrice pour H^+ , en maintenant une concentration de ces ions beaucoup plus faible que dans le cytosol ([177–180](#)).

La membrane interne mitochondriale contient un certain nombre de navettes de transport de substrat. Ces navettes servent à transporter des équivalents réducteurs à travers la membrane mitochondriale interne, car aucun des nucléotides impliqués dans les réactions redox cellulaires ($NAD(P)^+$, $NAD(P)H$, FAD^+ , $FADH_2$, Coenzyme A) ne peut traverser librement la membrane mitochondriale interne. La majeure partie du NADH dérivé de l'oxydation du glucose se forme dans la matrice, mais le NADH produit dans la glycolyse est cytosolique. Des navettes de transport de substrats existent notamment la navette malate – aspartate. Ces navettes ont en commun le fait qu'elles impliquent un transfert réciproque d'espèces oxydées et réduites

Chapitre III

de divers couples d'oxydoréduction, réalisant ainsi le transfert d'équivalents réducteurs à travers la membrane (177–180).

Le glucose traverse les membranes plasmiques grâce à des protéines transporteuses. Une fois entrée dans la cellule le glucose se transforme en glucose-6-phosphate à l'aide de l'enzyme hexokinase et une molécule d'ATP :



Le glucose phosphate se transforme en pyruvate, celui-ci pourra traverser la membrane de la mitochondrie pour être consommée dans le cycle de Krebs. Dans le cas de déficit en oxygène le pyruvate ne rentre pas dans la mitochondrie pour conduire à la fermentation lactique et la fermentation alcoolique dans le cytoplasme de la cellule (179).

La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire ou chaîne de transport des électrons est une série de protéines et de molécules organiques présentes dans la membrane interne des mitochondries (*Figure 3*). Les électrons sont transmis d'un membre de la chaîne de transport à un autre dans une série de réactions redox. L'énergie libérée dans ces réactions est capturée sous la forme d'un gradient de protons, qui est ensuite utilisé pour produire de l'ATP. Le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire génère l'ATP par le processus de phosphorylation oxydative.

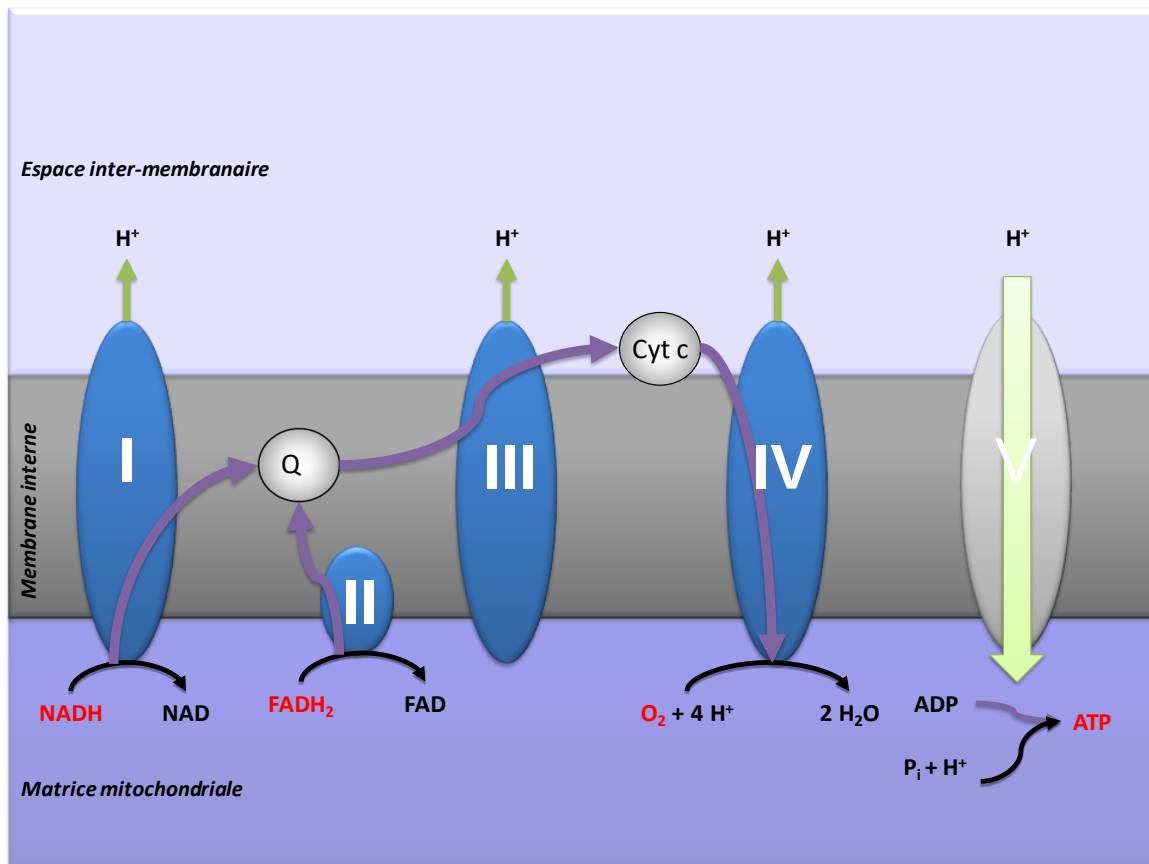


Figure 2. Chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire est une série de protéines et de molécules organiques située dans la membrane interne de la mitochondrie. Les complexes transmettent les électrons dans une série de réactions redox. Ce transfert est accompagné par un gradient de proton dans l'espace inter-membranaire. Ces réactions conduisent à la production de l'ATP. (180)

Les électrons nécessaires à la chaîne respiratoire pour produire de l'énergie proviennent des porteurs d'électrons qui sont les coenzymes réduits (NADH et FADH₂). Ils sont produits dans d'autres étapes réactionnelles et transfèrent leurs électrons vers des molécules au début de la chaîne de transport (Figure 4). Dans ce processus, ils se transforment en NAD⁺ et FAD, qui peuvent être réutilisés dans d'autres étapes métaboliques. Au fur et à mesure que les électrons passent dans la chaîne, ils passent d'un niveau d'énergie plus élevé à un niveau d'énergie inférieur, libérant ainsi de l'énergie. Une partie de l'énergie est utilisée pour pomper des ions H⁺, les déplaçant hors de la matrice et dans l'espace inter-membranaire. Ce pompage établit un

gradient électrochimique. À la fin de la chaîne de transport d'électrons, les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire, qui se divise en deux et prend H^+ pour former de l'eau. Lorsque les ions H^+ reviennent dans la matrice, ils traversent une enzyme appelée ATP synthase ou complexe V, qui exploite le flux de protons pour synthétiser l'ATP (178–180).

Le complexe I (ou NADH – coenzyme Q-réductase) transfère les électrons du NADH au Coenzyme Q ([Figure 5](#)). Plusieurs groupes fer-soufre sont impliqués dans le processus de transport des électrons. Les deux coenzymes du complexe I, le flavon mononucléotide (FMN) et le Coenzyme Q sont capables d'accueillir jusqu'à deux électrons chacun dans des conformations stables et de donner un ou deux électrons aux cytochromes du complexe III. On pense que quatre protons sont pompés par paire d'électrons.

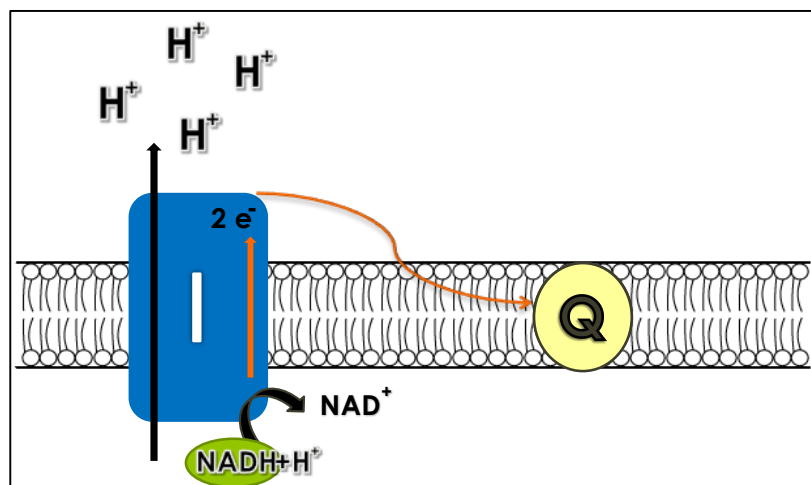


Figure 3. Cx I: NADH coenzyme Q réductase (NADH-ubiquinone réductase, NADH-déshydrogénase) [REF ?](#)

Le complexe II (succinate – coenzyme Q-réductase) contient la succinate déshydrogénase et trois petites sous-unités hydrophobes ([Figure 6](#)). Il est ancré dans la membrane, face à la matrice mitochondriale. Il permet le passage des électrons du succinate, un intermédiaire du

Chapitre III

cycle de l'acide citrique, vers le Coenzyme-Q en utilisant le FADH₂ comme coenzyme. Il n'a pas d'activité de pompage de protons.

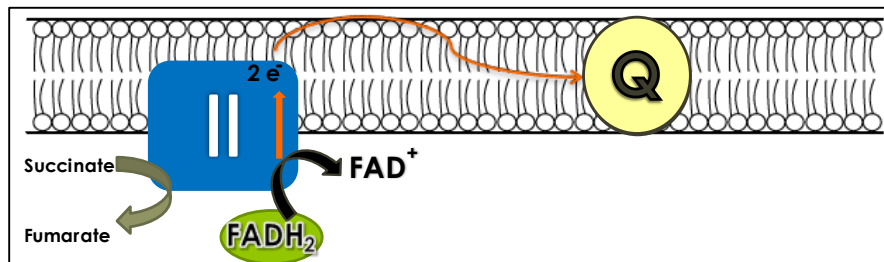


Figure 4. Cx II: Succinate coenzyme Q réductase (Succinate-ubiquinone réductase)
[REF](#)

Le complexe III (coenzyme Q–cytochrome c réductase) transfère les électrons du Coenzyme Q réduit au cytochrome C (**Figure 7**). Il contient deux cytochromes, un cytochrome C1 et un groupe fer-soufre. Deux protons sont pompés par paire d'électrons.

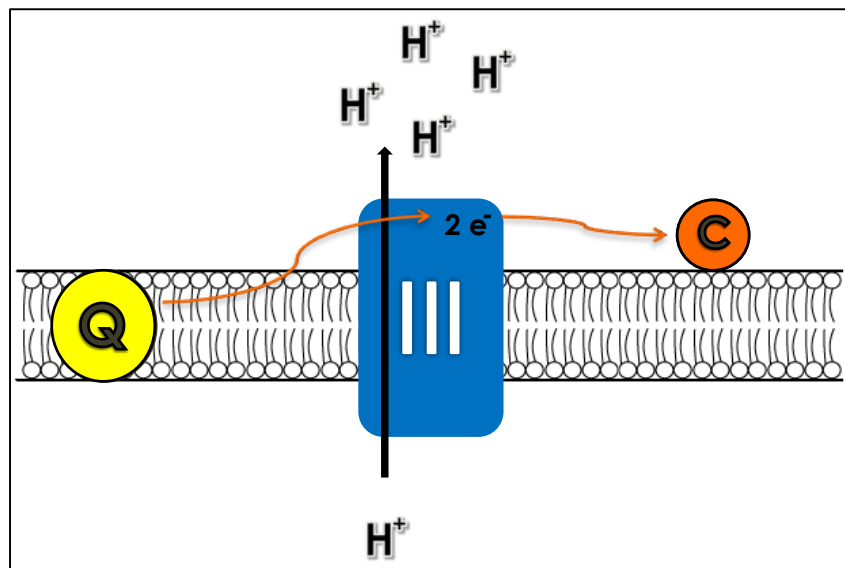


Figure 5. Cx III: Coenzyme Q cytochrome C réductase (Ubiquinol-cytochrome C réductase) [REF](#)

Dans le complexe III, le cycle Q facilite le transport des électrons et la translocation des protons. Ici, CoQ est réduit en deux étapes. Ubisemiquinone, portant un électron, est réduit par

le complexe I et accepte un proton de la matrice. QH₂ diffuse ensuite vers l'espace intermembranaire, où deux protons sont ensuite libérés dans l'espace intermembranaire. Un électron est recyclé pour faciliter l'absorption des protons, formant ainsi de l'bisémiquinone du côté de la matrice de la membrane, tandis qu'un autre électron passe sur le cytochrome C₁.

Le complexe IV (cytochrome c oxydase) catalyse la dernière étape du transfert d'électrons: la réduction de l'oxygène en eau ([Figure 8](#)). Le complexe IV transfère quatre protons par paire d'électrons. La translocation des protons est un processus endergonique (c'est-à-dire qu'elle nécessite de l'énergie extérieur) car elle se produit contre un gradient électrochimique. Le mécanisme précis de translocation des protons fait encore l'objet de recherches. Dans ce qui a été appelé le mécanisme de pompe à protons, le transfert d'électrons entraîne des modifications conformationnelles des complexes impliqués.

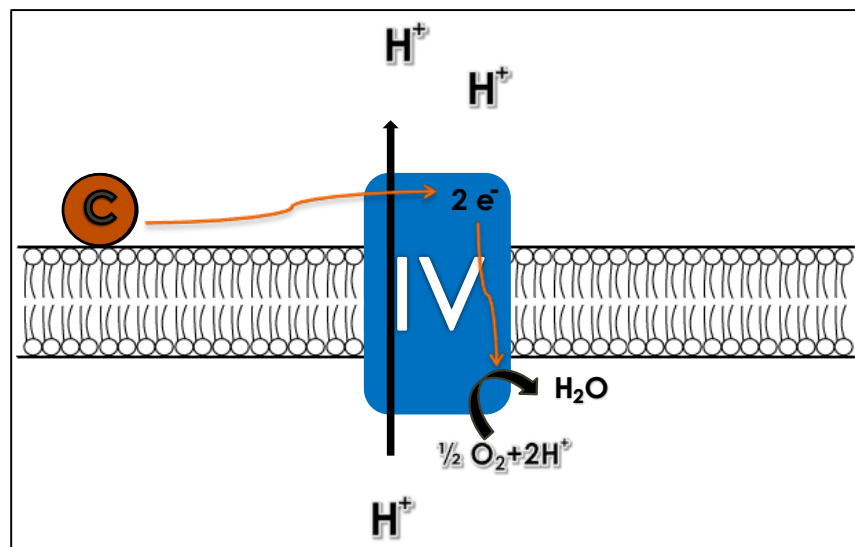


Figure 6. Cx IV: Cytochrome C oxydase [REF](#)

Le gradient électrochimique (Δp , aussi appelé « force motrice du proton » résulte des activités de transposition des complexes I, III et IV. Les mitochondries isolées à partir des hépatocytes ont généralement un potentiel de membrane d'environ 170 mV.

Chapitre III

L'ATP synthase, ou F1F0-ATPase, utilise la force motrice du proton, Δp , pour convertir l'ADP et le phosphate en ATP, couplant ainsi le transport des électrons et le pompage des protons à la synthèse de l'ATP (*Figure 9*). Ce complexe protéique transmembranaire, possède la structure la plus complexe de la membrane mitochondriale interne, a attiré une attention expérimentale considérable ces dernières années.

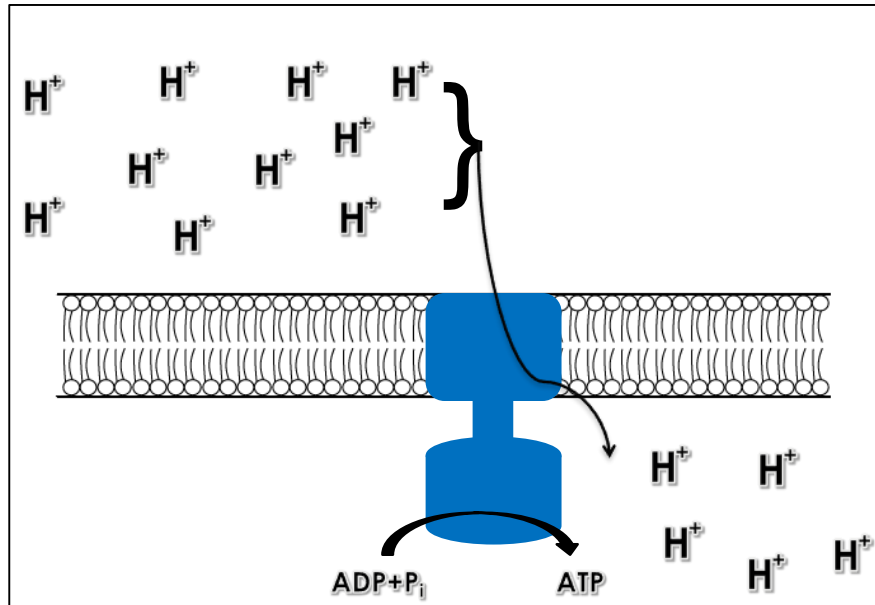


Figure 7. Cx V: ATP synthtase

La phosphorylation oxydative repose donc sur une série de complexes respiratoires (appelés chaîne de transport des électrons) qui sont intégrés dans la membrane mitochondriale interne. Les électrons « arrivent » à la chaîne de transport d'électrons sous la forme de NADH and FADH₂. Les complexes de transport d'électrons transmettent des électrons provenant de ces « équivalents réducteurs », NADH et FADH₂, via des centres d'oxydoréduction liés aux protéines à un accepteur final, l'oxygène, formant ainsi de l'eau.

L'énergie libre du transport d'électrons est conservée par le gradient de protons, qui est constitué par les complexes enzymatiques de la chaîne de transport d'électrons. Ces complexes

pompent des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire et créent un gradient électrochimique à travers la membrane interne. Ce gradient permet alors à l'ATPase de synthétiser l'ATP.

Cycle Krebs

Le cycle de l'acide citrique (également appelé cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs) réalise l'oxydation complète de l'acétyl-CoA, un intermédiaire central produit par diverses voies cataboliques telles que la glycolyse et l'oxydation des acides gras ([Figure 10](#)). Les enzymes de ce cycle sont principalement situées dans la matrice mitochondriale, à l'exception de la succinate déshydrogénase, qui est liée à la membrane interne et fait partie du complexe II de la chaîne de transport des électrons.

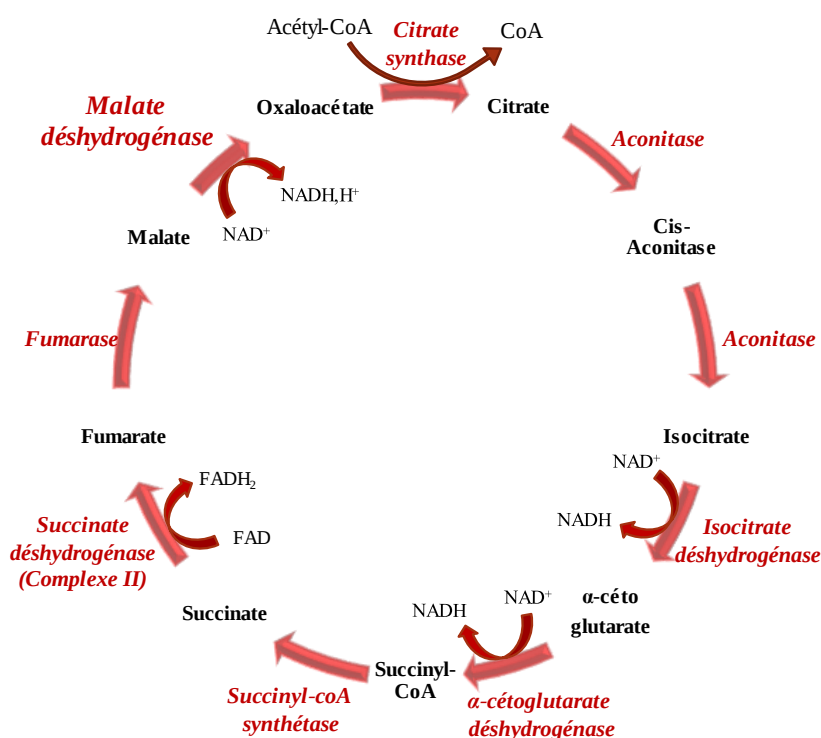


Figure 8. Cycle Krebs. Le cycle de Krebs est constitué de plusieurs enzymes qui sont situées principalement dans la matrice mitochondriale sauf dans le cas de succinate déshydrogénase (Complexe II). L'oxydation de l'acétyl-CoA se réalise au sein du cycle Krebs en produisant de dioxyde de carbone. Le cycle de Krebs conserve l'énergie produite au cours de cette oxydation sous forme de NADH et FADH₂. [REF](#)

La proximité physique du cycle de l'acide citrique et des réactions de phosphorylation oxydative dans la matrice mitochondriale ont un sens : la fonction principale du cycle de l'acide citrique est d'oxyder le composant acétyl de l'acétyl-CoA en deux molécules de dioxyde de carbone et de conserver simultanément l'énergie libérée sous forme de NADH (forme réduite de nicotinamide – adénine dinucléotide) et de FADH₂ (forme réduite de flavine – adénine dinucléotide). La plupart des besoins de la cellule en matière de vecteur d'énergie cellulaire, l'ATP (adénosine 5'-triphosphate), sont alors satisfaits par la phosphorylation oxydative mitochondriale, pour laquelle NADH et FADH₂ sont les « substrats ».

Matériels et Méthodes

Expérimentation animale

3 groupes de 6 souris Swiss (M, 20 g) ont été choisis (G1, G2, G3). Après acclimatation les souris ont été injectées par voie intra-péritonéal (ip):

- G1 : 1 ml de NaCl à 0.9%
- G2 : 1 ml d'huile d'olive
- G3 : 1 ml de C₆₀-huile d'olive (0,8 mg/mL (27,28))

Après 7 jours de l'injection, les souris ont été anesthésiées par 100 µL de pentobarbital par la voie intra-péritonéale (i.p.). Ensuite, le foie, la rate et le sang ont été prélevés ([Figure 11](#)).

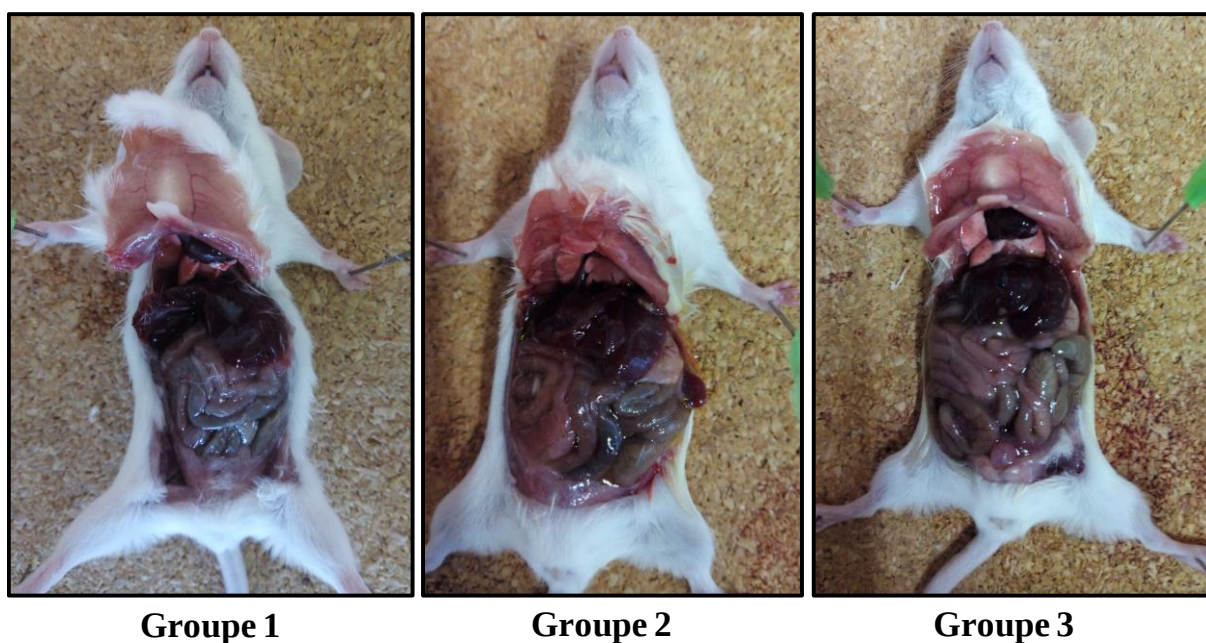


Figure 9. Les 3 groupes de souris

Les prélèvements sanguins, faits par ponction cardiaque ont été conservés dans des tubes héparines. Ils ont été centrifugés et les plasmas et les culots globulaires ont été aliquotés. Les tubes sont conservés à -80°C. Le foie et la rate sont découpés en fines tranches de

quelques millimètre d'épaisseur et sont immergés dans le liquide de fixation pour la microscopie optique et électronique. Le reste du foie est mis dans un sachet étiqueté et plongé dans de l'azote liquide pour l'analyse des différents complexes de la chaîne respiratoire.

Enzymologie de la chaîne respiratoire

0,200 g du tissu hépatique a été homogénéisé dans 1 mL de tampon PBS (pH=7,2) avec le disperseur (ULTRA TURRAX® IKA, BRUMATH, Dutscher, Brumath, France), aliquoté et congelé à -80°C. Avant chaque dosage l'homogénat concentré a été dilué 10 fois dans le tampon PBS, ensuite a été utilisé pour l'analyse enzymatique de la chaîne respiratoire. Tous les dosages ont été faits à 37°C au moyen d'un spectrophotomètre Agilent Carry50 Bio. L'ensemble des dosages sont effectués en cinétique enzymatique et exprimé en nmole de substrats consommé par minute et par mg de protéines de l'homogénat.

Concentration de protéines

La concentration des protéines de la suspension de mitochondries (1/20 pour le foie) est mesurée par la méthode de Bradford. Ce calcul permet d'ajuster la concentration protéique à 2 mg/mL et de vérifier la concentration des billes au 1/40 (qui est proche de 1 mg/mL).

➤ Complexes I et V

800 µL H₂O distillé préchauffé à 37°C est mis dans une cuve de 1 mL. Ensuite 2 µL de l'homogénat de foie, 200 µL du tampon Tris (pH=8), 4 µL KCN 80 mM et 5 µL de NADH₂ 40 mM sont rajouté dans la cuve. Après quelques minutes la mesure d'absorbance à 340 nm est commencé. Ensuite 2 µL de décylubiquinone 20 mM est rajouté dans la cuve. 2 µL de Rotenone

2 mM a été rajouté pour inhiber le complexe I. L'oxydation du NADH due à l'activité cytochrome b oxydo-reductase, est insensible à la roténone et l'activité spécifique du complexe I est donc la partie sensible à la roténone de l'activité NADH oxydase totale.

➤ **Complexe II (succinate ubiquinone oxido-réductase)**

La mesure de l'activité de cette enzyme est basée en suivant la réduction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé. Pour réaliser cette mesure 1 mL du tampon phosphate à pH =7,8 est mise dans une cuve et la cuve est mise dans l'appareil (pour faire le zéro) pour rajouter les réactifs ultérieurement ce qui nous permet de mesurer l'absorbance au cours de la réaction. Après, 2 µL de l'homogénat de foie, 2 µL de roténone 2 mM, 4 µL d'ATP 50 mM, 10 µL succinate 500 mM, 1 µL d'antimycine 2 mM, 4 µL KCN 80 mM et 4 µL DCPIP 20 mM (couleur bleu foncé) ont été rajouté dans la cuve. Après quelques minute d'attente, pour avoir une ligne de base stable, la lecture de l'absorbance à 600 nm est démarrée. La réaction est déclenchée après l'ajout de 4 µL de décyubiquinone 20 mM la réaction est stoppé par ajout de 5 µl de Malonate, inhibiteur spécifique du complexe II. L'absorbance spécifique obtenu est utilisé pour calculer l'activité de l'enzyme.

➤ **Complexe III**

L'activité du complexe III de la chaîne respiratoire est mesurée à partir de l'oxydation de l'ubiquinone réduit ou coenzyme QH en transférant les électrons au cytochrome c. La réduction est mesurée par la suivi de l'absorbance à 550 nm. L'antimycine est l'inhibiteur spécifique du complexe III. L'activité totale du complexe III est obtenu à l'aide de l'usage de l'antimycine afin de mesurer l'activité de l'enzyme en présence ou l'absence de son inhibiteur. L'activité est mesurée dans deux cuves en parallèle dans un tampon phosphate (1 mL, pH=7,8). Dans les deux cuves 2 µL de l'homogénat de foie, 5 µL Lauryl-β-D-maltoside (LM) 125 mM, 4 µL KCN 80 mM, 20 µL cytochrome c 2 mM sont rajoutés dans les deux cuves. Dans les deux

cuves la lecture d'absorbance est démarrée à 550 nm et à 37°C, dans la première cuve 3 µL décyubiquinone 20mM puis 2,5 µL l'antimycine 2 mM sont rajoutés respectivement. Tandis que dans la deuxième cuve d'abord 2,5 µL l'antimycine et ensuite 3 µL décyubiquinone sont rajoutés respectivement. La différence entre les deux mesures obtenues permet de calculer l'activité du complexe III.

Le complexe III est un complexe respiratoire très difficile à évaluer (181,182). Les difficultés sont dues à la nécessité de préparer de l'ubiquinone réduite, à la grande activité spécifique de l'enzyme et à diriger les interactions rédox entre les substrats et les produits du complexe, car la quinone auto-oxydée produit à la fois du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, qui peut modifier directement (réduire) le cytochrome c (183). Pour surmonter les difficultés de mesure de l'activité du complexe III isolé les activités combinées II + III ou I + III ont été mesurés. Sachant que un défaut partiel du complexe III peut être masqué dans les activités combinées (184,185) et ensuite certaines des complications qui apparaissent lors de la mesure de l'activité du complexe III isolé sont également présentes dans l'analyse des activités combinées (186).

➤ NADH Cytochrome C Reductase (Complexes I+III)

800 µL H₂O distillé préchauffé à 37°C est mis dans une cuve de 1 mL. Ensuite 2 µL de l'homogénat de foie, 200 µL du tampon Tris (pH=8), 4 µL KCN 80 mM et 20 µL cytochrome C oxydé 2mM (Sigma) sont rajoutés dans la cuve. Ensuite la lecture de l'absorbance à 550 nm est commencée. Après 2 minutes 10 µL du pyruvate 400 mM est rajouté dans la cuve. Les pentes de courbe obtenue sont mesurées pour faire des calculs.

➤ Succinate Cytochrome C Reductase (Complexes II+III, G3P déshydrogénase et III seul)

1 mL du tampon phosphate (pH= 7,8) est mis dans une cuve de 3 mL. Ensuite 2 μ L de l'homogénat, 2 μ L Rotenone, 20 μ L cytochrome C oxydé 2 mM et 4 μ L KCN 80 mM sont rajoutés dans la cuve, respectivement. La lecture à 550 nm est commencée et quelques secondes plus tard 10 μ L succinate, 10 μ L malonate et 10 μ L G3P sont rajoutés dans la cuve. Les pentes sont prises pour faire des calculs.

➤ Cytochrome oxydase (Complexe IV)

1 mL du tampon 6.8 (KH_2PO_4 10 mM et Sucrose 0,3 M) est mis dans une cuve de 1 mL (Dutscher). Ensuite 5,5 μ L de cytochrome C réduit (Sigma, la solution réduit est préparé 5 min avant le dosage) et 20 μ L Lauryl- β -D-maltoside (Sigma, n-Dodecyl β -D-maltoside) est rajouté dans la cuve. Le dosage de l'absorbance à 550 nm est commencé et quelques secondes plus tard 2 μ L d'homogénat dilué est rajouté dans la cuve. La pente de courbe obtenue est mesurée pour faire des calculs.

➤ Malate déshydrogénase (MDH) et Citrate synthase

La réaction se fait sous un volume de 1 mL du tampon phosphate (KH_2PO_4 10 mM et $\text{EDTA}_{\text{Na}_3} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, pH=7,8) dans une cuve de 1mL (UltraVette semi-micro pour l'UV-visible, Dutscher, Brumath, France). 2 μ L de l'homogénat dilué du foie est rajouté dans la cuve. Ensuite, 5 μ L du Triton 20% (Sigma, Steinheim, Germany), 5 μ L de DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), Sigma), 100 μ L Malate 500mM et 10 μ L d'Acetyl co-enzyme A 20 mM (Sigma) sont rajouté dans la cuve, respectivement. Ensuite on commence l'enregistrement de la densité optique à 412 nm pour stabiliser la variation de la densité optique, la réaction est

déclanché par l'ajout de 20 μL acide oxaloacétique 400 mM. L'activité de la citrate synthase est mesurée à partir de la pente de la courbe obtenue pendant 5 à 10 min. elle est exprimée en nmole/min/mg de protéine

➤ Aconitase et Isocitrate déshydrogénase (IDH)

L'activité aconitase a été mesurée par spectrophotométrie en surveillant la formation de cis-aconitase à partir d'isocitrate à 240 nm dans du Tris-HCl à 50 mM (pH 7,4) contenant du MgCl_2 à 0,6 mM et de l'isocitrate à 20 mM à 37 ° C. 1 mL tampon (pH=7,2) est mis dans une cuve et 5 μL Triton 20% est rajouté.

➤ Fumarase

L'activité du fumarase a été mesurée en surveillant l'augmentation de l'absorbance à 240 nm à 37° C dans un mélange réactionnel de 1 ml contenant du phosphate de potassium 30 mM, de l'EDTA 0,1 mM et du L-malate 500 mM (pH 7,4).



➤ Lactate déshydrogénase (LDH)

800 μL H_2O distillé préchauffé à 37°C est mis dans une cuve de 3 mL. Ensuite 200 μL du tampon Tris (Tris 50 mM, pH=8), 2 μL de l'homogénat de foie dilué, 5 μL de Triton 20% (Sigma), 5 μL KCN 10 mM et 5 μL NADH_2 2 mM sont rajoutés dans la cuve et puis la lecture de l'absorbance à 340 nm est commencée. Après 2 minutes 10 μL du pyruvate est rajouté dans la cuve. La pente de courbe obtenue est mesurée pour faire des calculs.

Résultats

Complexe I

Le résultat de l'activité du complexe I chez les 3 groupes de souris traité avec G1 : du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive est montré dans la [Figure 11](#). L'activité du complexe I est plus élevée chez les souris de Groupe 3 (G3) que celle des deux autres groupes témoins non-traités avec le C₆₀ ([Tableau 1](#)). La différence observée est significative (Le test One-way Anova , *p value* pour * est inférieur à 0,05).

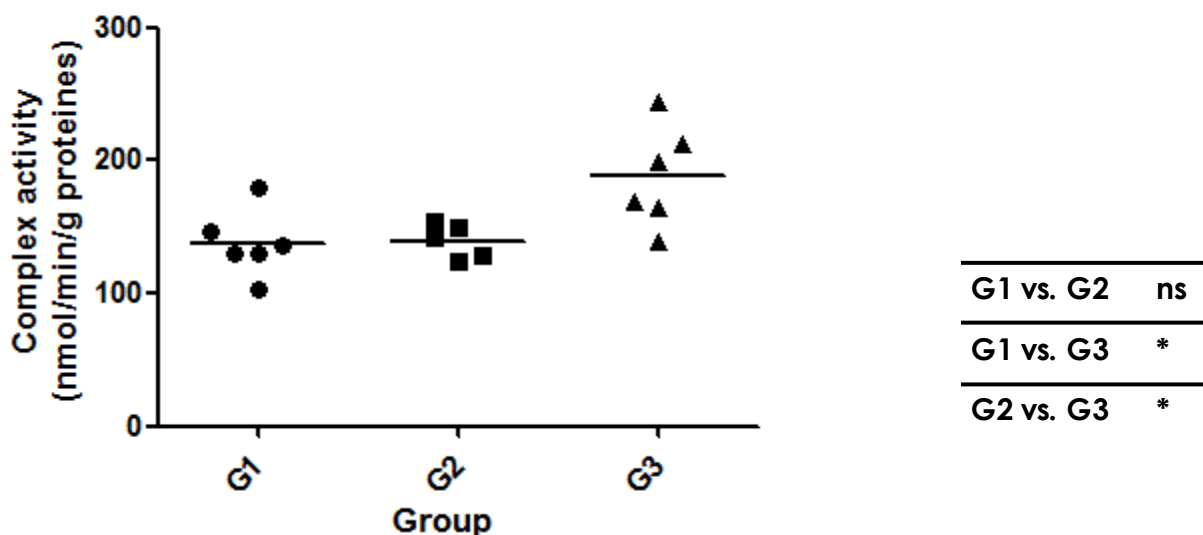


Figure 10. Activité du Complexe I pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif ; *p value* ≤ 0,05

	G1	G2	G3
Moyenne	137,5	139,5	188,0
Ecart type	24,99	12,70	37,56
Erreur type	10,20	5,681	15,34

Tableau 1. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe I pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexe II

L'activité du complexe II chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive a été évaluée (**Figure 12**). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'activité du complexe II chez les 3 groupes traités ou non-traités avec le C₆₀. L'activité moyenne de G1 est légèrement plus élevée que l'activité observée dans G2 et G3 (**Tableau 2**), mais cette différence n'est pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

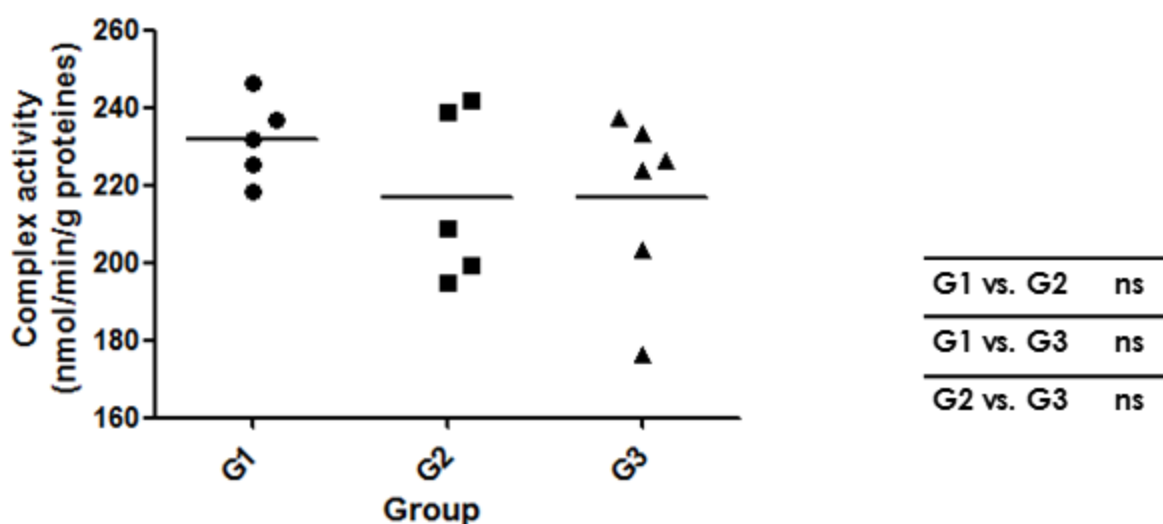


Figure 11. Activité du Complexe II pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	231,7	216,8	216,8
Ecart type	10,72	22,14	22,99
Erreur type	4,792	9,903	9,384

Tableau 2. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe II pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexe III

L'activité du complexe III a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats sont ploté dans la [Figure 13](#). L'activité moyenne du groupe 1 est plus élevée que les groupes G2 et G3 ([tableau 3](#)) mais ce phénomène n'a pas été observé chez toutes les souris du groupe G1 et la différence observée n'est donc pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

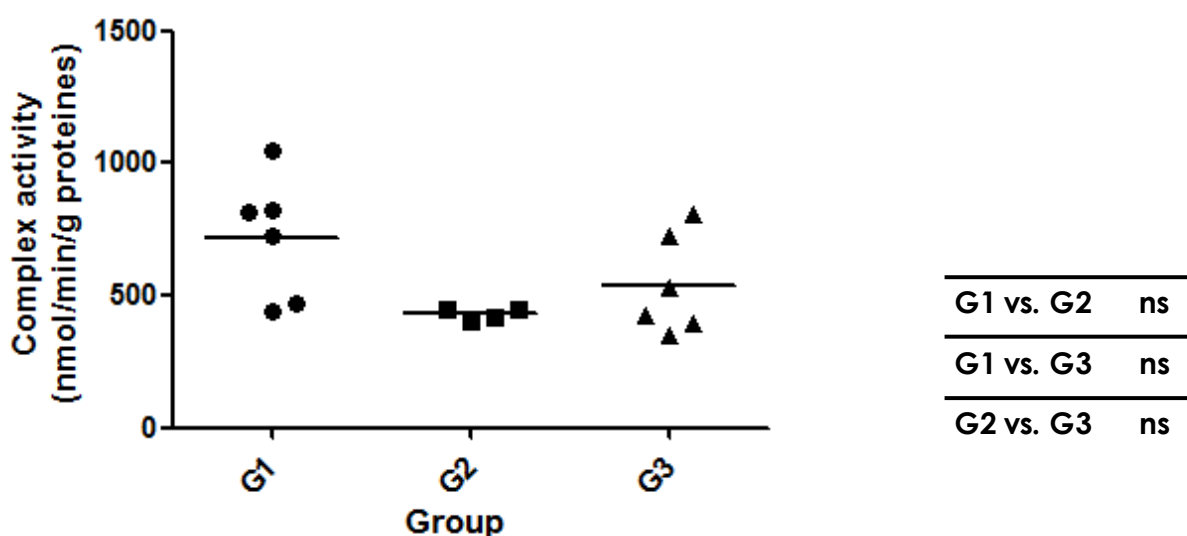


Figure 12. Activité du Complexe III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	719,8	430,1	539,8
Ecart type	232,4	24,27	188,1
Erreur type	94,88	12,13	76,80

Tableau 3. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexe IV

L'activité du complexe IV a été mesurée chez les 3 groupes de souris traité G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats sont représentés dans la [Figure 14](#). L'activité moyenne de l'enzyme des trois groupes est très proche ([tableau 4](#)) et il n'y a donc pas de différence significative entre les résultats (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

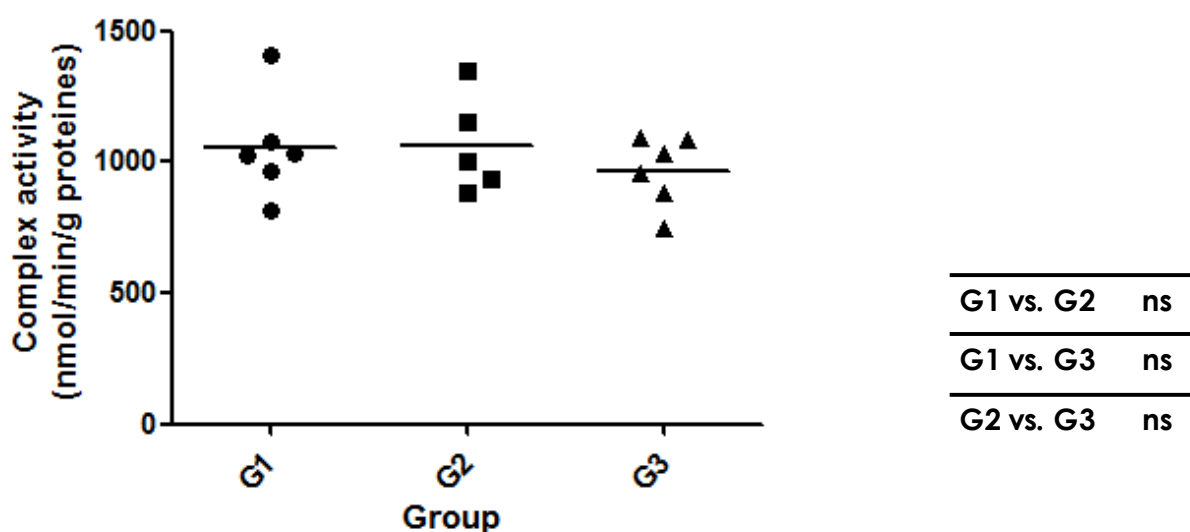


Figure 13. Activité du Complexe IV pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	1054	1065	967,2
Ecart type	195,4	189,5	133,3
Erreur type	79,77	84,73	54,41

Tableau 4. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe IV pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexe V

L'activité du complexe V a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats sont illustrés dans la [Figure 15](#). L'activité moyenne observé pour le groupe 3 est plus élevé que celles des deux groupes G1 et G2 ([tableau 5](#)) mais la différence observée n'est donc pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

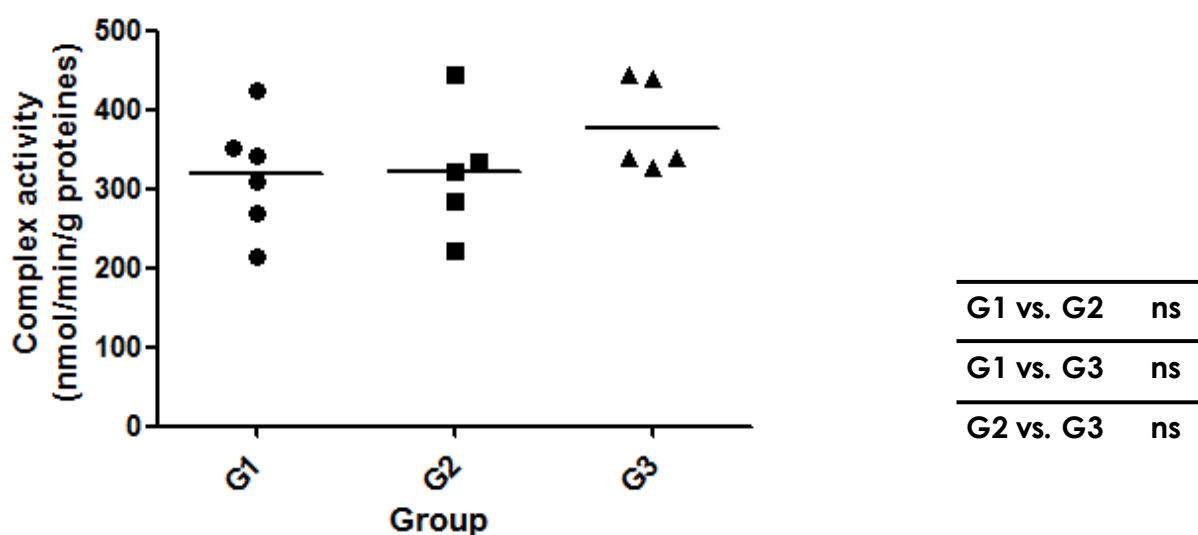


Figure 14. Activité du Complexe V pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	317,9	321,5	377,9
Ecart type	72,68	81,69	58,52
Erreur type	29,67	36,53	26,17

Tableau 5. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe V pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexes I+III

L'activité des complexes I+III a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats sont montrés dans la [Figure 16](#). L'activité moyenne observée pour le groupe 3 est légèrement plus élevée que celles des groupes G1 et G2 ([tableau 6](#)) mais la différence observée n'est pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

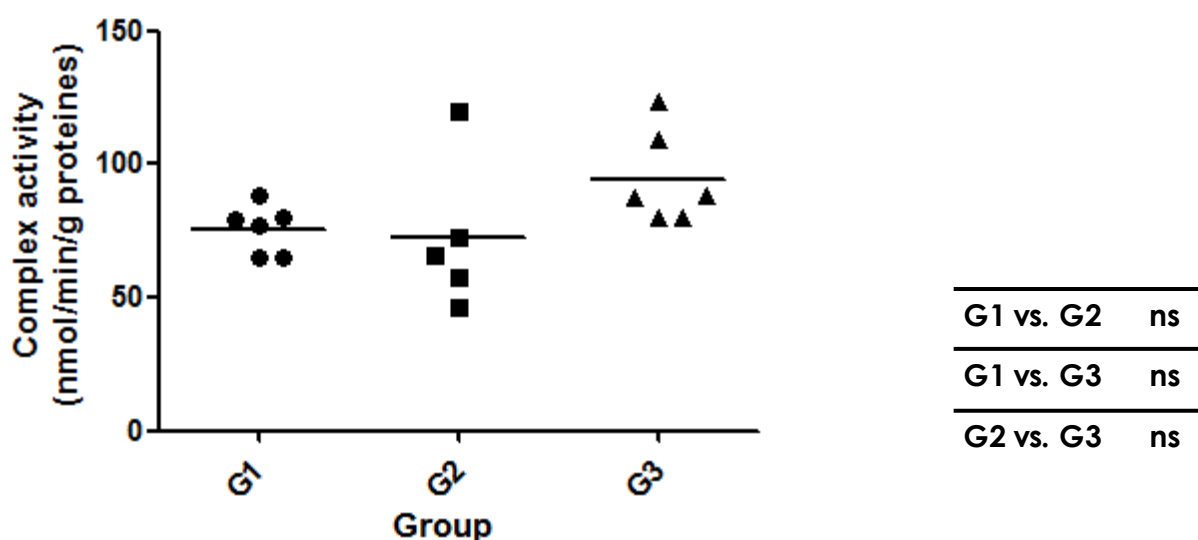


Figure 15. Activité du Complexe I+III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	75,78	72,41	94,62
Ecart type	9,22	28,41	17,68
Erreur type	3,764	12,70	7,216

Tableau 6. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe I+III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Complexes II+III

L'activité des complexes II+III a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats sont montrés dans la [Figure 17](#). L'activité moyenne observée pour les 3 groupes de souris est très proche l'un de l'autre ([tableau 7](#)) et la différence observée n'est pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

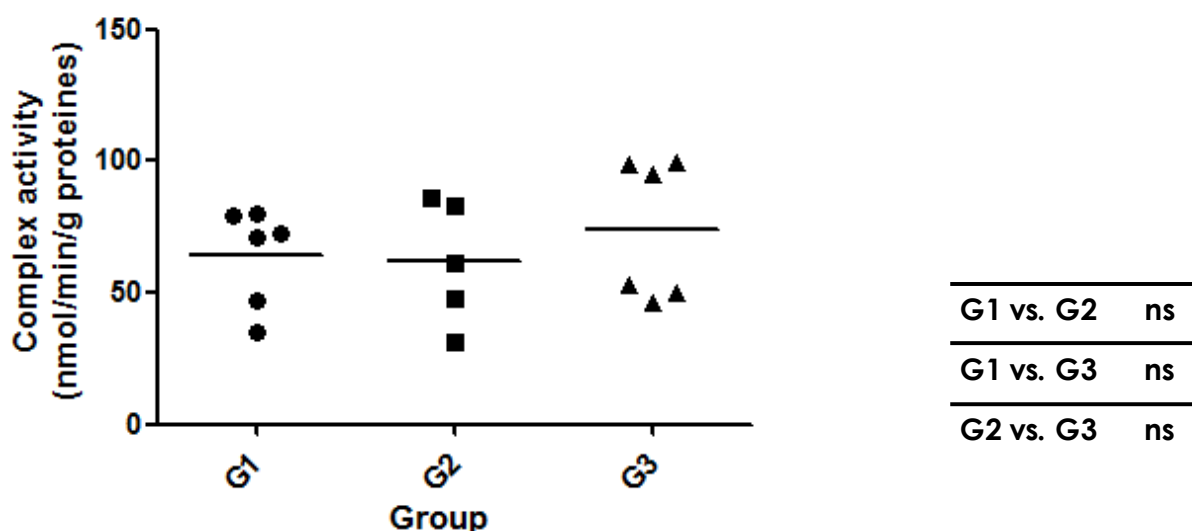


Figure 16. Activité du Complexe II+III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	63,89	61,86	73,79
Ecart type	18,65	23,37	26,45
Erreur type	7,615	10,45	10,80

Tableau 7. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du complexe II+III pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Citrate synthase

L'activité de l'enzyme citrate synthase a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats obtenus sont montrés dans la [Figure 18](#). L'activité moyenne observée pour les 3 groupes de souris est très proche l'un de l'autre ([tableau 8](#)) et il n'y a donc pas de différence significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

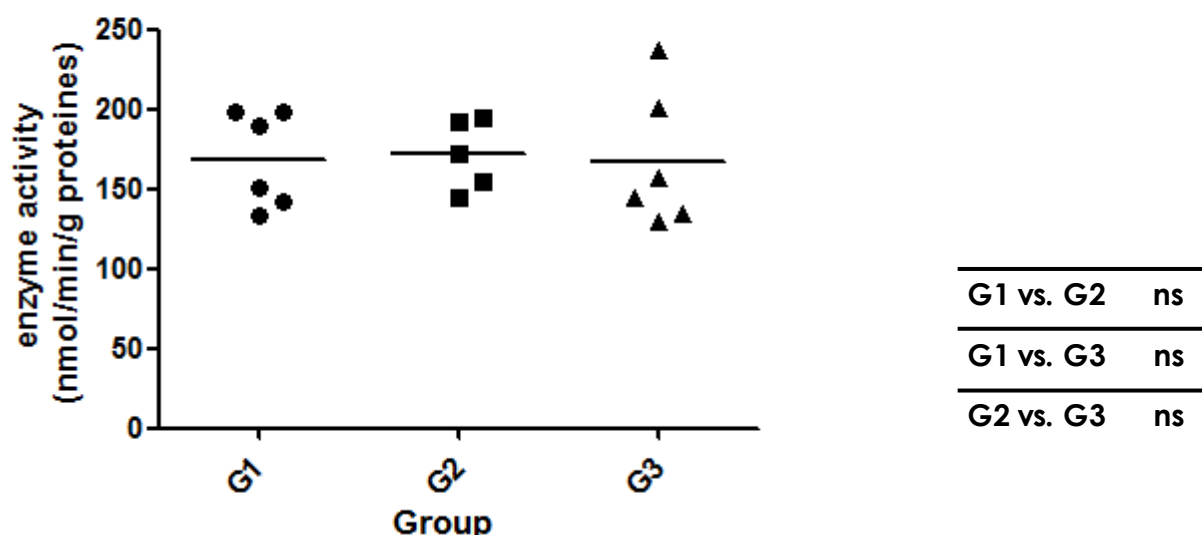


Figure 17. Activité de la citrate synthase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	168,6	171,8	167,4
Ecart type	29,89	22,37	42,93
Erreur type	12,20	10,00	17,53

Tableau 8. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de la citrate synthase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Aconitase

L'activité de l'enzyme aconitase a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats sont plotés dans la [Figure 19](#). L'activité moyenne observée pour les 3 groupes de souris est proche l'une de l'autre ([tableau 9](#)) et il n'y a donc pas de différence significatif (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

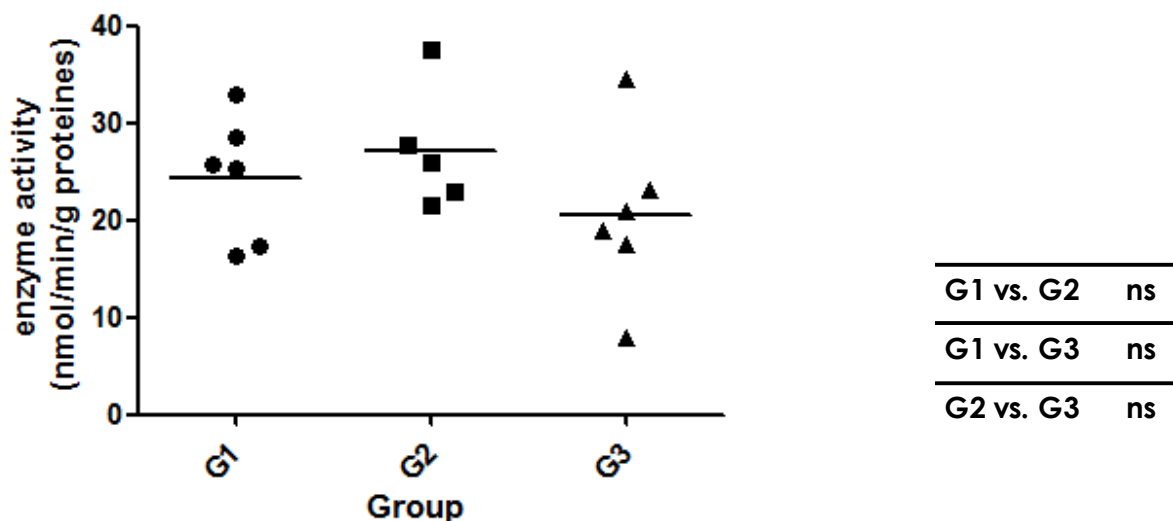


Figure 18. *Activité de l'aconitase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3); ns: non significatif*

	G1	G2	G3
Moyenne	24,33	27,11	20,48
Ecart type	6,425	6,310	8,652
Erreur type	2,623	2,822	3,532

Tableau 9. *Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de l'aconitase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)*

Isocitrate déshydrogénase (IDH)

L'activité de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (IDH) a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats obtenus sont montrés dans la [Figure 20](#). L'activité moyenne observée pour le G3 est diminué par rapport aux deux groupes témoins ; G1 et G2 ([tableau 10](#)) mais la différence observée n'est pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

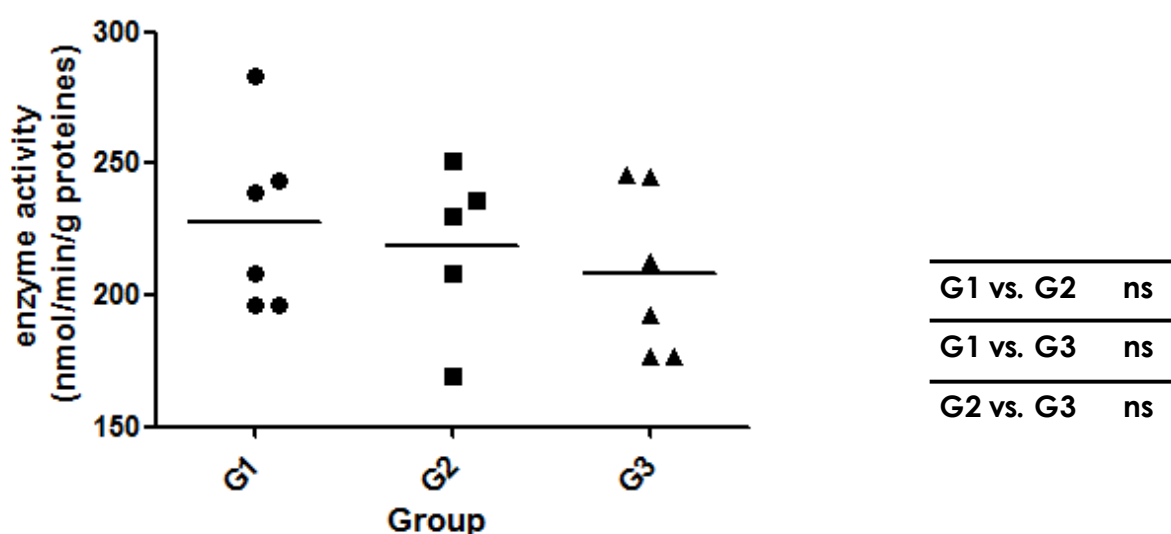


Figure 19. Activité de l'isocitrate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	227,8	218,7	208,3
Ecart type	34,12	31,57	31,54
Erreur type	13,93	14,12	12,88

Tableau 10. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Alpha-Cétoglutarate déshydrogénase

L'activité de l'enzyme alpha-cétoglutarate déshydrogénase a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats obtenus sont montrés dans la [Figure 21](#). L'activité moyenne observée pour le G1 est légèrement plus élevée que celles des groupes G2 et G3 ([tableau 11](#)) mais la différence observée n'est pas significatif (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

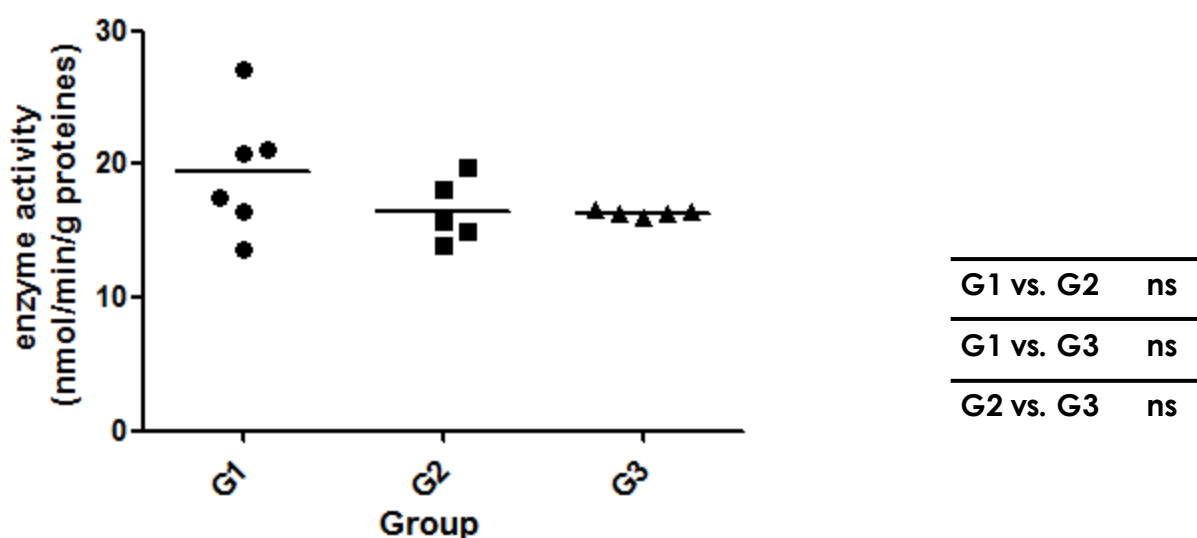


Figure 20. Activité de l'alph-cétoglutarate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	19,45	16,46	16,31
Ecart type	4,704	2,420	0,262
Erreur type	1,920	1,082	0,117

Tableau 11. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Fumarase

L'activité de l'enzyme fumarase a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats sont montrés dans la [Figure 22](#). L'activité moyenne observée pour le G2 est légèrement plus élevée que les groupes G1 et G3 ([tableau 12](#)) mais la différence observée n'est pas significative (Le test One-Way Anova, intervalle de confiance égale à 95%).

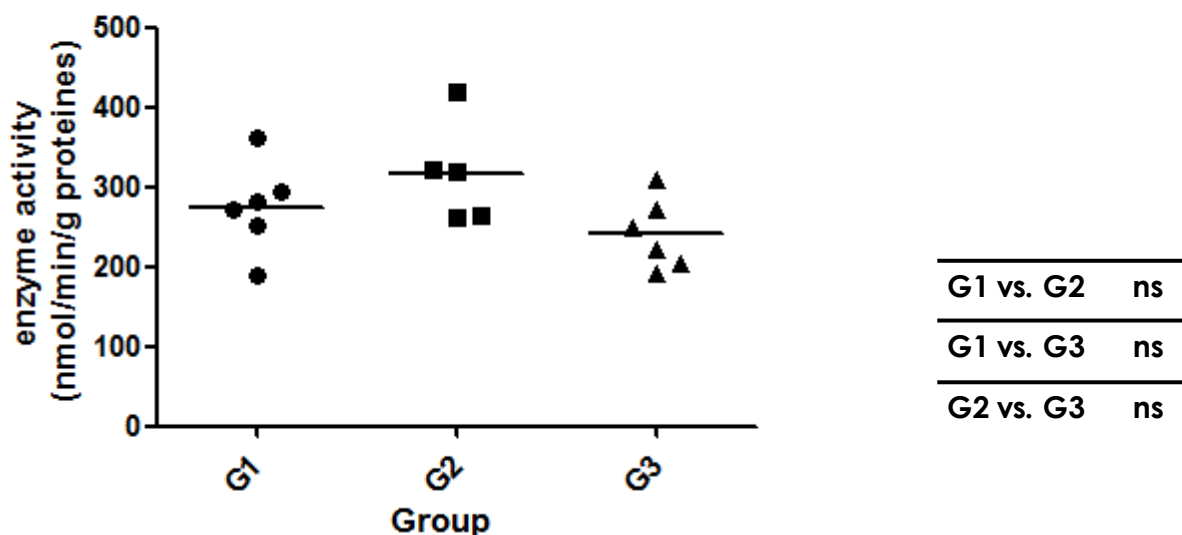


Figure 21. Activité de la fumarase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif

	G1	G2	G3
Moyenne	274,9	316,9	241,4
Ecart type	55,89	63,38	44,36
Erreur type	22,82	28,34	18,11

Tableau 12. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de la fumarase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Malate déshydrogénase (MDH)

L'activité de l'enzyme malate déshydrogénase (MDH) a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive et les résultats obtenus sont montrés dans la [Figure 23](#). L'activité moyenne observée pour le G2 est moins élevée que les groupes G1 et G3 ([tableau 13](#)). La différence observée est significative (Le test One-Way Anova, *p value* pour * est inférieur à 0,05).

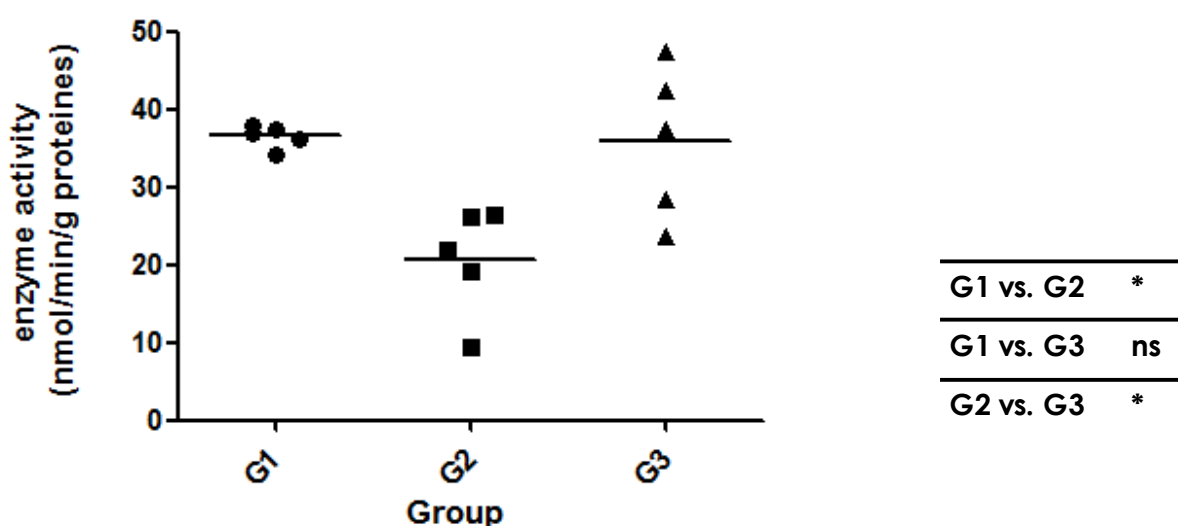


Figure 22. Activité de la malate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif ; $p \text{ value} \leq 0,05$

	G1	G2	G3
Moyenne	36,57	20,57	35,85
Ecart type	1,445	7,001	9,804
Erreur type	0,6462	3,131	4,385

Tableau 13. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité de la malate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Lactate déshydrogénase (LDH)

L'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée chez les 3 groupes de souris traitées ; G1 : avec du sérum physiologique (0.9% NaCl), G2 : avec l'huile d'olive et G3 : avec C₆₀ dissout dans l'huile d'olive. Les résultats obtenus sont plotés dans la [Figure 24](#). L'activité moyenne observée pour le G2 et G3 est plus élevée que celle du groupe G1 ([tableau 14](#)). La différence observée est significative (Le test One-Way Anova, *p value* est inférieur à 0,05).

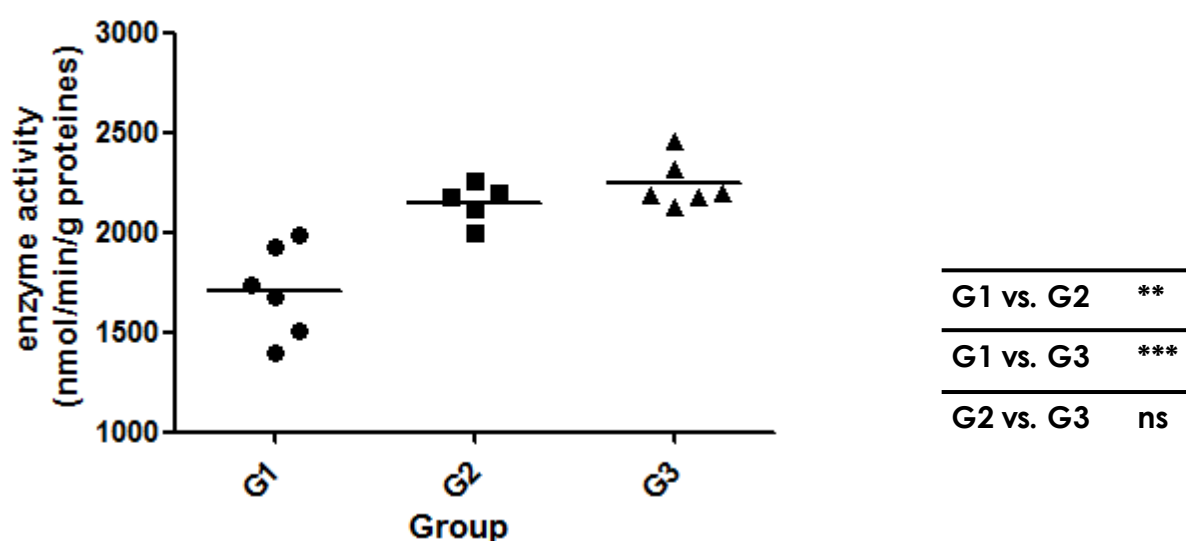


Figure 23. Activité du lactate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3);
ns: non significatif ; p value ≤ 0,05

	G1	G2	G3
Moyenne	1705	2148	2243
Ecart type	230,5	99,76	122,2
Erreur type	94,12	44,62	49,88

Tableau 14. Moyenne, Ecart type et erreur type de l'activité du lactate déshydrogénase pour les groupes 1 (G1), 2 (G2) et 3 (G3)

Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

Après les résultats obtenus en microscopie électronique à transmission le C₆₀ a été observés dans le prélèvement du foie ([Figure 26](#)) et de la rate ([Figure 27](#)) des souris de groupe traités avec le C₆₀ dissout dans l'huile d'olive ([c, d](#)).

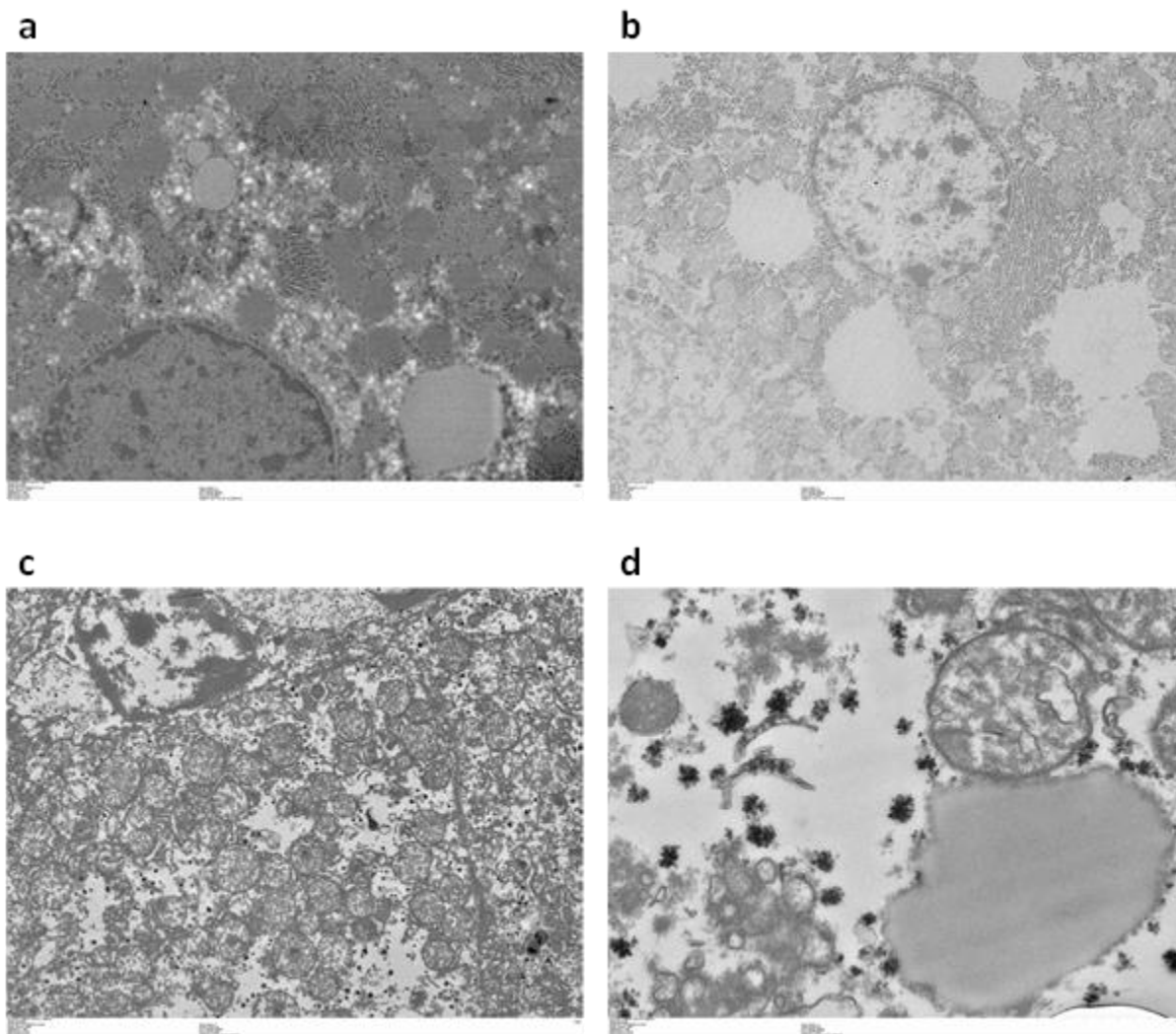


Figure 24. Photo de la microscopie électronique à transmission, (a) x3,0k Groupe 1, (b) x2,0k Groupe 2, (c) x2,0k Groupe 3 et (d) x10,0k Groupe 3.

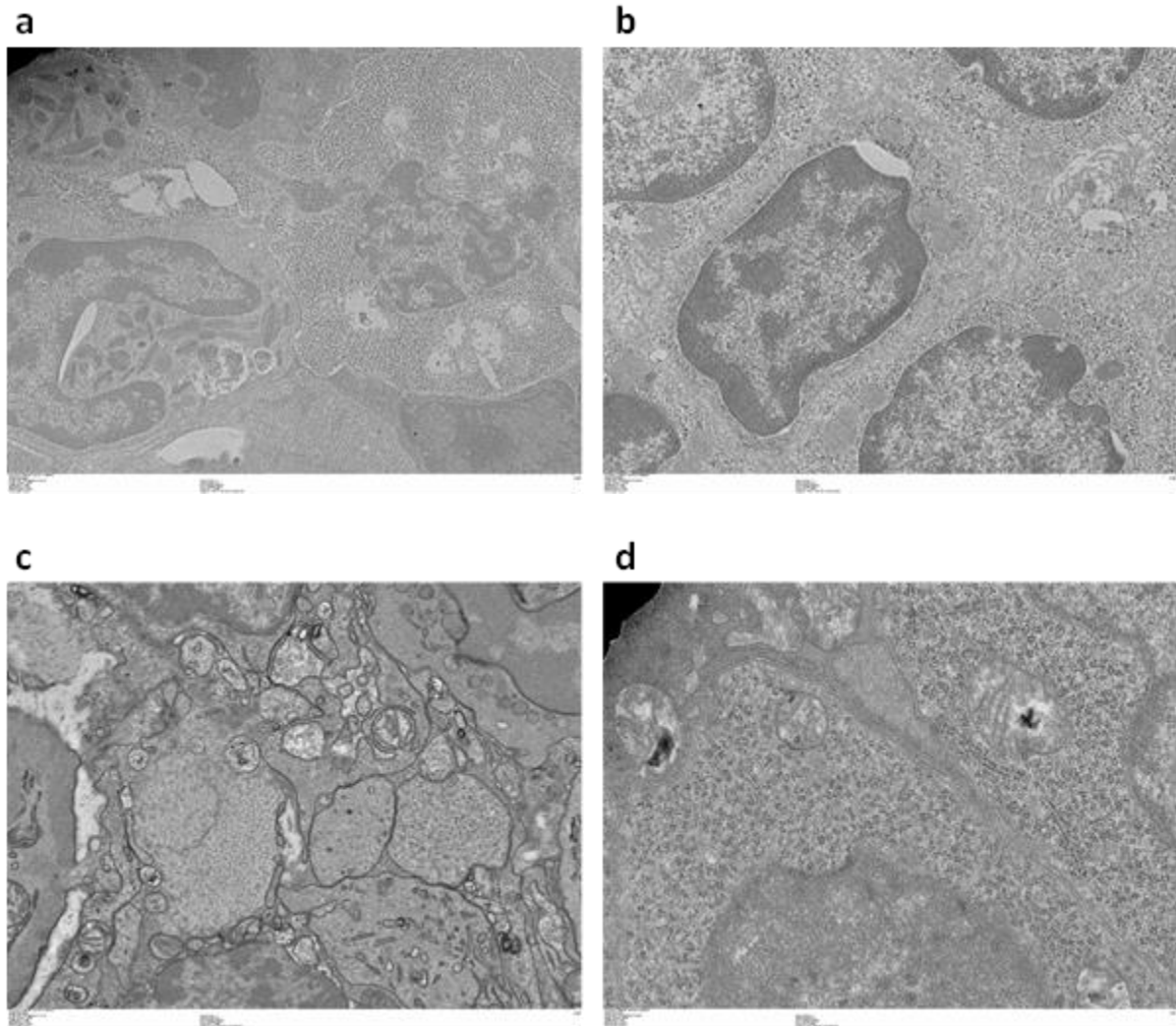


Figure 25. Photo de la microscopie électronique à transmission, (a) x2,5k Groupe 1, (b) x4,0k Groupe 2, (c) x4,0k Groupe 3 et (d) x5,0k Groupe 3.

Conclusion et discussion

La phosphorylation oxydative a lieu au niveau de la chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale interne. Elle fait intervenir d'une part des réactions d'oxydation qui aboutissent à une consommation d'oxygène et d'autre part une réaction de phosphorylation de l'ADP intramitochondrial en ATP. La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes multi-enzymatiques qui fonctionnent comme transporteurs d'électrons : le complexe I, le complexe II, le complexe III, le complexe IV et le complexe V (ATPase) qui assure la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique dans la matrice mitochondriale. Un déficit enzymatique de la chaîne respiratoire provoque une modification profonde des équilibres d'oxydoréduction cytoplasmiques et mitochondriaux, par accumulation d'équivalents réduits (NADH, FADH). Dans la mitochondrie, cette accumulation du NADH pousse à la transformation de l'acétoacétate en 3-hydroxybutyrate entraînant une élévation du rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate. De la même façon, dans le cytoplasme, la transformation du pyruvate en lactate est favorisée et le rapport lactate/pyruvate s'élève avec une augmentation secondaire de la concentration en lactate. L'existence d'une hyperlactacidémie persistante et d'une perturbation des équilibres redox représente une indication formelle d'une exploration enzymologique de la chaîne respiratoire.

L'activité de 3 enzymes du cycle Krebs impliqués dans le recyclage du NADH/NAD, Isocitrate déshydrogénase (IDH), Alpha kétooglutarate (AKGDH) et Malate déshydrogénase (MDH), a été mesurée. Parmi ces trois enzymes, l'activité du Malate déshydrogénase chez les souris G2 (traité avec l'huile d'olive) est moins élevée que celle observée chez les souris G1 (traité avec l'eau physiologique) et G3 (traité avec C60/l'huile d'olive). L'oxydation du malate dans le cytoplasme régénère l'OAA et le NADH. Les ROS modulent l'efficacité du cycle du TCA en diminuant l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (AKGDH) et de l'aconitase mitochondriale (187,188). Dans des conditions de stress oxydatif excessives, certaines enzymes

(Complexe I et AKGDH principalement) pourraient également être hyperglutathionées par la forme oxydée de glutathion (GSSG), ce qui altère leurs activités et diminue le pool de GSH (189). Le changement d'activité de l'AKGDH n'est pas significatif entre les 3 différents groupes de souris tandis que l'activité du complexe I est plus élevée chez les souris traitées avec du C60/l'huile d'olive (G3). Le ratio d'activité du complexe IV sur complexe I est plus faible pour le groupe G3, ce qui indique que cette diminution est spécifique du complexe I étant donné que les variations du complexe IV des différents groupes n'est pas significative. L'activité normale du citrate synthase et du complexe IV indique que l'augmentation de l'activité du Cx I de la chaîne respiratoire n'est pas à cause de la haute teneur mitochondriale par cellule ou par gramme de tissu.

L'aconitase est très susceptible à l'inactivation par les ROS alors que l'activité du fumarase est insensible aux ROS. La diminution du rapport de l'activité aconitase sur le fumarase est un indicateur fonctionnel de la production des ROS. La mesure de l'activité de l'aconitase et du fumarase chez trois différents groupes de souris montre que le C₆₀ ne produit pas assez de ROS dans la mitochondrie pour induire une inhibition détectable de ces enzymes.

Les dommages oxydatifs affectent également les lipides des membranes mitochondriales, ce qui entraîne une modification des propriétés de perméabilité de la membrane et une fuite importante de protons. Le phénomène qui peut affecter les modifications sur l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire et de la mitochondrie (190). Les résultats obtenus ont montré la présence du C₆₀ au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, sans aucun signe de production du ROS et/ou de toxicité, ce qui confirme l'innocuité de ce fullerène. Par ailleurs, la modification de l'activité enzymatique de la malate déshydrogénase (MDH) et du complexe I (Cx I) de la chaîne respiratoire a confirmé la présence du C₆₀ au niveau de la mitochondrie et son effet bénéfique dans ce compartiment cellulaire.

Chapitre IV

- **Fullerenes inhibit *ex vivo* activation of peanut allergic patient's basophil**
- **Expériences complémentaires sur une lignée de cellules mastocytaires de l'allergie**
- **Effet du [60]fullerène et de ses dérivés sur la dégranulation de basophiles humains purifiés et sur des cellules dendritiques humaines purifiées provenant de donneurs non allergiques (expériences complémentaires)**

Chapitre IV

La réponse immunitaire possède de deux phases : la première phase est la reconnaissance de pathogène et la deuxième est la réaction adoptée à l'élimination de cette pathogène. Cette réponse se réalise sous 2 formes : inné et adaptative. La différence entre ces deux formes est la spécificité ainsi que la mémoire de la réponse adaptative.

La première ligne de défense contre des infectants est les cellules phagocytiques tel que les mastocytes, macrophages et les neutrophiles poly-morphonucléaires. Ces cellules-là se lient aux microorganismes pour les internaliser et ensuite les éliminer.

Les lymphocytes B (les cellules B) et les lymphocytes T (les cellules T), les catégories de leucocyte, sont des cellules impliquées dans la réponse immunitaire adaptative (secondaire). Les noms B et T indiquent l'emplacement de leurs différenciations selon leurs abréviations anglaises (bone marrow pour B et thymus pour T). Comme les autres cellules sanguines elles sont originaires des cellules souches situées dans la moelle osseuse. Lymphocytes B se différencient dans la moelle osseuse tandis que les lymphocytes T dans le thymus. Ensuite elles se sont transportées par le sang vers les tissus lymphoïdes périphériques. Il existe plusieurs types de cellules T, T cytotoxique, T auxiliaire et T régulateur (108,191,192).

Les lymphocytes T participent dans le développement des cellules B et la sécrétion des anticorps et aussi elles peuvent aider les cellules phagocytiques dans le processus d'élimination des pathogènes. Troisième type des lymphocytes T reconnaissent les cellules déjà infectées par le virus pour les détruire. Les lymphocytes T sont une source majeure de cytokines, les messagers hormonaux responsables de la plupart des effets biologiques du système immunitaire. Ces cellules portent des récepteurs spécifiques à l'antigène sur leur surface cellulaire pour permettre la reconnaissance d'agents pathogènes étrangers. Ils peuvent également reconnaître les tissus normaux lors de maladies auto-immunes. Il existe deux principaux sous-ensembles de lymphocytes T, caractérisés par la présence de molécules de surface cellulaire appelées CD4 et CD8.

Chapitre IV

Les lymphocytes T exprimant CD4 sont également connus sous le nom de lymphocytes T auxiliaires, et ceux-ci sont considérés comme les producteurs de cytokines les plus productifs. Ce sous-ensemble peut être encore divisé en Th1 et Th2, et les cytokines produites sont appelées cytokines de type Th1 et de type Th2 (108,191,192).

Les cytokines de type Th1 ont tendance à produire les réponses pro-inflammatoires qui sont les responsables de la destruction des parasites intracellulaires et de la perpétuation des réponses auto-immunes. L'interféron gamma est la principale cytokine Th1. Des réponses pro-inflammatoires excessives peuvent entraîner des lésions tissulaires incontrôlées. Il faut donc prévoir un mécanisme pour y remédier. Les cytokines de type Th2 comprennent les interleukines 4, 5 et 13, qui sont associées à la promotion des réponses IgE et éosinophiles dans l'atopie, ainsi qu'à l'interleukine 10, qui présente une réponse inflammatoire plus importante. En excès, les réponses Th2 contrecarrent l'action microbicide médiée par Th1. La condition optimale semble donc produire une réponse Th1 et Th2 bien équilibrée, adaptée au défi immunitaire.

Les lymphocytes B possèdent d'énormément de récepteur avec la même spécificité sur leurs surfaces. Dès la liaison entre un antigène avec les récepteurs de lymphocyte B, celle-ci transporte l'antigène à l'intérieur par l'endocytose. Elle présente une partie (un fragment) de l'antigène sur la surface en associant avec le MHCII (major histocompatibility complex II) pour être reconnu par les récepteurs TCR (T cell receptor) de cellules T auxiliaires. Les cellules T auxiliaires ont un peptide CD4 sur leurs surfaces qui leur permettent de reconnaître le MHCII de cellules B (ou toutes les autres cellules présentatrices de l'antigènes, APC,) associé avec le fragment de l'antigène. Après la reconnaissance de l'antigène et MHCII par les T auxiliaires, celle-ci induisent la différenciation des cellules B par les cytokines aux plasmocytes (durée de vie environ quelques jours) ou cellules mémoires (durée de vie quelques années). Les cellules B se multiplient pour produire une population cellulaire (clone) qui ont les récepteurs avec la

spécificité identique. Par la suite la réaction continue en produisant des anticorps par les plasmocytes. Les cellules mémoires circulent librement dans le sang, elle se différencie aux plasmocytes lors de deuxième contact avec la même structure d'antigène (Antigène : toute substance étrangère à l'organisme qui provoque une réponse immunitaire seule ou après la formation d'un complexe avec une molécule plus grosse (telle qu'une protéine) et capable de provoquer la production des anticorps et de se lier à un anticorps ou cellule T/B au cours de la réponse immunitaire) (108,191,192).

Allergie

L'allergie est une réaction d'hypersensibilité inadaptée et excessive du système immunitaire. Les personnes atopiques sont génétiquement prédisposées à développer l'immunoglobuline E lors de contact avec un antigène (i.e., allergène) tandis que les personnes non-allergiques montrent une réponse de l'immunoglobuline G (193). Les patients allergiques souffrent des divers symptômes tel que la rhinite allergique, dermatite allergique, allergie alimentaire, l'asthme et choc anaphylactique (194). Après la sensibilisation, l'IgE se lie aux récepteurs de haute affinité (FcεRI) qui se trouvent sur la surface des cellules immunitaires (tel que, basophiles, mastocytes, les cellules présentatrices de l'antigène et éosinophiles) (195,196). Lors de la liaison de l'allergène avec les IgE déjà attachés aux cellules (basophiles et mastocytes), le pontage des IgE conduit à la libération des médiateurs biologiques (tel que, histamine, leucotriens, cytokines, chemokines, b-hexosaminidase, etc.). Le pontage des IgE exige au minimum deux épitopes par allergène pour l'activation de la cellule immunitaire. Les médiateurs biologiques libérés sont les responsables de l'inflammation (197,198).

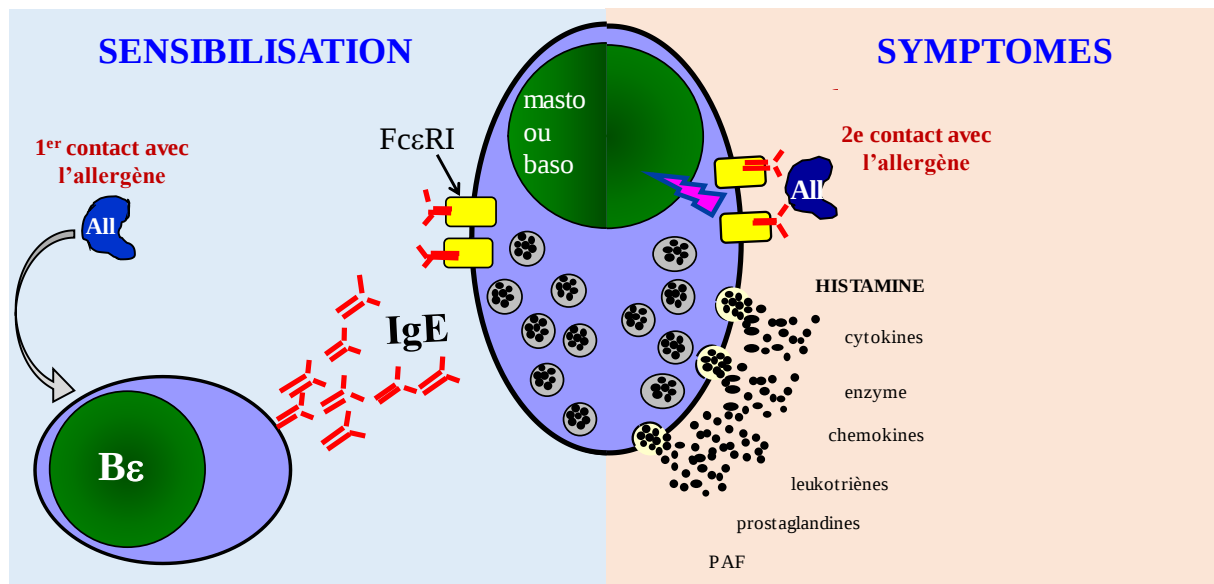


Figure 26. Les deux phases (sensibilisation et dégranulation) concernant le mécanisme de la réaction allergique au niveau cellulaire.

L'allergène pénétré est phagocyté par les cellules présentatrice de l'antigène tel que les macrophages et les cellules dendritiques, lesquelles à son tour présentent l'antigène aux cellules T CD4. Les cellules T CD4 se différencient aux cellules T auxiliaire (Th2), résultant la production des interleukines (IL) IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines provoquent l'activation et la prolifération des cellules B ainsi que les éosinophiles, menant à la production des IgE spécifique de l'antigène par les cellules B. L'IgE peut se lier aux récepteurs de haute affinité (FcεRI) situant sur la surface des mastocytes et des basophiles et faire le pontage lors de la re-pénétration de l'antigène. Le pontage des IgE en raison de l'interaction entre l'IgE et l'allergène mène à la libération des médiateurs (tel que l'histamine, la sérotonine, la protéase (tryptase, chymase), le facteur d'activation plaquettaire (ou PAF), les prostaglandines, les leucotriènes, les cytokines (tel que TNF-α, IL-1, IL-4, IL-5, IL-13), des composées vasodilatateurs, l'héparine et l'anticoagulant, [Figure 25](#)) qui causent les symptômes allergéniques et une inflammation dans le site infecté ([199,200](#)).

Il existe plusieurs sources allergéniques. Les sources allergéniques couramment connues sont les plantes (tel que : grains de pollen d'arbre, de graminées, d'herbacées), champignons (tel que moisissures, ...), médicaments (comme : pénicilline, aspirine, anesthésiques, ...), animal (mammifère: chat, chien, cheval, rat, souris, ...), insectes (tel que : blatte, venin d'abeille, de guêpe et de fourmi, ...), arachnides (acariens de la poussière de maison, ...), aliments (tel que : œufs, lait, poisson, fruits de mer, viande, fruits, carottes, céleri, céréales, noix, arachide, ...) Les sources allergéniques contiennent les substances qui peuvent causer une réaction allergique lors d'une injection, ingestion, inhalation ou un contact cutané. (108,191,192).

Basophiles et mastocytes

En microscopie optique, les mastocytes apparaissent ronds, fusiformes ou en étoile selon qu'ils sont ou non adhérents (201). Leur taille varie entre 9 et 30 μm et leur noyau ovale est souvent repoussé à l'une des extrémités par la masse imposante de granules cytoplasmiques qui occupent la moitié du volume cellulaire. Les granules mastocytaires présentent la particularité de modifier la teinte des colorants basiques (202,203).

Bien que les basophiles constituent moins de 1% des leucocytes du sang périphérique, une nouvelle compréhension de la biologie des basophiles démontre à quel point ils sont puissants à la fois pour les fonctions effectrices et pour la régulation immunitaire. Historiquement, les basophiles étaient principalement associés à des réactions d'hypersensibilité immédiates, basées sur l'expression à la surface cellulaire du récepteur IgE de haute affinité ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) et la libération d'histamine et d'autres médiateurs atopiques lors de la cross-linking des récepteurs $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ (204–206). Cependant, cette perception de la fonctionnalité limitée de basophile est en train de changer dramatiquement, avec des preuves de leur expression de nombreux récepteurs cellulaires. Une fois que ces récepteurs sont ligaturés, sont capables d'activer les basophiles

pour produire des cytokines qui favorisent et régulent les réponses immunitaires adaptatives de type Th2. Cette fonction rendent les basophiles mécaniquement importantes dans les réactions d'hypersensibilité en phase tardive et les réactions d'hypersensibilité retardée, ainsi que dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (149,204,206–227).

Les basophiles sont des dérivés des progénitures hématopoïétiques myéloïdes CD34+ dans la moelle osseuse, qui peuvent être distingués phénotypiquement et fonctionnellement des autres leucocytes, y compris les mastocytes. Bien que les basophiles et les mastocytes partagent de nombreuses caractéristiques, les mastocytes résident dans les tissus, tandis que les basophiles résident dans la circulation et peuvent être recrutés dans les tissus (208,218,219,224,228). Une distinction essentielle des mastocytes est l'absence de l'expression de CD117 par les basophiles et une forte expression de CD123 par les basophiles (229). La dérivation *in vitro* des mastocytes se produit lorsque les cellules CD34+ sont cultivées avec le facteur de croissance des cellules souches (SCF, le ligand pour CD117) et IL-6 (230), tandis que la dérivation *in vitro* des basophiles se produit lorsque les cellules CD34+ sont cultivées avec l'IL-3 en l'absence de SCF (220,229–231). *In vivo*, les basophiles pénètrent dans la circulation avec un phénotype mature et survivent environ 5 jours (205,221).

Les basophiles et les mastocytes peuvent servir d'intermédiaire dans les réponses immunes adaptatifs par leurs récepteurs de haute affinité d'IgE (FcεRI). Elles ont des granules sécrétoires cytoplasmiques préformés qui contiennent des réserves de l'histamine et la sérotonine. Les mastocytes contiennent aussi de variété de protéases qui ne sont activent qu'en même temps que leur libération. Elles peuvent libérer des quantités substantielles de leurs contenus vésiculeux lors d'un événement stimulant par fusionnement des membranes vésiculaires avec la membrane plasmique pour former des canaux (exocytose), ce processus assure un maximum effet biologique. Ce dernier provoque une grande partie des symptômes associés à une

maladie allergique aiguë et chronique. L'allergie est également couplée à la sécrétion de cytokines stockées dans les granules (exemple : TNF) et ainsi à la capacité des mastocytes à générer une réaction tardive (phase tardive), en produisant des prostaglandines, des leucotriènes et des cytokines inflammatoires et immuno-régulatrices (208,218–220,224,228–231).

La caractérisation du développement des mastocytes et des basophiles nous permet d'établir de meilleurs protocoles pour étudier ces cellules *in vitro*. L'étude sur ces cellules sont difficiles à effectuer, à cause de nombre très faible de basophiles dans le sang ce qui nécessitant des prélèvements de volumes importants de sang pour réaliser l'étude. De même, la maturation complète des mastocytes se situe dans les tissus et les mastocytes matures ne se trouvent donc pas dans le sang circulant. Par conséquent, les lignées cellulaires établies ou des mastocytes différenciés *in vitro* à partir de cellules progénitrices (c'est-à-dire du sang de cordon, de la moelle osseuse) sont utilisées généralement. Pour pallier les problèmes pratiques et éthiques, les recherches se réalisent sur des lignées cellulaires immortalisées pour les études *in vitro*. Ces lignées cellulaires sont des cellules RBL 2H3 (Rat basophile leukemia cell line, mastocytes de rat) wild type et humanisées, c'est-à-dire transfectées avec le FcεRI humain. Cette lignée a été établie à partir d'une tumeur solide de rat (232,233) et a ensuite été sous-clonée afin d'établir des clones capable de dégranuler en réponse à une stimulation IgE-dépendante tels que le clone 2H3 (234–236). Ces cellules peuvent être sensibilisées passivement avec l'IgE puis activées par les allergènes. Les cellules de la lignée RBL-2H3 possèdent les caractéristiques des mastocytes de type muqueux et expriment à leur surface le récepteur de haute affinité pour les IgE (237,238). Les travaux sur les cellules RBL ont montré que la stimulation par le récepteur IgE de haute affinité induit la production de ROS qui régulent diverses réponses MC, y compris la dégranulation, la sécrétion de leucotriènes et la production de cytokines (239). Inversement, les

antioxydants qui atténuent les ROS intracellulaires chez les MC de rongeurs inhibent la dégranulation (240). Le maintien et la multiplication de ces cellules en culture sont relativement aisés.

Pour réaliser les études ex vivo sur les basophiles, les cellules doivent être fraîchement prélevées afin d'obtenir une bonne sensibilité.

Anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines sur la surface des lymphocytes B et aussi sécrétées par les cellules plasmocytes qui sont les dérivées des lymphocytes B. L'immunoglobuline est formée de deux chaînes lourdes identiques liées par les ponts disulfures et aussi deux chaînes légères identiques, chacune liées à l'une des chaînes lourdes par les ponts disulfures. L'immunoglobuline E est l'anticorps impliquée dans l'allergie. Elle se présente souvent en forme "Y" dont contient deux paratopes spécifique pour le même épitope. La molécule d'immunoglobuline s'est composée de deux régions "Fab" identiques (antigen-binding fragment) et d'une région "Fc" (cristallisable fragment). L'immunoglobuline s'est composé de deux chaînes lourdes et légères dont chacune de ces deux chaînes possède de régions constants (3 ou 4 pour les chaînes lourdes et 1 pour la chaîne légère) et des régions variables. Les régions constantes de la chaîne lourde définit l'isotype ou la classe d'immunoglobuline. Chez les mammifères, il existe cinq catégories d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) qui ont les différents types de chaînes lourdes (μ , δ , ϵ , α (deux sous unités) et γ (quatre sous unités)) et deux catégories de chaînes légères κ et λ . L'enchaînement et l'ordre des acides aminés de la région constante est identique pour chacune des classes ou sous classes d'une immunoglobuline (108,191,192).

Les chaînes légères possède d'un seul domaine constant et les chaînes lourdes possède de trois domaines constantes (ex : IgG, IgA, IgD) ou quatre (ex : IgM et IgE). En revanche, les

The diagram illustrates the structure of an antibody, showing the Fab fragment (antigen-binding fragment) and the Fc fragment (crystallizable fragment). The Fab fragment is composed of two heavy chains (CLo1, CLo2) and two light chains (CLé1, CLé2). The Fc fragment is composed of two heavy chains (CLo3, CLo4) and two light chains (CLé3, CLé4). The variable regions (VLa, VLé) are shown in red, and the constant regions (CLo, CLé) are shown in blue. The regions of hypervariability are indicated by vertical bars. The hinge region is shown in green. The disulfide bridges (ponts disulfure) are shown as orange lines. The legend identifies the components: Chaîne lourde (heavy chain), Chaîne légère (light chain), Les régions hypervariables (hypervariable regions), Région de charnière (hinge region), Pont disulfure (disulfide bridge), C (chain), Lo (heavy), Lé (light), and V (variable).

Les paratopes (antigen-binding sites) sont les structures spécifiques des anticorps qui reconnaissent les épitopes des antigènes qui sont situées entre les domaine variables de la chaîne lourde et légère du fragment Fab. Dans chacun des cadres de régions variables, il existe trois régions hypervariables. La partie CDR (complementary determinig region), dans laquelle les

trois régions hypervariables de chaînes lourdes et légères sont face à face les uns aux autres, est la partie qui détermine la spécificité de paratope (108,191,192,241).

Il existe 3 types de l'anticorps. L'anticorps monoclonale, polyclonaux et recombinant. L'anticorps existant dans un sérum, *in vivo*, sont toujours polyclonaux. Les anticorps polyclonaux sont obtenus par l'immunisation des animaux tel que souris, rat, lapin, singe et etc. Durant cette action les lymphocytes B sont mobilisées pour être spécifique pour les structures particulières d'un antigène. Les différents épitopes de l'antigène suscitent la prolifération de plusieurs clones de lymphocyte B et par la suite la production des anticorps dont s'appelle polyclonaux (108,191,192,241).

L'anticorps monoclonale est le résultat de l'isolement d'un clone de lymphocyte B en utilisant les techniques biologiques. Les anticorps monoclonaux ont la même spécificité et la même affinité pour le même épitope. Pour avoir l'anticorps monoclonale, l'animal est immunisé. Le lymphocyte de rate de l'animal est fusionné avec les cellules myélome. Le résultat est la ligné cellulaire hybridome qui se multiplie indéfiniment et produit les anticorps. Pour obtenir l'anticorps il existe deux choix. Première est de faire la culture cellulaire de cellules hybridome pour obtenir un surnageant contenant l'anticorps. Deuxième est de faire une injection intrapéritonéal dans la souris nues (pour ne pas avoir la refus) pour obtenir le liquide (ascite) qui contient plus de 10 mg/mL d'anticorps (108,191,192,241).

Fullerènes et Allergie

Plusieurs études ont proposé des effets antiallergiques des fullerènes tel que l'inhibition de la dégranulation des mastocytes humains et des basophiles du sang périphérique (41), l'inhibition de l'inflammation des voies respiratoires chez les souris, la diminution de taux sérique

d'IgE et des cytokines inflammatoires (115), l'inhibition de la libération des médiateurs d'inflammatoire des mastocytes pulmonaires (116), l'inhibition de la dégranulation et la production des cytokines dans les mastocytes de la peau humaine et dans les basophiles, et sur l'anaphylaxie *in vivo* chez les souris (117). Cet effet inhibiteur est égale voir plus important que les autres antioxydants bien connus comme la vitamine D, la vitamine C, la vitamine B et la disodium chromoglycate (antihistaminique) qui ont déjà démontré un rôle inhibiteur dans la réponse allergique (tableau ci-dessous).

		Mode d'action	Dose	Inhibition de la dégranulation moyenne	Références
Antioxydant	Acide ascorbique (Vit C)	Agent réducteur et antioxydant	$2,9 \times 10^{-2} \text{ M}$	Inhibition de la libération de l'histamine : 35%	(242)
	Pyridoxine (Vit B ₆)		$8 \times 10^{-3} \text{ M}$	Inhibition de la libération de l'histamine : 77%	(242)
	Vit D ₃	Liaison de la Vit D3 avec le VDR (=effet régulateur)	10^{-6} et 10^{-8} M	Inhibition de la libération de l'histamine : 34% Diminution de la production de TNF- α : 41%	(243)
Oxydant	H ₂ O ₂	Inhibe le canal d'afflux de calcium	500 μM	Inhibition de la dégranulation (β -hexosaminidase: médiateur préformé) : 50% Diminution de la production de TNF- α (newly synthesised) : 85%	(244)
Anti-histaminique	Disodium chromoglycate	Blocage de la liaison histamine/récepteur	$2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	Inhibition de la libération de l'histamine : 65%	(242)
	Hydroxyzine	Pas connue	25 mg (tablets)	Diminution de la libération de l'histamine : 65%	(245)
	Cetirizine	Pas liée avec la liaison histamine/récepteur	0,075-0,193 ng/mL	Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique (PGD2 production) : 50%	(246)
Anti inflammatoire non-stéroïdiens (AINS)	Acétaminophène	Inhiber la voie d'initiation (NO), inhibition de la synthèse des prostaglandines	1000 μM	Diminution de la libération de l'histamine : 12%	(247)
	Ibuprofène	Inhibiteur de la cyclooxygenase et de la synthèse de prostaglandine et de thromboxanes	10 μM	Diminution de la libération de l'histamine : 8%	(247)
	Indométacine	Inhibiteur de la cyclooxygenase-2 et de la synthèse de prostaglandine	3 mg/kg b.wt	Diminution de la production de TNF- α : 24%	(248)
	Indométacine		1000 μM	Diminution de la libération de l'histamine : 28%	(247)
Anti-inflammatoire, Antioxydant, antiallergique	Tanshinone IIA (Tan IIA)	Tan IIA active Sirt1 et donc LKB1-AMPK (=amortit la signalisation de Fc ϵ RI)	10 μM	Inhibition de la dégranulation: 50% Diminution de la production de TNF- α : 74%	(249)
Antibiotique	Furaladone	Inhibition de l'activation de Syk	10 μM	Inhibition de la dégranulation: 73% Diminution de la production de TNF- α : 95%	(250)

La stimulation par le récepteur IgE de haute affinité des mastocytes et des basophiles conduit à la dégranulations des médiateurs inflammatoires tel que l'histamine, les enzymes

comme protéase, les leucotriènes, les cytokines comme TNF- α (tumor necrosis factor) et IL-17 ce qui induit la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (239,251). Ces composés pro-inflammatoires, libérés par les mastocytes et les basophiles activés, permettent une meilleure adhésion et migration des leucocytes au site inflammatoire. En particulier, le TNF- α favorise la migration des leucocytes et joue également un rôle dans la production de ROS et contribue ainsi au déséquilibre de l'homéostasie redox des cellules impliquées (252,253). Or, l'élimination des ROS et des radicaux libres est l'un des mécanismes par lesquels l'inflammation peut être contrôlée et les antioxydants qui atténuent les ROS peuvent inhiber la dégranulation des mastocytes (240,254,255).

Nous avons donc étudié l'effets des fullerènes sur la réponse allergique dans différents modèles *in vitro* et *ex vivo* dans cette partie de travail en utilisant les cellules mastocytaires de Rat (RBL-2H3) et les macrophages (RAW 264.7), comme contrôle, pour l'étude *in vitro* et les basophiles du sang des patients allergiques et les donneurs non-allergiques pour l'étude *ex vivo*.

involved in allergic response: mast cells and basophiles. Four different soluble fullerene derivatives were compared: [60]fullerene serinol malonate, dendro[60]fullerene, fullerol and β -cyclodextrin[60]fullerene in addition to pristine [60]fullerene. Derivatives were not toxic *in vitro* except β -cyclodextrin[60]fullerene at high concentration ($>1\mu\text{M}$). We showed that the IgE-dependent and independent mediator release from the mast cell-related cell line RBL-2H3 was significantly inhibited at nanomolar range with dendro[60]fullerene. Then, by monitoring the expression of the degranulation markers CD63 and CD203c in a leveraged basophile activation test, the same derivative, dendro[60]fullerene, was found to be the most efficient in inhibiting the Fc ϵ RI-dependent activation of basophiles from peanut allergic patients while [60]fullerene serinol malonate and fullerol were also inhibitory but to a lesser extent. In consequence, our data show that water-soluble C₆₀ derivatives, negatively interfere with a mechanism which is at the basis of the allergy disorder, namely the activation of basophiles assayed under natural conditions.

1. INTRODUCTION

Fullerene the third allotrope of carbon is an all carbon cage-like molecule. The name « fullerene » was given to this family of molecules because of the geodesic domes designed and built by Buckminster Fuller (1,2). The name « Buckyball » or « Buckminsterfullerene » was given specifically to the [60]fullerene, the most stable member of this family of molecules and the most abundant in heated carbon ring derived soot (3). [60]fullerene molecule forms a very small nanostructure with 0.71 nm in diameter of high symmetry (icosahedral structure). Due to the stability and simplicity of [60]fullerene molecule compared to other fullerenes, most studies have focused on the properties of the latter leading to various applications (4), such as enzyme inhibition (5,6), cytoprotective (7), anti-apoptotic (8), anti-cancer (9-11), anti-microbial (12), anti-viral (13,14) and anti-oxidant activities (15-20). The fullerenes were also used as gene transfection vehicle and contrast agents for magnetic resonance imaging as well as in photodynamic and osteoporosis therapy (4,21).

Their biological *in vitro* applications are however restricted by their poor solubility in polar solvent and a trend to aggregate in aqueous solution. To circumvent this inconvenience, because of their 30 conjugated C-C double bonds, fullerenes can be chemically grafted with a wide variety of derivatives harboring different physicochemical and pharmacological properties (3,19, 22-27). One of the interesting characteristic of fullerenes is due to its unique cage structure conferring to the nanoparticle a potent free radical scavenger property (15-19,27,28). Free radicals can cause oxidative stress and tissue damage and are involved in inflammatory processes present in various diseases. Inflammation is a crucial component in asthma and allergic disorders (29,30) where mast cells in tissues and basophils in peripheral blood circulation are pivotal cellular elements. These cells bear on their surface allergen specific IgE bound to the high affinity receptor I (FcεRI) for IgE. The introduction of the allergens activates the cells which release in the environment several mediators of immune and inflammatory responses

such biogenic amines (histamine), enzymes (tryptase, chymase, β -hexosaminidase...), peptides, cytokines (IL-4, IL-6, TNF α , ...), chemokines, growth factors, eicosanoids and proteoglycans responsible for the observed symptoms (31). These mediators are able to induce inflammatory mechanism, particularly, TNF- α has been demonstrated to promote trans endothelial leukocyte migration by upregulation of vascular cell adhesion molecules (32,33). TNF- α also mediates ROS production and thus contributes to the imbalance in redox homeostasis of contributor cells. In this way, elimination of ROS and free radicals is one of the mechanism by which inflammation can be controlled (34).

Fullerenes were indeed shown to beneficially interfere with some *in vivo* inflammatory mechanisms which take place in animal models of ischemia (35), arthritis (36), multiple sclerosis (37), neurodegenerative diseases (38,39), ulcerative colitis (40) or atopic dermatitis (41). Even in allergy some reports showed a beneficial effect on isolated cells or *in vivo* (42).

To gain insight into the effect of fullerenes on the cells involved in allergy within their natural molecular and cellular human allergic environment [60]fullerenes as well as various derivatives were tested *ex vivo* for their ability to impact the blood basophil activation of peanut allergic patient. Viability, cell growth and mediator release of a rat mast cell line were also studied after *in vitro* treatment by fullerenes and the various derivatives fullerol, dendro[60]fullerene, [60]fullerene, serinol malonate and β -cyclodextrin[60]fullerene.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1- [60]fullerene and fullerenes derivatives

Forasmuch, as the very low solubility of [60]fullerene in biological environment, we used mono and poly functionalized water soluble fullerene derivatives. For this study, the [60]fullerene was solubilized in PBS using multidimensional grinder as described above and its purity was evaluated at 99.9% (43). [60]Fullerene-serinol-malonate (C60-ser) provided from Wilson LJ

(Rice University, Houston, Texas, USA), $(C_{66}(\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{OH})_2)_{12})$, with 6 functionalized groups which allowing its perfect solubilization in water, stable for several months, was also used (44). The mono adduct dendro[60]fullerene provided from Hirsch A (Erlangen-Nürnberg University, Germany) is also highly water soluble due to the presence of 18 carboxyl groups (24).and

(256)(256)(258)(257)(257)(256)(255)(254)(253)(252)(251)(250)(250)(250)(250)(249)(249)fullerol (poly-hydroxylated fullerene, $C_{60}(\text{OH})_n$) (Dade Carbon Nanotechnology Co, Suzhou, China) is a biocompatible water-soluble fullerene thanks to its abundant hydroxyl groups were used in these experiments. Moreover, β -cyclodextrin[60]fullerene (CD-fullerene) provided from Zhang Y (Paris, France) present a high solubility in water because of its β -cyclodextrin groups which permit its use in biology (45,46).

2.2- Cell cultures

The rat basophilic leukemia mast cell (RBL-2H3) cell lines (47) was a gift from Dr U. Blank (Inserm, Unité E-0225, faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris, France) had been used in this work. These cells were grown with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza Biosciences, Walkersville, USA) with 4.5 g/L glucose and L-glutamine with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) in non-pyrogenic 25-cm² culture flask (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany). Cell culture was performed in an oven at 37°C with 5% CO₂. The cells are cultured in medium which is changed every 3 days and they are divided twice a week using a trypsin-EDTA solution (solution 10x). All media and buffers used were sterile filtered using 0.2µm filter (Minisart, Sartorius Stedim, Goettingen, Germany). The cells macrophage-like cell line, RAW264.7 cells derived from Balb/c mice, were cultured in the same conditions as described above.

2.3- Cell viability using MTT reduction assay

Cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) according to Hansen et al, three replicate for each exposure concentration of fullerenes was examined (48). MTT dissolved in phosphate buffered saline, (PBS, pH=7.4) at concentration of 5 mg/mL and sterilized using a 0.2 μ m filter and stored at 4°C in the dark. In a first step, cells were plated in 96-well plate culture and incubated without or with fullerenes during 18h or 72h. Then, the supernatant replaced by fresh culture medium and cells were incubated with MTT (1 mg/mL, final concentration), for 4 hours in cell incubator. MTT formazan crystals, which appear on the surface of the cells, are observed under an optical microscope at different time intervals. The cells exhibiting the blue-violet formazan crystals considered as reactive cells. The formazan crystals were dissolved with 100 μ L of extraction buffer (sodium dodecyl sulfate and N, N-dimethyl-formamide). The absorbance was measured at 540 nm with ELISA plate apparatus (Multiskan, Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The percentage of living cells is determined: the average OD of the blank control wells without cells subtracted from the average OD of the wells containing cells. Results correspond to the mean values and standard deviation (SD) from at least three different experiments in triplicate (49).

2.4. β -hexosaminidase release assay

RBL-2H3 cell line has a robust degranulation in the presence of related-allergen (50). The cells routinely cultured (50,000 cells per well) as described above, in 96-well tissue culture plate (Maxisorb, Nunc, Roskilde, Denmark) and they attached to the surface after 2-3 hours. Cells passively sensitized with mouse ascites containing anti-dinitrophenyl (DNP) IgE (1/100 dilution) were incubated without or with fullerenes (18h at 37°C in 5% CO₂). The cell layer was then washed with PBS and Tyrode's buffer (20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 0.5 mg/mL BSA, 35%, at pH 7.4). The activation test

was then performed as described by Blanc et al (51). Briefly, RBL-2H3 cells were stimulated by adding DNP-HSA (500 ng/mL in Tyrode's buffer) for 45 min in cell incubator. The release of mediators was monitored using the β -hexosaminidase assay as described by Roa et al (52,53). Negative control cells received only Tyrode's buffer and total β -hexosaminidase (100% release) was obtained by adding 0.5% Triton X-100 in Tyrode's buffer on cells. The results are expressed as a percentage of the release of the enzyme minus the spontaneous release divided by the total release minus the spontaneous release. A preliminary study of release of β -hexosaminidase was performed with different allergen concentrations allows to choose the appropriate concentration. The activation test using an anti-IgE as a positive reference and a control of non-specific degranulation was performed in parallel.

2.5- Calcium ionophore assay

Non-IgE/Fc ϵ RI mediated stimulation was performed by using A23187 calcium ionophore ($C_{29}H_{37}N_3O_6$) for shuttling the calcium across the RBL-2H3 cell membrane directly, which allow to bypass the routine degranulation steps prior to the calcium influx and tracing the mechanism of the effects of fullerenes. One mg of calcium ionophore powder was dissolved in 2 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at $-20^{\circ}C$. The experiments were carried out at the final concentration of $4\mu M$.

2.6- Pollen and peanut allergic patients

The sera from patient allergic to grass and cypress pollen correspond to the residues of biological analysis laboratories for diagnosis of allergy and until their use; they kept at $-20^{\circ}C$. Peanut allergic patient (PAP) were selected based on a positive peanut extract assay using fluorescence enzyme immunoassay (ImmununoCAP[®], Thermo Fisher Scientific-Phadia, Villebon, France) using an immunoCAP 2500 apparatus, according to the manufacturer's recommendations with a detection limit set at 0.10 kU.L^{-1} (Tableau 1, Serum IgE). Basophil activation test (BAT) was performed on bloods from the PAPs and peanut extract was used as allergenic source to study

the basophil degranulation (51). An informed consent was obtained, at the time of the visit of patient to allergy clinic in agreement with institutional board review of pneumology-allergology department.

2.7- Peanut and pollen extracts

Fifty mg of delipidated peanut (*Arachis hypogaea*) flour were extracted with 500 μ L of PBS using a multidimensional grinder FastPrep 24 (MP-Biomedicals, Illkirch, France) for 40 sec at 6 m/sec using matrix C (1 mm diameter silica beads) in 2 mL tubes (54). After centrifugation, (18,000 g at 4°C, 20 min) supernatants were recovered and the protein concentration was about 40 mg/mL for peanut extract. Pollen *Dactylis glomerata* and *Cupressus sempervirens* extracts were performed according to (55,56) respectively.

2-8- Basophil activation test (BAT)

Ex vivo activation of basophils from PAP was performed by flow cytometry-based BAT (prototype reagents, Beckman Coulter, Marseille, France). EDTA anti-coagulated whole blood was incubated without or with fullerenes during 1 hour at 37°C. Then mixed with Duraclone reagents (57), activation buffer, peanut extract and further incubated at 37°C for 15 min. Only one optimal concentration (20 ng/mL) of peanut extract, prepared in activation solution, was used. After incubation, red blood cells were lysed using OptiLyse C lysis solution containing 1.5% formaldehyde and further analyzed on a 13-color Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, USA). Basophils were gated as CD45⁺, CD3⁻, low SS, CRTH2⁺ cells and activation level was characterized by monitoring the expression of CD203c and CD63. Positive control were performed to an anti-IgE stimulation to verify the ability of basophils to be activated *ex vivo*. Percentages of basophil expressing CD203c and/or CD63 activation markers are standardized according to peanut extract activation without fullerene (100% activation) subtracted with negative control (no allergen, 0% activation).

2.9. SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting

Proteins were separated in unreduced conditions in one-dimensional gel electrophoresis (1-DE) SDS-PAGE in 8-18% gradient polyacrylamide gel (ExcelGel, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) on a flat-bed electrophoretic chamber (Multiphor II, GE Healthcare) at 12°C. Molecular mass (Mr) markers (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) ranging from 14.4 to 94 kDa were used as comparative references. Separated proteins were then either electro-transferred onto a 0.2 µm cyanogen bromide activated nitrocellulose (NCa) membrane (Opti-tran®BA-S 83, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) for immunoblotting assays or silver stained for protein detection. To analyze the effect of [60]fullerene on IgE or IgG reactivity against allergens or antigens from pollen extracts, the immunoblotting was performed as described in Shahali et al (56) in absence and presence of different concentrations of fullerene (0, 2, 10 and 50 µg/mL). Briefly, NCa membrane cut in 2.5 mm wide strips for SDS-PAGE 1-DE screening were incubated with either individual serum from grass pollen allergic patients (1:10 dilution) or a pool of cypress pollen (40µL of each serum from 15 cypress pollen allergic patients) allergic patient sera (dilutions 1:10 for IgE and 1:50 for IgG). Incubation was performed *i*: in presence of fullerene (simultaneous) or *ii*: first incubation with fullerene (1h) and after the pool of sera was added (sequential). Then after, alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE or anti-human IgG specific antibodies (Sigma-Aldrich) diluted 1:700 and 1:20,000 respectively, were incubated 2-hours (56). For each immunoblot analysis, no serum (PBS) and a serum from a healthy individual (non-atopic and non-allergic) used as negative control without or with fullerene.

3. RESULTS

3.1- Fullerenes do not modify allergens and do not interfere with allergen-IgE binding

Since the aim of the study was the impact of fullerenes on allergic sensitization, the very first step was to evaluate the potential interaction of fullerenes with allergenic sources. No effect on proteins extracted in presence of fullerenes from two well-known and potent pollen allergenic sources, orchard and cypress, were observed, neither on the yield nor on physico-chemical modifications (relative molecular masses or isoelectric points) (data not shown). As well, fullerenes had no major effect on the IgE/allergens or IgG/antigens binding since no competitive inhibition was observed in western blot experiments using cypress pollen proteins and human sera from cypress allergic patients (figure 1). The same results were obtained with grass pollen allergens and grass allergic patients (data not shown).

3.2- Toxicity of fullerene is derivative- and cell line-dependent.

Since no impact was observed at molecular level, the potential effect of fullerenes was studied at cellular level. A pretreatment up to 72 h of RBL-2H3, a rat mast cell line (Figure 2, a and b) or RAW 264.7, a mouse macrophage cell line (Figure 2, c and d), with varying concentrations of fullerol, C₆₀-serinol or [60]fullerene up to 10,000 nM did not demonstrate any significant changes in cell numbers or viability (Figure 2, b and d). High concentrations of CD fullerene (between 1,000 and 10,000 nM) were toxic for both cell types after 18h of treatment (Figure 2, a and c). and RAW 264.7 was more sensitive to high concentrations of dendro[60]fullerene than RBL-2H3 cells which are not affected by the presence of this fullerene derivative at the concentration of 1,000 nM. These results suggest that the toxicity of derivatives is dependant of the cell type and that in our culture conditions an overnight treatment is sufficient to assess the toxicity of the various derivatives.

3.3- Inhibition of IgE dependent and independent activation of RBL 2H3 is derivative-dependent

We next investigated the effects of fullerenes on IgE-dependent mediator release from stimulated RBL-2H3. The cells were sensitized for 18 h with anti-DNP IgE in the absence or presence of varying concentrations of fullerenes, then activated with DNP-HSA (Figure 3 a). Fullerenes alone, with no IgE and no DNP-HSA, did not induce cell β -hexosaminidase release. However, when cells were incubated with fullerenes before activation with optimal concentration of DNP-HSA, there was a significant inhibition of degranulation as compared with cells incubated without fullerenes. Fullerol and dendro[60]fullerene inhibits the IgE dependent degranulation with an optimal inhibition of 45 % and 25 %, respectively (Figure 3 a). For [60]fullerene, C₆₀-serinol and CD fullerene a weak inhibition (between 5 to 10%) was observed with high concentrations (100 to 10,000 nM) (Figure 3 a). For CD fullerene, the decrease in degranulation observed may be due to the toxicity of this molecule at concentration of 1000nM (Figure 2, a-b).

Inhibitions of β -hexosaminidase release were also observed with a non-IgE-mediated stimulation using calcium ionophore A23187 (Figure 3 b). Although the profiles of curves are either bell-shape with dendro[60]fullerene, C₆₀-serinol and fullerol or bimodal with [60]fullerene the dendro[60]fullerene and fullerol exhibited a higher inhibitory effect, 25 to 15 %, respectively, than C₆₀-serinol (13%), CD fullerene (3%) and [60]fullerene (10%) (Figure 3 b). For dendro[60]fullerene the percentages of inhibition are similar for the 2 types of degranulation studied, IgE-dependent and non IgE dependent activation (Figure 3 a).

3.4. Inhibition of IgE dependent activation of human basophile is patient- and derivative-dependent

To assess the effects of fullerenes in an experimental design where cells are close to physiological conditions, i.e. with all cells and molecules from total blood, basophils from allergic patients were *ex vivo* activated with allergen source (P1-4) or anti-IgE (P5).

Cellular activation was evaluated by flow cytometry by monitoring the expression of the marker CD63 and the over expression of CD203c exclusively on basophiles gated as CD45⁺, CD3⁻, low SSC, CRTH2⁺ and CD203c⁺ cells. Percentages of activated basophils with no inhibitors are shown in table 1. Despite differences in peanut specific serum IgE contents, all allergic patients (P1-4) are able to degranulate in presence of peanut extract as assessed by the expression of CD63 and CD203c in the optimized BAT used (table 1).

Inhibition of basophile activation was evaluated after 1 h pre-incubation of whole blood with fullerenes derivatives or [60]fullerene at varying concentrations, followed by the addition of an optimal concentration of peanut extract as allergen source (P1-4) or anti-IgE (P5).

Percent inhibition are depicted in figure 4 a-j. Basophils from patient 1 (Figure 4 a-b) showed about 25% inhibition of expression level of CD63 and CD203c with dendro[60]fullerene and the inhibition level obtained with fullerol was weaker (about 18% for CD63 and 8% for CD203c). Patient 2 (Figure 4 c-d) was studied with CD fullerene and C₆₀-ser and showed an inhibition of both activation markers expression comprised between 15 to 35 %. Basophils from patients 3 and 4 (Figure 4, e-h) studied with fullerol, showed an inhibition of CD203c and CD63 expression levels comprised between 12 to 28%. Non-derivatized [60]fullerene tested on basophils from patient 3 (Figure 4, e-f) was inhibitory in the same range (about 25%). Basophils from patient 4, studied with 3 fullerene derivatives and [60]fullerene (Figure 4, g-h), showed an inhibition of CD203c expression levels about 20% for the 4 molecules while CD63 expression was inhibited only by dendro[60]fullerene in the same 20% range. In contrast to bell shape inhibition curves mainly obtained for P1-4, P5's basophiles activation was dose dependently inhibited by fullerol to a maximum of 20% at 10 μ M (Figure 4, i-j).

Although significant overall inhibitions could be observed, no general inhibitory patterns can be distinguished likely to be due to a variability depending on the patients as well as the fullerene derivatives.

4. DISCUSSION

The anti-oxidative property of fullerene is an hallmark of these nanoparticles that classifies them in a category of non-dangerous if not beneficial molecules to treat inflammatory disorders where ROS are produced in excess. Allergy is an inflammation related immune dysregulation where oedema, cell infiltration or increased Th17 responses are reported.

In order to evaluate whether fullerenes can interfere with the mechanisms of allergy we have first analysed their effect at a molecular level, i.e. on the binding of IgE to allergens. In unpublished data we observed that proteins extracted in presence of [60]fullerene from allergenic source were not modified and therefore fullerenes should be considered differently as compared to pollutants such as diesel exhaust particles or pollutants gas. Then, in binding assays, no significant interactions were observed, neither on IgE-allergen nor on IgG-antigen binding. These results are in agreement with what was previously reported using poly hydroxy C₆₀ and N-ethyl-polyamino C₆₀ (42). *In vitro* as well as *in vivo* experiments very often make usage of derivatized fullerenes because the pristine nanoparticles are not soluble in aqueous solvents. We have, herein, compared different derivatives engrafted with four different polar functional groups previously reported to give hydrosoluble properties to the [60]fullerene and tested them, at a cellular level, on two types of allergy-related cells, a mast-cell related cell line (RBL-2H3) and basophiles from allergic patients. Preliminary experiments were performed to evaluate cytotoxicity of the various derivatives and we found that the β -cyclo-dextrine, conventionally used in pharmaceutic, cosmetic or food processing, confer a toxicity to the [60]fullerene at high concentrations when incubated with the cell lines RBL-2H3 and RAW264.7.

The *in vitro* cultured mast cell line RBL-2H3 is well-known to release mediator upon an IgE- and a non IgE-dependent activation. We observed that fullerenes and more specifically

fullerol and the mono-adduct dendro[60]fullerene could inhibit the IgE-dependent and IgE independent mediator release. The effect is likely to be due to the nanoparticles itself since the dendro[60]fullerene is a mono-adduct derivative resulting in a barely modified nanoparticle more accessible for a better efficiency in quenching superoxide (19).

The second type of allergy-related cells are basophiles from allergic patients and their functionality was studied with a BAT. BAT is more and more used to evaluate the ability of patient's basophiles to be activated and release mediators when challenged with allergens. We used a leveraged protocol with a simplified workflow where CD63 and CD203c, two markers of mediator release, were analyzed by cytofluorometry on gated basophiles in their natural environment, i.e. with all molecules and cells present in whole blood. In these conditions, we observed that these cells, pre-incubated for 1 hour with dendro[60]fullerene, [60]fullerene serinol malonate and fullerol, expressed lower level of CD203c and CD63 as compared with non-treated cells upon a subsequent FcεRI mediated activation. Inhibition effect is more important in mono adduct fullerene derivatives such as dendro[60]fullerene, thus confirming what was found with RBL-2H3 cells. These results strongly suggest that the mechanism of inhibition of mediator release in the rat mast cell line and the patient's basophiles proceeds through an intracellular signaling pathway but is not due to the inhibition of IgE-Ag binding nor IgE-FcεRI receptor binding. For basophils from allergic patients, maximum inhibition effect was observed (up to 32%) in nanomolar range decreasing when concentrations increased. This may be due to a concentration-dependent fullerene aggregation, a phenomenon known to abolish its antioxidant or free radical scavenger activity.

Indeed, in optimal conditions, fullerene can behave as both acceptor and donor of electron in chemical reactions with the capacity to accept at least 6 electrons and/or nucleophiles (58,59). During cellular activation ROS are produced in mitochondria and is accompanied by a calcium mobilisation from endoplasmic reticulum in consequence of FcεRI cross-linking. Calcium is

absolutely required for degranulation although it is still not clear whether elevated ROS level parallels degranulation or is a consequence of FcεRI crosslinking (60-64). Given that, on one side, ROS and calcium are produced in endoplasmic reticulum and mitochondria (65,66) and on the other side, that the majority of fullerene localize in the endoplasmic reticulum, mitochondria and lysosome (67-70) the mechanism of inhibition that we observed can be explained by a targeted intracellular sub-compartment overlap. Similar effects of [70] fullerenes were also reported on human skin mast cells (42,68).

Although we showed that the inhibition profile of fullerene varied according to the derivatives and the cells or the patients, the dendro[60]fullerene gave consistent inhibition results. Preliminary experiments performed on purified human basophiles, i.e. deprived of other cells present in plasma, gave similar results, suggesting a direct effect of fullerenes on FcεRI-dependent cell mediator release (unpublished data). In fact fullerenes are considered as stable particles but their bio application *in vitro* or even *ex vivo* requires very special care at level of purity, solubility or aggregation in function of the various cells, medium or culture conditions in which they are studied. These parameters may affect the kinetic and amount of fullerenes uptake as well as the proportion of functionally intact and soluble nanoparticles (67, 69-73).

In summary we pointed out that the dendro [60] fullerene is the main hydrosoluble derivative fullerene able to inhibit the mediator release from allergy-related cells, especially basophiles in natural conditions. Further experiments are needed to study the specificity of the inhibition and decipher the precise mechanism. Mediator release is a complex process involving calcium influx, tyrosine phosphorylation, transcription factors or fusion proteins induction, all crucial points to further analyze.

5. References

1. Fuller RB, Ward J. The artifacts of R. Buckminster Fuller: a comprehensive collection of his designs and drawings. In: Garland, editor.; 1985. p. 276.

2. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C60 : Buckminsterfullerene. *Nature* 1985;318:162-163.
3. Hirsch A. The chemistry of the fullerenes *Chem Fullerenes* 2008: 1-203.
4. Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI. Biological Application of Fullerene. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1996;4(6):767-779.
5. Friedman SH, DeCamp DL, Sijbesma RP, Srdanov G, Wudl F, Kenyon GL. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc*: 1993;115:6506-6509.
6. Schergna S, Da Ros T, Linda P, Ebert C, Gardossi L, Prato M. Enzymatic modification of fullerene derivatives. *Tetrahedron Lett* 1998;39:7791-7794.
7. Beuerle F, Witte P, Hartnagel U, Lebovitz R, Parng C, Hirsch A. Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models. *J Exp Nanosci* 2007;2:147-170.
8. Hu Z, Guan W, Wang W, Huang L, Xing H, Zhu Z. Synthesis of beta-alanine C60 derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Cell Biol Int* 2007;31(8):798-804.
9. Guan M, Ge J, Wu J, Zhang G, Chen D, Zhang W, et al. Fullerene/photosensitizer nanovesicles as highly efficient and clearable phototheranostics with enhanced tumor accumulation for cancer therapy. *Biomaterials* 2016;103:75-85.
10. Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol* 2007;568(1-3):89-98.
11. Zakharian TY, Seryshev A, Sitharaman B, Gilbert BE, Knight V, Wilson LJ. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: Synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture. *J Am Chem Soc* 2005;127:12508-12509.
12. Da Ros T, Prato M, Novello F, Maggini M, Banfi E. Easy Access to Water-Soluble Fullerene Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azomethine Ylides to C(60). *J Org Chem* 1996;61(25):9070-9072.
13. Tegos GP, Demidova TN, Arcila-Lopez D, Lee H, Wharton T, Gali H, et al. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem Biol* 2005;12(10):1127-1135.
14. Zarubaev VV, Belousova IM, Kiselev OI, Piotrovsky LB, Anfimov PM, Krisko TC, et al. Photodynamic inactivation of influenza virus with fullerene C60 suspension in allantoic fluid. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2007;4(1):31-35.
15. Ali SS, Hardt JI, Quick KL, Kim-Han JS, Erlanger BF, Huang TT, et al. A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic Biol Med* 2004;37(8):1191-1202.
16. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 1996;3(2):129-135.
17. Enes RF, Tome AC, Cavaleiro JA, Amorati R, Fumo MG, Pedulli GF, et al. Synthesis and antioxidant activity of [60]fullerene-BHT conjugates. *Chemistry* 2006;12(17):4646-4653.

18. Sun T, Xu Z. Radical scavenging activities of alpha-alanine C60 adduct. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16(14):3731-3734.
19. Witte P, Beuerle F, Hartnagel U, Lebovitz R, Savouchkina A, Sali S, et al. Water solubility, antioxidant activity and cytochrome C binding of four families of exohedral adducts of C60 and C70. *Org Biomol Chem* 2007;5(22):3599-3613.
20. Yang J, Alemany LB, Driver J, Hartgerink JD, Barron AR. Fullerene-derivatized amino acids: synthesis, characterization, antioxidant properties, and solid-phase peptide synthesis. *Chemistry* 2007;13(9):2530-2545.
21. Cataldo F, Da Ros T. Twenty years of promises: Fullerene in Medicinal chemistry. In: Cataldo F, Da Ros T, editors. *Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes*: Springer; 2008. p. 1-23.
22. Semenov KN, Charykov NA, Keskinov VN. Fullerenol synthesis and identification. properties of the fullerenol water solutions. *J Chem Eng Data* 2011;56 230-239.
23. Nakamura E, Isobe H. Functionalized fullerenes in water. The first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience. *Acc Chem Res* 2003;36(11):807-815.
24. Brettreich M, Hirsch A. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett* 1998;39:2731-2734.
25. Wang HM, Wenz G. Molecular solubilization of fullerene C60 in water by γ -cyclodextrin thioethers. *Beilstein J Org Chem* 2012;8:1644-1651.
26. Jiang G, Yin F, Duan J, Li G. Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene - glycine derivatives as new materials for cancer therapy. *J Mater Sci: Mater Med* 2015;26:24.
27. Yang J, Alemany LB, Driver J, Hartgerink JD, Barron AR. Fullerene-derivatized amino acids: Synthesis, characterization, antioxidant properties, and solid-phase peptide synthesis. *Chem - A Eur J* 2007;13:2530-2545.
28. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, C60(OH)24. *Nitric Oxide* 2004;11(2):201-207.
29. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454(7203):445-454.
30. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;104(8):985-993.
31. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6(2):135-142.
32. Barten DM, Ruddle NH. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1994;51(2):123-133.
33. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58(2):138-152.

34. Dekhuijzen PN, van Beurden WJ. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1(2):99-106.
35. Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(1):R21-26.
36. Dellinger AL, Cunin P, Lee D, Kung AL, Brooks DB, Zhou Z, et al. Inhibition of inflammatory arthritis using fullerene nanomaterials. *PLoS One* 2015;10(4):e0126290.
37. Schuhmann MK, Fluri F. Effects of Fullerenols on Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 2017;18(8).
38. Sun Y, Qian Z, Wei G. The inhibitory mechanism of a fullerene derivative against amyloid-beta peptide aggregation: an atomistic simulation study. *Phys Chem Chem Phys* 2016;18(18):12582-12591.
39. Cunha S, Amaral MH, Lobo JM, Silva AC. Therapeutic Strategies for Alzheimer's and Parkinson's Diseases by Means of Drug Delivery Systems. *Curr Med Chem* 2016;23(31):3618-3631.
40. Byelinska IV, Kuznietsova HM, Dziubenko NV, Lynchak OV, Rybalchenko TV, Prylutsky YI, et al. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018;93:505-517.
41. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyschnikov O, et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology* 2016;14:8.
42. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W, et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol* 2007;179(1):665-672.
43. Keykhosravi S, Rietveld IB, Couto D, Tamarit J, Barrio M, Céolin R, Moussa F. Purity assessment of [60]fullerene samples. *ACS Omega*; Submitted.
44. Raoof M, Mackeyev M, Cheney MA, Wilson LJ, Curley SA. Internalization of C60 fullerenes into cancer cells with accumulation in the nucleus via the nuclear pore complex. *Biomaterials* 2012;33:2952-2960.
45. Yang J, Wang Y, Rassat A, Zhang Y, Sinaÿ P. Synthesis of novel highly water-soluble 2:1 cyclodextrin/fullerene conjugates involving the secondary rim of β -cyclodextrin. *Tetrahedron Lett* 2004;60:12163-12168.
46. Yang J, Wang K, Driver J, Barron AR. The use of fullerene substituted phenylalanine amino acid as a passport for peptides through cell membranes. *Org Biomol Chem* 2007;5(2):260-266.
47. Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* 1981;11(4):317-323.
48. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119(2):203-210.
49. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011;731:237-245.

50. Naal RM, Tabb J, Holowka D, Baird B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. *Biosens Bioelectron* 2004;20(4):791-796.
51. Blanc F, Adel-Patient K, Drumare MF, Paty E, Wal JM, Bernard H. Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors. *Clin Exp Allergy* 2009;39(8):1277-1285.
52. Roa M, Paumet F, Le Mao J, David B, Blank U. Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilonRI). *J Immunol* 1997;159(6):2815-2823.
53. Pelletier C, Varin-Blank N, Rivera J, Iannascoli B, Marchand F, David B, et al. Fc epsilonRI-mediated induction of TNF-alpha gene expression in the RBL-2H3 mast cell line: regulation by a novel NF-kappaB-like nuclear binding complex. *J Immunol* 1998;161(9):4768-4776.
54. Tiotiu A, Brazdova A, Longe C, Gallet P, Morisset M, Leduc V, et al. *Urtica dioica* pollen allergy: Clinical, biological, and allergomics analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016;117(5):527-534.
55. Guerin-Marchand C, Senechal H, Bouin AP, Leduc-Brodard V, Taudou G, Weyer A, et al. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol Immunol* 1996;33(9):797-806.
56. Shahali Y, Sutra JP, Haddad I, Vinh J, Guilloux L, Peltre G, et al. Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2012;33(3):462-469.
57. Senechal H, Keykhosravi S, Couderc R, Selva MA, Shahali Y, Aizawa T, et al. Pollen/Fruit Syndrome: Clinical Relevance of the Cypress Pollen Allergenic Gibberellin-Regulated Protein. *Allergy Asthma Immunol Res* 2019;11(1):143-151.
58. Yanilkin VV, Gubskaya VP, Morozov VI, Nastapova NV, Zverev VV, Brednikov EA, et al. Electrochemistry of fullerenes and their derivatives. *Russ J Electrochem* 2003;39:1147-1165.
59. Haddon RC, Brus LE, Raghavachari K. Electronic structure and bonding in icosahedral C60. *Chem Phys Lett* 1986;125:459-464.
60. Hide M, Beaven MA. Calcium influx in a rat mast cell (RBL-2H3) line. Use of multivalent metal ions to define its characteristics and role in exocytosis. *J Biol Chem* 1991;266(23):15221-15229.
61. Suzuki Y, Yoshimaru T, Matsui T, Inoue T, Niide O, Nunomura S, et al. Fc epsilon RI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *J Immunol* 2003;171(11):6119-6127.
62. Oka T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Fc epsilon RI cross-linking-induced actin assembly mediates calcium signalling in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol* 2002;136(6):837-846.
63. Yoshimaru T, Suzuki Y, Matsui T, Yamashita K, Ochiai T, Yamaki M, et al. Blockade of superoxide generation prevents high-affinity immunoglobulin E receptor-mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils. *Clin Exp Allergy* 2002;32(4):612-618.
64. Swindle EJ, Metcalfe DD. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev* 2018;217:186-205.

65. Sly LM, Kalesnikoff J, Lam V, Wong D, Song C, Omeis S, et al. IgE-induced mast cell survival requires the prolonged generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 2008;181(6):3850-3860.
66. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:1197-1218.
67. Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W, et al. Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp Dermatol* 2007;16(5):429-436.
68. Dellinger A, Zhou Z, Norton SK, Lenk R, Conrad D, Kepley CL. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine* 2010;6(4):575-582.
69. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(1):116-119.
70. Fumelli C, Marconi A, Salvioli S, Straface E, Malorni W, Offidani AM, et al. Carboxyfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 2000;115(5):835-841.
71. Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M. Uptake of C60 by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater* 2006;2(4):409-419.
72. Russ KA, Elvati P, Parsonage TL, Dews A, Jarvis JA, Ray M, et al. C60 fullerene localization and membrane interactions in RAW 264.7 immortalized mouse macrophages. *Nanoscale* 2016;8(7):4134-4144.
73. Salonen E, Lin S, Reid ML, Allegood M, Wang X, Rao AM, et al. Real-time translocation of fullerene reveals cell contraction. *Small* 2008;4(11):1986-1992.

Patient number	Gender	Serum IgE*		BAT†			
		Total	Peanut	Peanut		Anti-IgE	
				CD63	CD203c	CD63	CD203c
P1	F	1445	337	81.4	65.7	66.7	45.1
P2	M	1931	12	87.3	74.1	84.5	67.7
P3	F	874	355	87.2	81.3	87.4	85.9
P4	M	925	329	81.6	66.1	53.7	30.1
P5	M	89	0	ND	ND	70.6	80.7

*: ImmunoCap results in kU/L

† : Basophile Activation Test in % expressing cells

ND: not done

Table 1: Clinical data of the 5 patients tested in the BAT. Serum IgE are evaluated using the standard diagnostic method ImmunoCap® and are expressed in kU/L. BAT is performed as described in Materials and Methods section and is presented in percent of cells expressing the cell surface markers CD63 and CD203c without inhibitors.

Figure 1

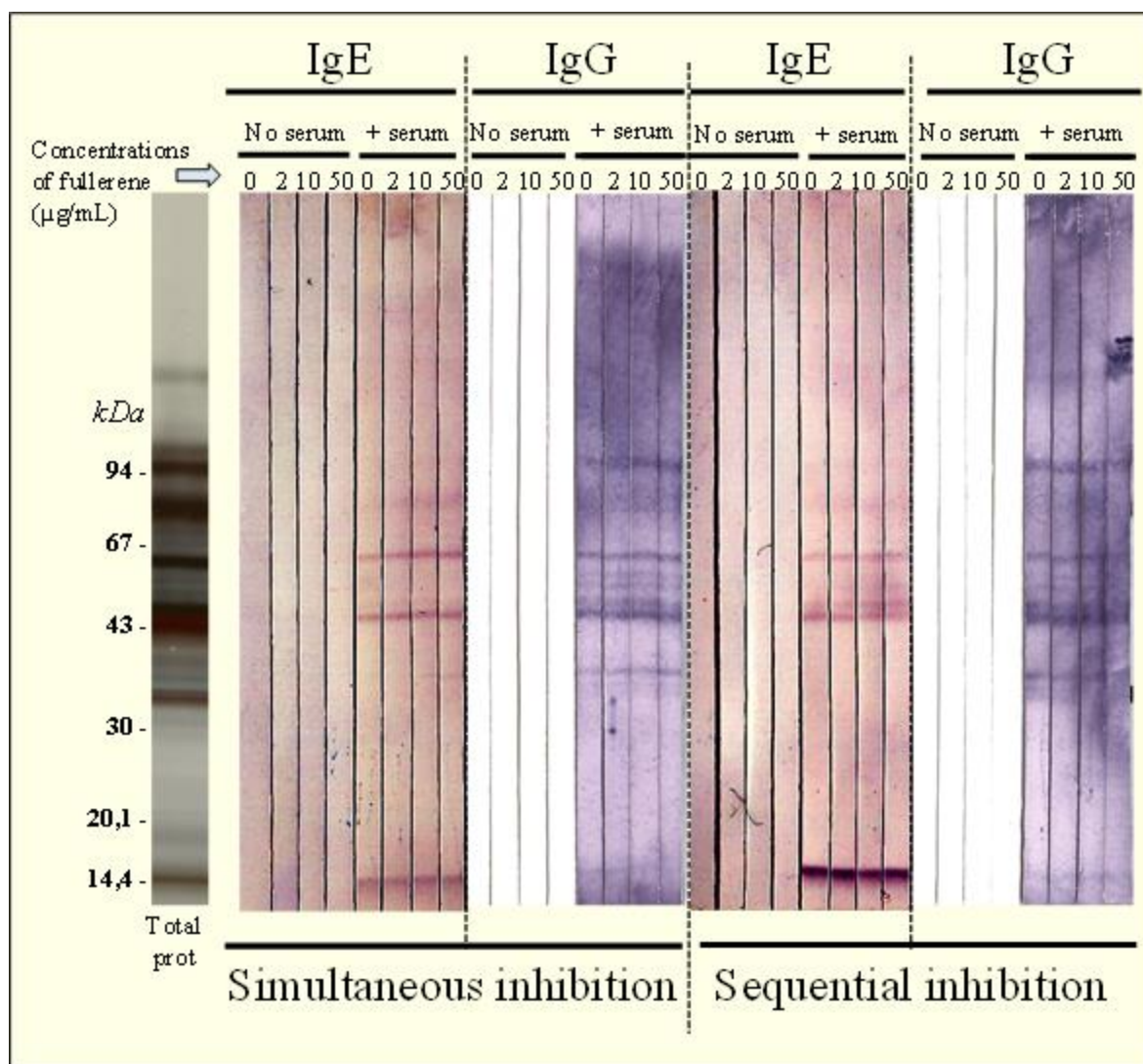


Figure 1: Impact of fullerene on the reactivity of IgE or IgG against *Cupressus sempervirens* pollen proteins with 2 types of inhibition, either (A) simultaneous or (B) sequential. Proteins from cypress pollen extract separated by SDS-PAGE 1-DE electrophoresis and then an electro-transfer was performed on nitrocellulose activated by cyanogen bromide (NCA). Each strip incubated without or with cypress allergic patient pool sera in absence or presence of different concentrations (0, 2, 10 and 50 µg/mL) of C60fullerene (simultaneous) or first incubation with fullerene (1h) and after the pool sera was added (sequential). On the left, total proteins from cypress pollen extract were silver stained. Molecular masses are indicated in kDa.

Figure 2

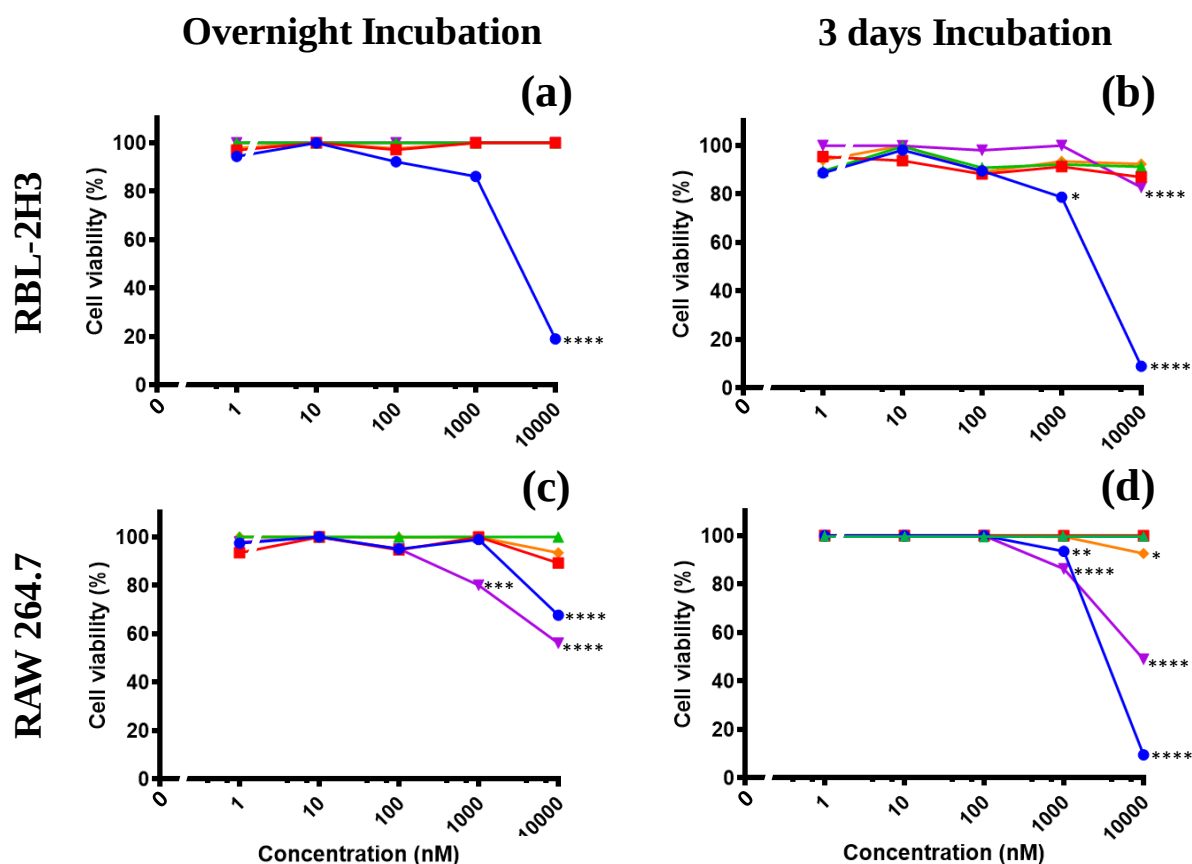


Figure 2:

The impact of fullerenes on cell viability of RBL-2H3 cell line (a, b) and RAW 264,7 cell line (c, d) with varying concentrations of CD-fullerene ●, fullerol ■, C₆₀-ser ▲, dendro[60]fullerene ▼ and C₆₀ ◆ during 18h (a, c) or 72h (b, d) incubation.

Figure 3

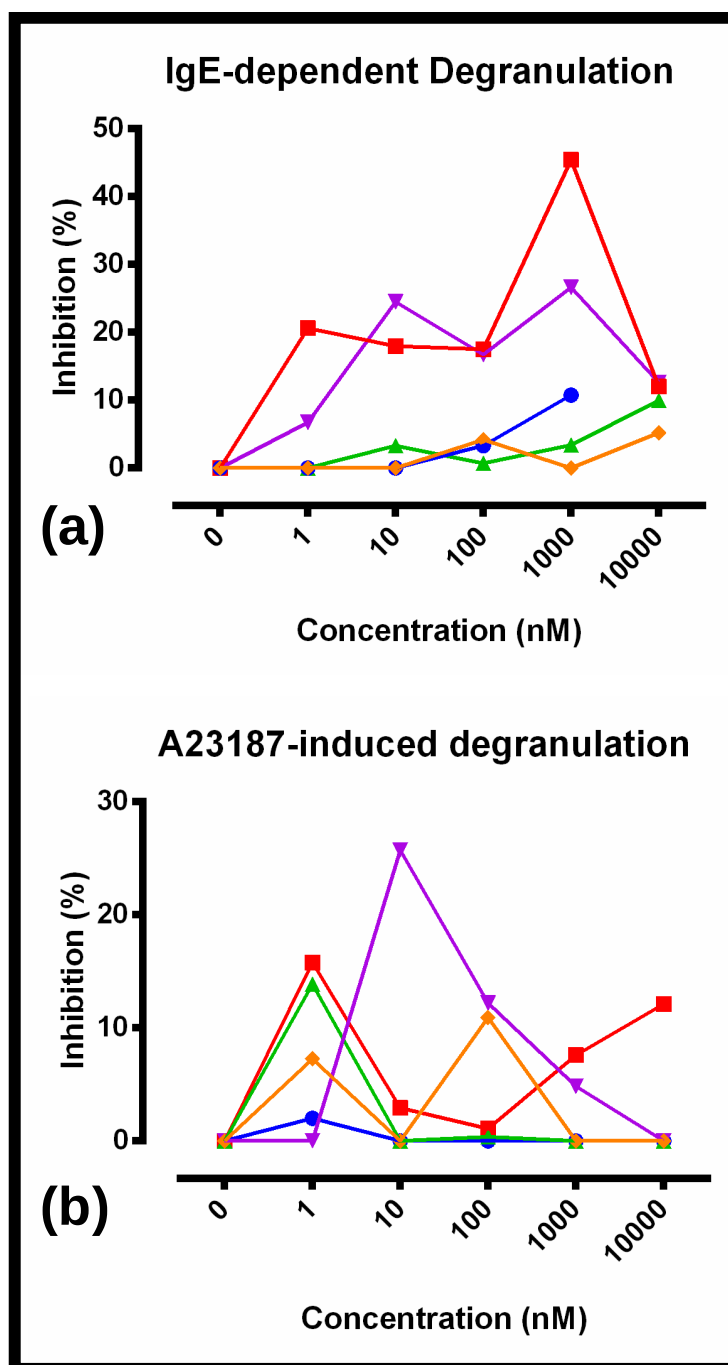
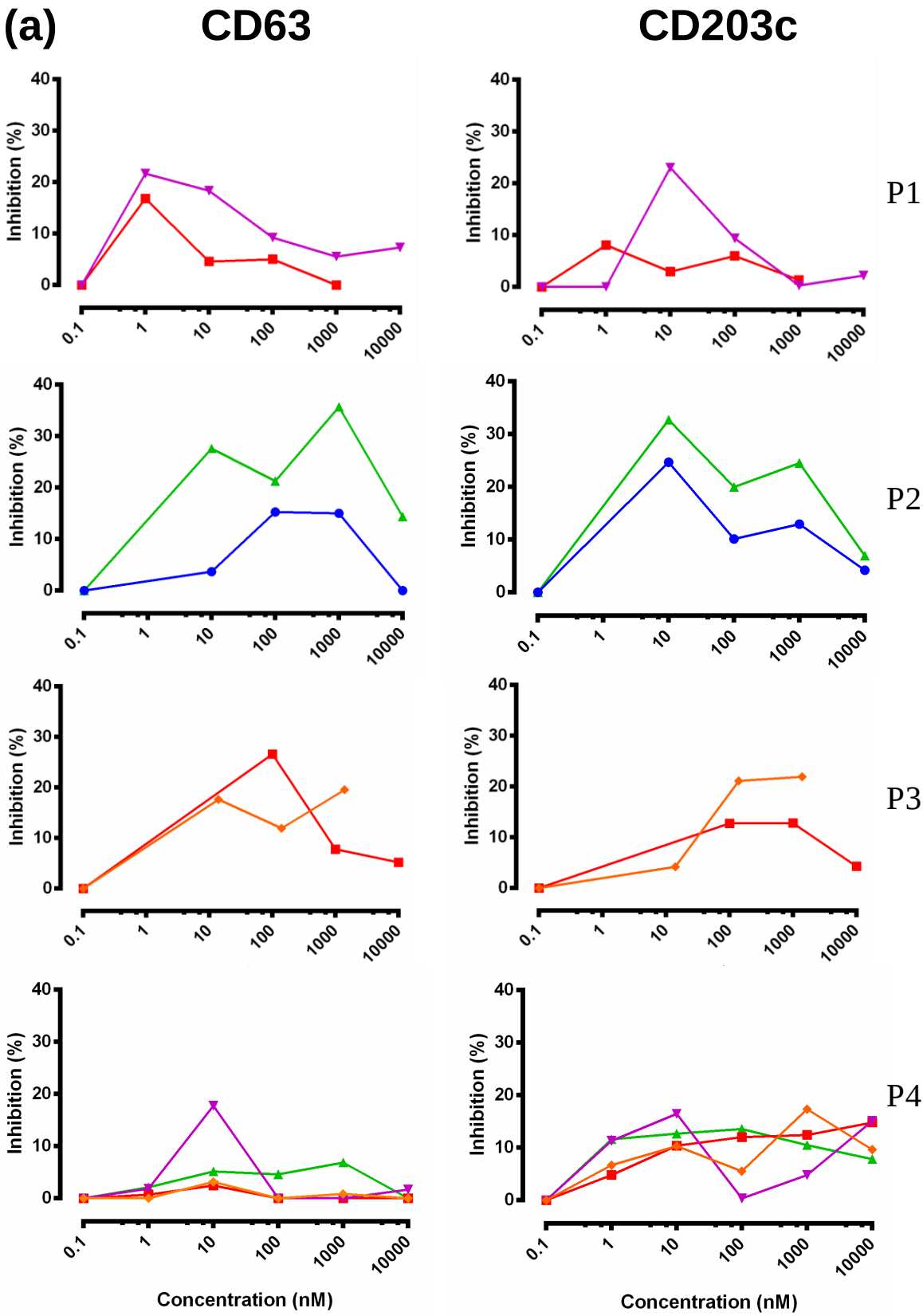


Figure 3: The impact of fullerenes on degranulation of RBL-2H3 cell line (a,b). The cells pre-incubated with varying concentrations of CD-fullerene ●, fullerol ■, C₆₀-ser ▲, dendro[60]fullerene ▼ and C₆₀ ◆ for 18h and then stimulated by DNP-HSA (a) or stimulated directly by A23187 calcium inophore (b).



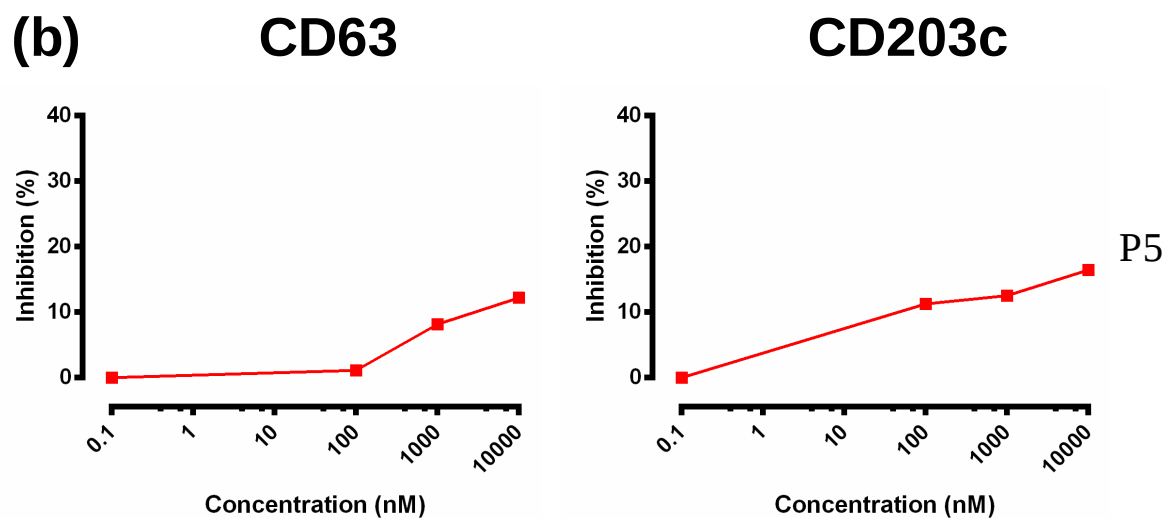


Figure 4:

Fullerenes effect on *ex vivo* activation of patient's basophils. Whole blood was incubated with various concentrations of CD-fullerene , fullerol , C₆₀-ser , dendro[60]fullerene  and C₆₀  for 1h and then activated by peanut extract for peanut allergic patients (a) and by anti-IgE for non-peanut allergic patient (b).

Effet du [60]fullérène et de ses dérivés sur la dégranulation de basophiles humains purifiés et sur des cellules dendritiques humaines purifiées provenant de donneurs non allergiques

En collaboration avec le **Dr Jagadeesh Bayry et Anupama Karnam** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR S 1138, Paris,

Expériences complémentaires sur des basophiles humains purifiés

Ces travaux ont été menés **en collaboration avec Jagadeesh Bayry et Anupama Karnam** (Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR S 1138, Paris, F-75006, France).

Ils ont été réalisés sur des basophiles humains purifiés d'individus non allergiques

- Isolement des basophiles humains en circulation d'individus non-allergiques

Les poches de sang de 6 donneurs en bonne santé non-allergiques, ont été obtenus auprès l'établissement Français du Sang, de l'hôpital de l'Hôtel Dieu, (Paris). L'autorisation du comité d'éthique a été obtenue pour l'utilisation de ces poches de sang de donneurs en bonne santé. La fraction de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) riche en basophiles a été obtenue par centrifugation sur gradient de densité en Percoll (Sigma-Aldrich). Les basophiles contenus dans cette fraction PBMC riche en basophiles ont été isolés soit en utilisant le kit d'isolation des basophiles II (Miltenyi Biotech, Paris, France), soit avec le kit d'enrichissement des basophiles humains EasySep (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). Les basophiles sont cultivés dans un milieu X-Vivo contenant 5% de sérum humain et de l'IL3 (100 ng/10⁶ cells) est ajouté dans le milieu pour maintenir la viabilité des cellules (1).

Conditions expérimentales pour la dégranulation des basophiles: Les basophiles purifiés sont incubés avec différentes concentrations de [60]fullérène et 3 de ses dérivés, le C60-serinol, le dendro[60]fullérène et le fullerol. L'activation des basophiles est faite en présence d'anti-IgE. L'analyse de la libération des médiateurs a été faite en cytométrie en flux en suivant les marqueurs de l'activation CD63, CD203c, CD107a et CD69. L'expression de CD69 a été utilisée comme marqueur d'activation précoce et les CD203c et CD107a comme marqueurs de dégranulation. Le CD63 est associé aux granules internes des basophiles avec une expression de surface induite

Résultats

Etude du CD63 des basophiles de 6 donneurs incubés avec différents fullérènes

Basophiles du donneur 1 incubés avec le [60]fullérène (bleu) et le dendro[60]fullérène (vert)

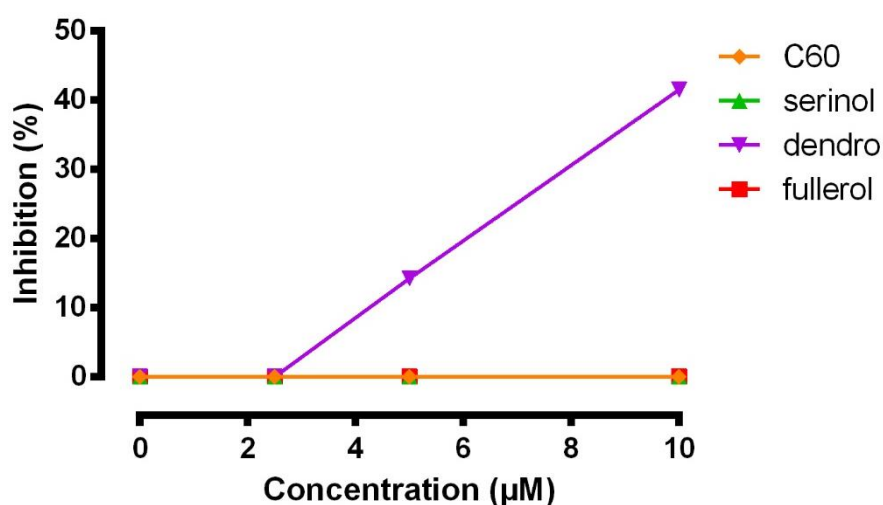


Figure 1 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 1 suivi du marqueur CD63

Le dendro[60]fullérène inhibe à 50 % la dégranulation des basophiles de façon doses dépendante alors que pour le [60]fullérène aucune inhibition n'est observée.

Basophiles du donneur 2 incubés avec le [60]fullérène (bleu), le dendro[60]fullérène (vert), le C60 serinol (rouge) et le fullérol (violet)

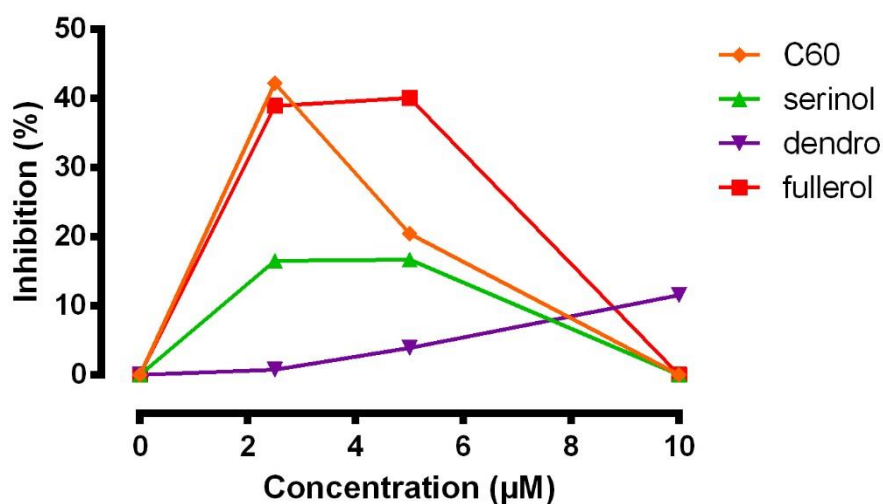


Figure 2 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 2 suivi du marqueur CD63

Chapitre IV

La dégranulation des basophiles du donneur 2 est inhibée à environ 40% par le [60]fullérène et par le fullérol. Le C60 serinol inhibe à 20 %. Le dendro[60]fullérène inhibe à 10 % la dégranulation des basophiles de façon doses dépendante.

Basophiles du donneur 3 incubés avec le [60]fullérène (bleu), le dendro[60]fullérène (vert), le C60 serinol (rouge) et le fullérol (violet)

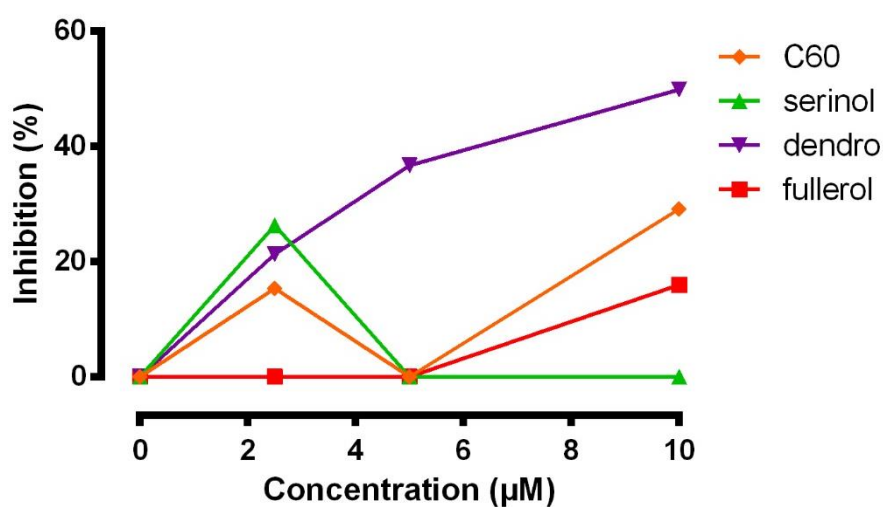


Figure 3 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 3 suivi du marqueur CD63

La dégranulation des basophiles du donneur 3 est inhibée à environ 18% par le [60]fullérène et le fullérol. Le C60serinol inhibe à 30%. Le dendro[60]fullérène inhibe à 50 % la dégranulation des basophiles de façon doses dépendante.

Basophiles du donneur 4 incubés avec le [60]fullérène (bleu), le dendro[60]fullérène (vert), le C60 serinol (rouge) et le fullérol (violet)

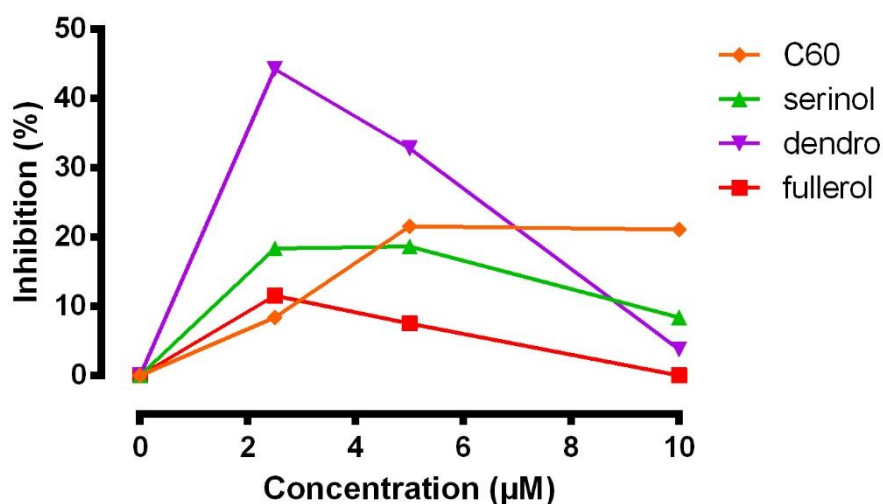


Figure 4: Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 4 suivi du marqueur CD63

Le dendro[60]fullérène inhibe à 50 % la dégranulation des basophiles à une concentration optimale 2 μM . La dégranulation des basophiles du donneur 4 est inhibée à environ 20% par le [60]fullérène de façon doses dépendante. La dégranulation est inhibée à environ 18% par le C60 serinol et le fullérol inhibe à environ 10%.

Basophiles du donneur 5 incubés avec le [60]fullérène (bleu), le dendro[60]fullérène (vert), et le C60 serinol (rouge)

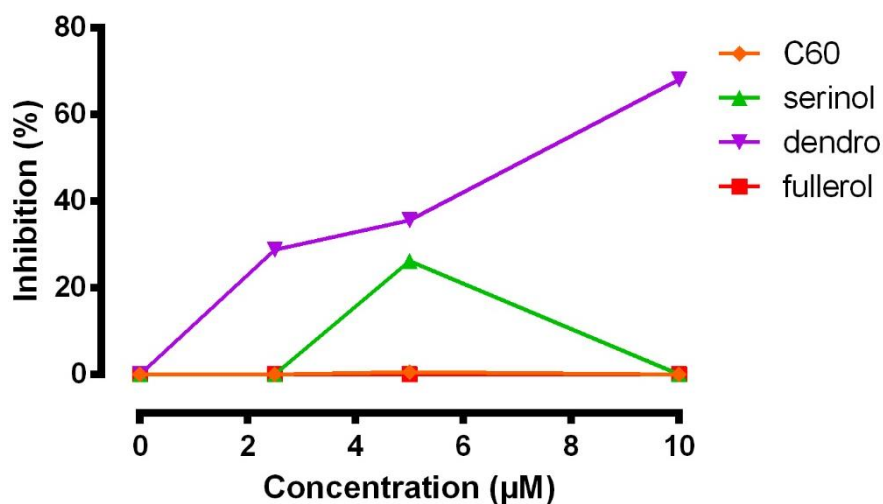


Figure 5 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 5 suivi du marqueur CD63

Le dendro[60]fullérène inhibe à 70 % la dégranulation des basophiles de façon doses dépendante. La dégranulation est inhibée à environ 25% par le C60 serinol à une concentration optimale de 5 μ M alors que pour le [60]fullérène aucune inhibition n'est observée.

Basophiles du donneur 6 incubés avec le [60]fullérène (bleu), le dendro[60]fullérène (vert), le C60 serinol (rouge) et le fullérol (violet)

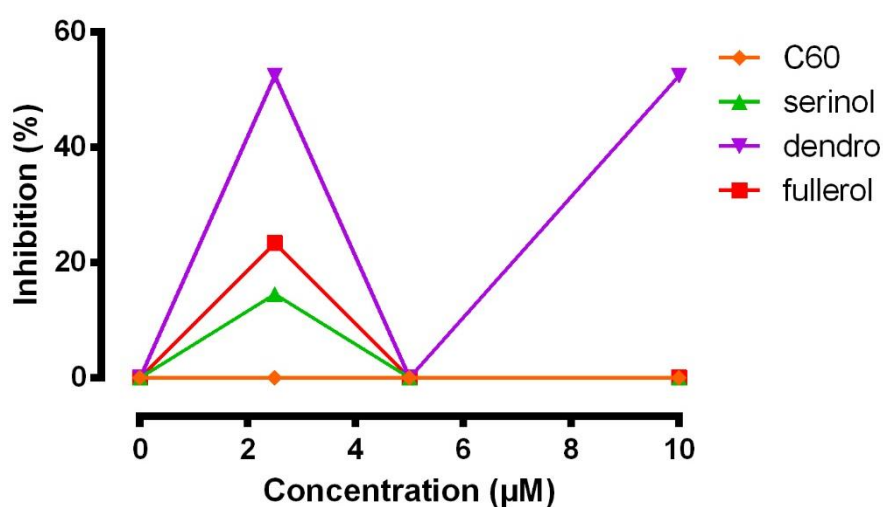


Figure 6 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés du donneur 6 suivi du marqueur CD63

Le dendro[60]fullérène inhibe à 50 % la dégranulation des basophiles, le C60 serinol et le fullérol inhibent entre 16 et 22 % avec une concentration optimale de 2,5 μ M. Pour le [60]fullérène aucune inhibition n'est observée

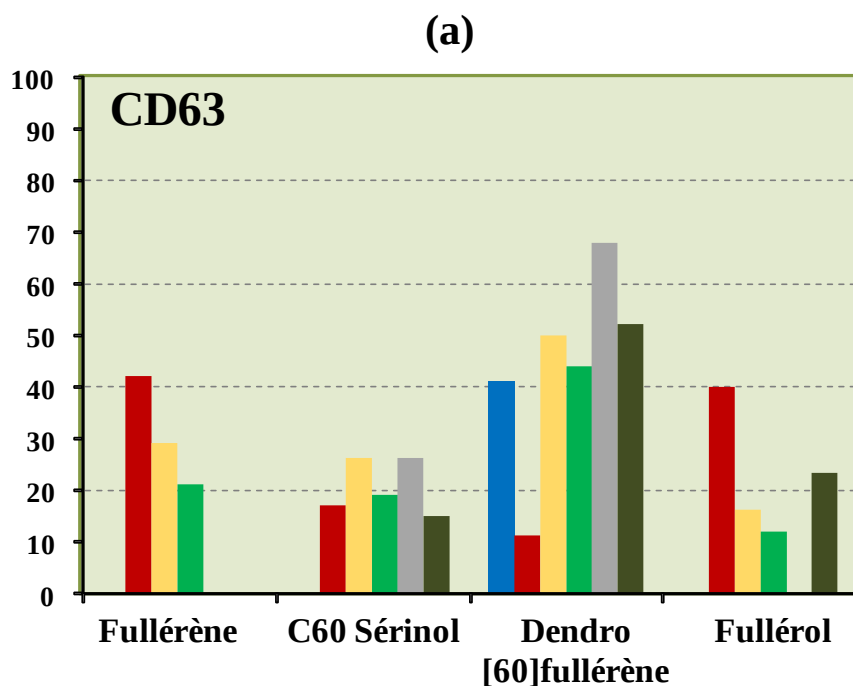
Etude du CD107a des basophiles de 6 donneurs incubés avec différents fullerènes

Les résultats des inhibitions, par le [60]fullérène et les 3 dérivés, de la dégranulation des basophiles des 6 donneurs obtenus avec le CD107a sont proches de ceux obtenus avec le CD63 (Tableau 1).

Tableau 1 : Pourcentage d'inhibition de la dégranulation des basophiles purifiés de 6 donneurs en présence du fullérène et 3 de ses dérivés en suivant 2 marqueurs de surface CD63 et CD107a

Patients	P1	P2	P3	P4	P5	P6
[60]fullérène						
CD63	0	42	29	21	0	0
CD107a	28	18	26	28	15	27
C60 serinol						
CD63	0	17	26	19	26	15
CD107a	8	14	42	29	32	46
dendro[60]fullérène						
CD63	41	11	50	44	68	52
CD107a	47	35	70	85	71	54
fullérol						
CD63	0	40	16	12	0	23
CD107a	13	26	30	47	21	23

Comparaison des inhibitions de la dégranulation des basophiles des 6 donneurs par le dendro[60]fullérène avec le marqueur CD63, CD107a et CD69 :



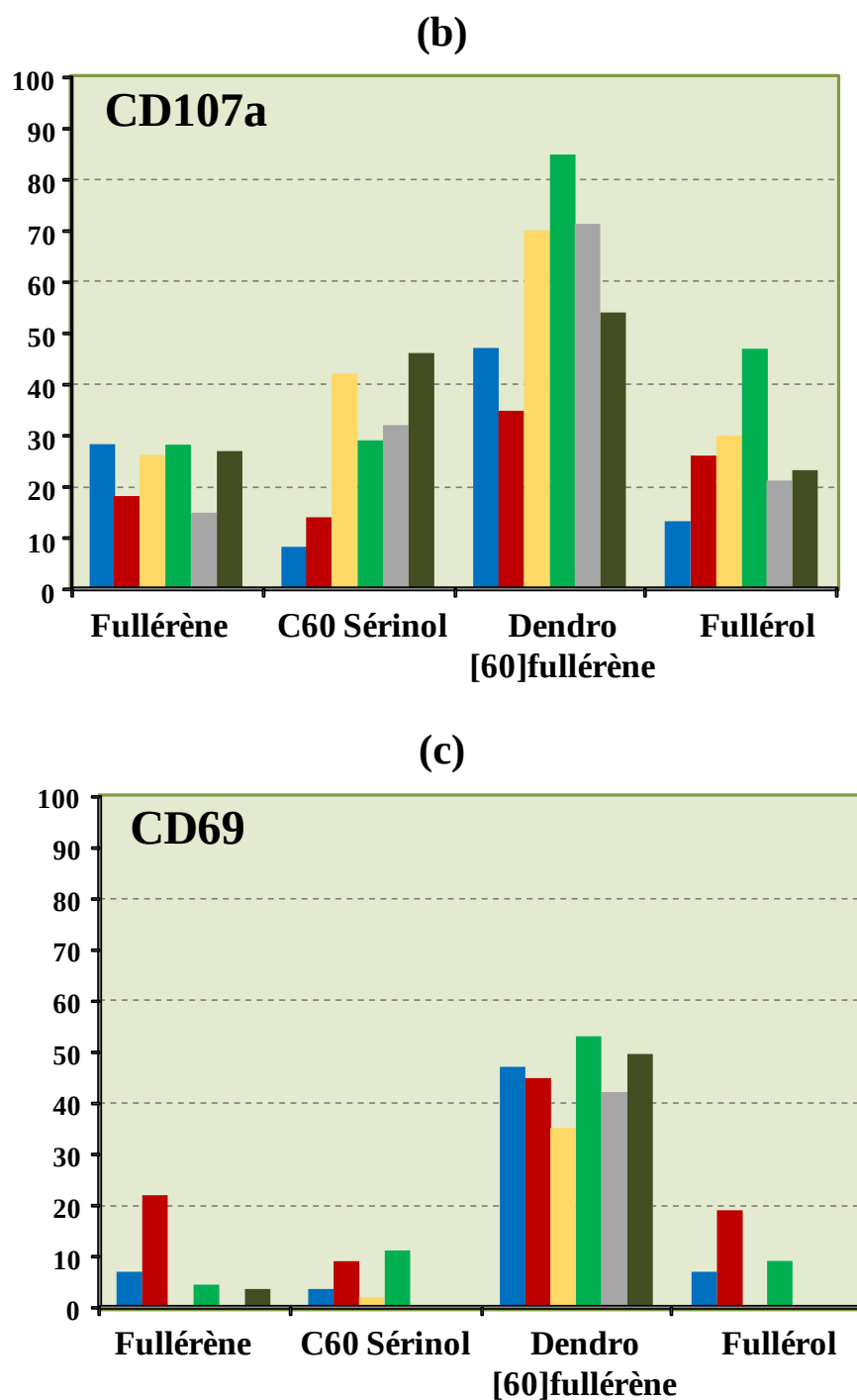


Figure 9 : Pourcentage d'inhibition maximum de la dégranulation des basophiles purifiés des 6 donneurs suivi des marqueurs (a) CD63, (b) CD107a et (c) CD69.

Chapitre IV

Les résultats (CD63 et CD107a) de l'inhibition avec le dendro[60]fullérène sur la dégranulation des basophiles des 6 donneurs sont résumés dans les 2 figures ci-dessus car ce dérivé du fullérène inhibe le plus fortement la dégranulation des basophiles humains. Ce dérivé inhibe la dégranulation de 47 à 85 % pour la majorité des donneurs sauf pour le donneur 2 pour lequel l'inhibition est plus faible.

Le dendro[60]fullérène inhibe au maximum à 25 % la dégranulation de basophiles de patients allergiques à l'arachide alors que le C60 sérinol inhibe à 35 % la dégranulation de basophiles d'un autre patient allergique (2). Mais ces 2 dérivés du fullérène inhibent tous les deux la dégranulation des basophiles de patients allergiques et de patient non-allergiques.

Expériences complémentaires sur le phénotype des cellules dendritiques (DC) humaines purifiées d'individus non-allergiques

- Isolement des DC humaines d'individus non-allergiques à partir des monocytes

A partir des poches de sang de 6 donneurs en bonne santé non-allergiques utilisées pour la purification des basophiles, les monocytes ont été isolés à partir des PBMC en utilisant les CD14-microbilles magnétiques (Miltenyi Biotec). Les monocytes ont été cultivés dans du GMCSF (1000 IU/106 cells) et de l'IL-4 (500 IU/106 cells) (Miltenyi Biotec) pendant 5 à 6 jours afin de générer les DC (1). Les marqueurs de surface CD80 et 86 (co-stimulation), CD69 (stimulation) et HLA-DR (histocompatibilité) ont été suivis par cytométrie en flux.

Le fullérène et ses dérivés ont été testé directement sur ces cellules, dans un premier temps, sans activation pendant 48h après l'addition des fullérènes. Aucun effet des fullérènes n'a été observé sur le phénotype de ces cellules en suivant les marqueurs de surface CD80 et 86 (co-stimulation), CD69 (stimulation) et HLA-DR (histocompatibilité).

Ensuite, les DC ont été stimulés avec du LPS (1ng/mL), pour étudier la maturation et le signal d'activation, pendant 1 h et les fullérènes sont ajoutés. Ces cellules sont maintenues en culture pendant 48h et testées ensuite sur l'effet des fullérènes sur le phénotype de ces cellules en suivant les marqueurs décrits ci-dessus. Aucun effet sur le phénotype des DC par les fullérènes n'a été observé.

Références

1. Sharma M, Hegde P, Aimanianda V, Beau R, Maddur MS, Senechal H, et al. Circulating human basophils lack the features of professional antigen presenting cells. *Sci Rep* 2013; 3:1188.
2. Keykhosravi S, Sénéchal H, Arif R, Busnel JM, Zhang Y, Alter M, et al. Fullerenes inhibit ex vivo activation of peanut allergic patient's basophil. Submitted 2019.

***Effet des dérivés du fullerène sur la dégranulation
de cellules d'une lignée de mastocytes (RBL SX38)
ayant le récepteur humain aux IgE***

En collaboration avec la Dr Karine Adel-Patient et Sandrine Ah-Leung

UR496 Immuno-Allergie alimentaire, INRA, CEA de Saclay

Expériences complémentaires sur une lignée de cellules mastocytaires de l'allergie

Effet des dérivés du fullerène sur la dégranulation des cellules RBL SX38

Ces travaux ont été menés en collaboration avec Karine Adel-Patient et Sandrine Ah-Leung (UR496 Immuno-Allergie alimentaire, INRA, CEA de Saclay) et ont été réalisés sur des cellules d'une lignée mastocytaire de rat transfectées avec les chaînes α , β , et γ du récepteur humain de haute affinité pour les IgE, Fc ϵ RI, lignée RBL SX-38. Cette lignée cellulaire a été fournie par J-P. Kinet et M-H. Jouvin (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Ces cellules ont été transfectées à partir de cellules de la lignée RBL-2H3 utilisée dans les travaux présentés dans l'article précédent.

Modèle de dégranulation de la réaction allergique de cellules RBL SX38

Les conditions de culture des cellules de cette lignée sont identiques à celles de la lignée RBL-2H3 non transfectées décrites précédemment (1). Des cellules (J2) ont été mises en plaque 96 puits et leur sensibilisation a été faite par addition de sérum de patients allergiques (1UI/puits) soit à l'arachide soit aux protéines de lait. L'incubation a été faite pendant 24h (J3). La dégranulation a été faite par l'ajout des activateurs : soit d'extrait protéique spécifique (lait ou arachide), soit des allergènes purifiés ou de l'anti-IgE pendant 45min. La mesure de la dégranulation se fait par la mesure de l'activité de la β -hexosaminidase libérée dans le surnageant de culture. La dégranulation maximale est obtenue par ajout de triton et la dégranulation de référence est celle induite par l'anti-IgE.

Les tests de l'effet de différents composés de la famille des dérivés du fullerène sur le déclenchement de la réaction allergique ont été menés avec le [60]fullerene serinol malonate (C₆₀-

ser), la β -cyclodextrin[60]fullerene et le fullérol. Un contrôle de dégranulation non spécifique ou toxicité des composés est réalisé en parallèle.

1. **Dégranulation non spécifique** potentiellement induite par les dérivés du fullerène

Conditions expérimentales : addition des dérivés du fullérène au moment de la sensibilisation, sans addition ni de sérum ni d'activateur avec une gamme de concentration des fullerènes de 100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01 – 0,001 - 0 μ M. L'analyse de la libération des médiateurs a été faite au J3

Dans ce cas aucune libération non spécifique de β -hexosaminidase n'est détectable (résultats non montré). Comme pour les cellules RBL-2H3 les dérivés des fullérènes seuls ne font pas dégranuler les cellules.

2. **Addition des fullerènes au moment de la sensibilisation des cellules**

2.1. **Dégranulation de référence induit par l'anti-IgE (Le27)**

Dans cette expérience un sérum de patient allergique à l'arachide (#AD) et les mêmes concentrations des dérivés du fullerène que celles utilisées précédemment ont été utilisés sur les cellules en plaques de culture (ajout des Fullerènes en solution 10X dilué avec le sérum). Après incubation et lavage, les activateurs, anti-IgE (Le27) ou extrait d'arachide à une concentration fixe ont été ajoutés. Cette concentration a été au préalable déterminée comme induisant une dégranulation importante mais pas maximale avec le sérum testé.

Résultats

L'addition de trois dérivés, le fullérol, le CD-fullerene (cyclodextrin) et le C₆₀-ser au moment de la sensibilisation des cellules diminue la dégranulation induite par l'anti-IgE (Le27) (Figure 1). L'effet inhibiteur est inférieur à 20% pour les trois dérivés. L'effet inhibiteur observé

par le β -CD fullerène varie d'une concentration à l'autre mais présente en générale une inhibition en augmentant la concentration. L'inhibition par le fullérol est plus reproductible dans une gamme de concentration de 0,001 à 1 μ M et ça diminue à partir d'un seuil de concentration, mais le fullerène serinol malonate (FSM) a un effet inhibiteur entre 0,01 et 0,1 μ M, ce qui présente une courbe en cloche avec une maximum d'inhibition à 10 μ M.

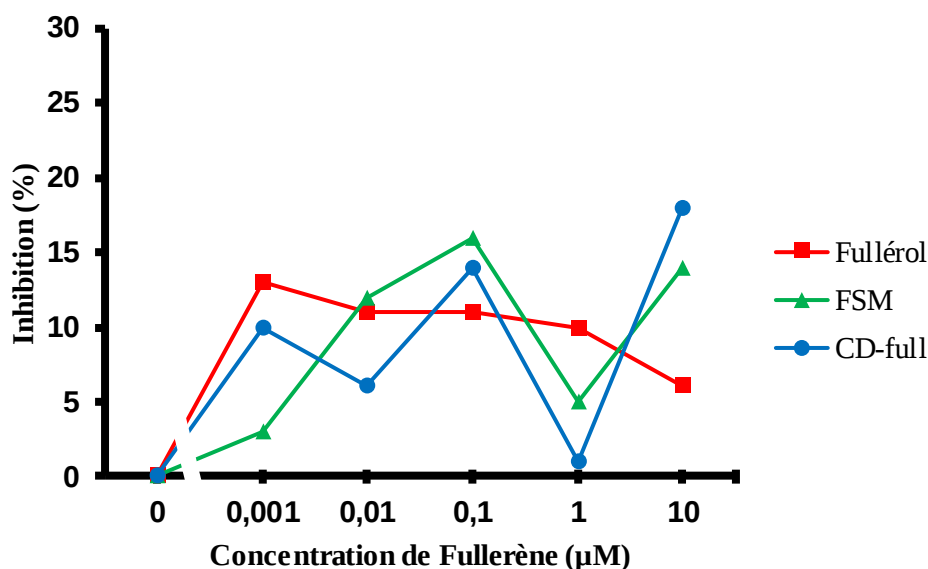


Figure 1 : Effet de l'addition de concentrations croissantes des dérivés du fullérène (0 à 10 μ M) sur la dégranulation induite par l'anti-IgE (Le27)

2.2. Dégranulation spécifique induit par l'extrait d'arachide

Les résultats obtenus sur l'effet des dérivés du fullérènes sur la dégranulation spécifique, induite par l'extrait d'arachide (Figure 2) sont plus importants à ceux obtenus pour la dégranulation de référence induite par l'anti-IgE. L'effet inhibiteur arrive à 25% pour le β -CD fullerène. L'effet inhibiteur observé par le β -CD fullerène a moins de variation et plus reproductible sauf pour la concentration à 0,01 μ M. L'inhibition par le fullérol est toujours reproductible et plus important à ceux obtenus par la dégranulation induit par l'anti-IgE. L'inhibition observé pour le fullerène serinol malonate (FSM) a un effet inhibiteur entre 0,001 et 0,1 μ M, et présente toujours une courbe en cloche avec une inhibition importante à 10 μ M (Figure 2).

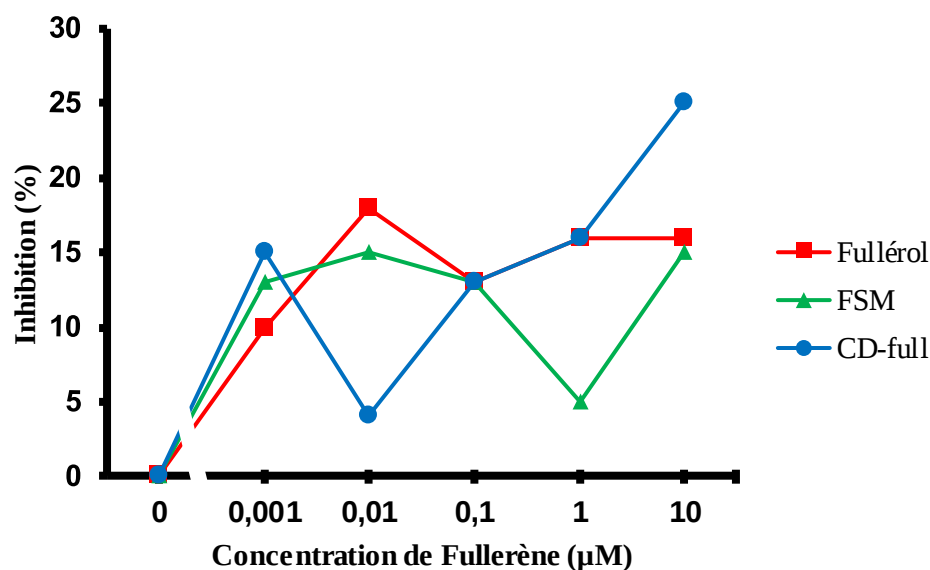


Figure 2 : Effet de l'addition de concentrations croissantes des dérivés du fullerène (0 à 10µM) sur la dégranulation induite par l'extrait protéique d'arachide (AB)

3. Addition des fullerènes au moment de la sensibilisation des cellules : al-

lergies à l'arachide et au lait de vache

Pour confirmer ces résultats une deuxième série d'expériences en utilisant d'abord le même sérum de patient allergique à l'arachide et ensuite une seconde expérience a été réalisée avec un pool de sérums de patients allergique au lait de vache. Les conditions expérimentales sont identiques à celles précédemment utilisées avec une gamme de dérivés du fullerène plus resserrée (le pas des dilutions est de 4) et une analyse des dégranulations de référence et spécifiques induites par l'arachide ou par le lait de vache dans les 2 cas.

Résultats

3.1. Dégranulation de référence induit par l'anti-IgE

Les résultats obtenus sur l'effet des dérivés du fullerènes sur la **dégranulation de référence**, induite par l'anti-IgE (Figures 3 et 4) montrent que l'ajout du dérivé CD-fullerène au moment de la sensibilisation des cellules diminue la dégranulation spécifique induite par l'anti-IgE quelque que soit le sérum testé, sérum de patient allergique à l'arachide (Figure 3) ou pool

de sérums de patients allergiques au lait de vache (Figure 4). Cette inhibition est reproductible sur les deux sérums étudiés. L'effet préalablement observé pour le fullérol et pour le FSM, dans la précédente expérience (Figure 1), est reproduit mais l'inhibition est plus important.

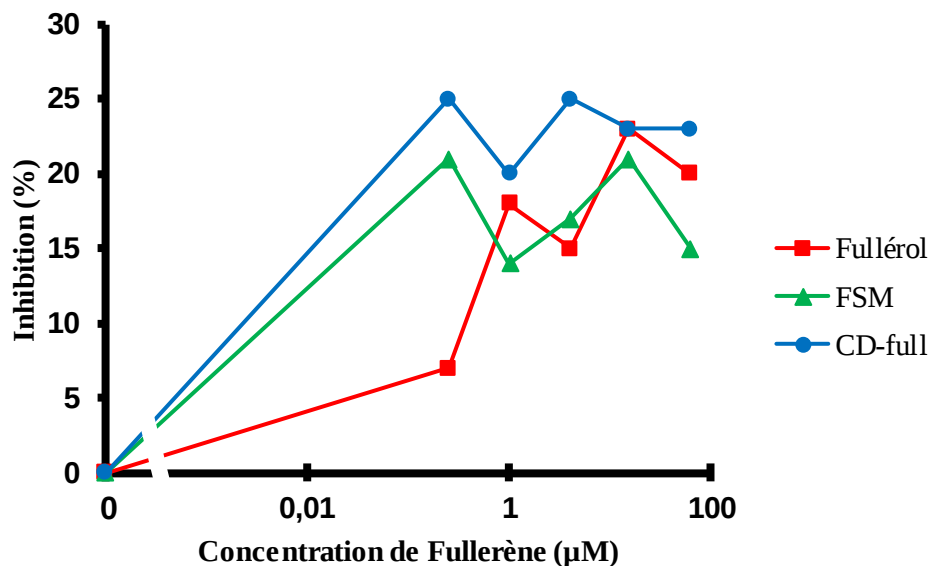


Figure 3 : Effet de l'addition de concentrations variables des dérivés du fullérène (0 à 100µM) au moment de la sensibilisation des cellules par un sérum de patient allergique à l'arachide sur la dégranulation induite par l'anti-IgE (Le27)

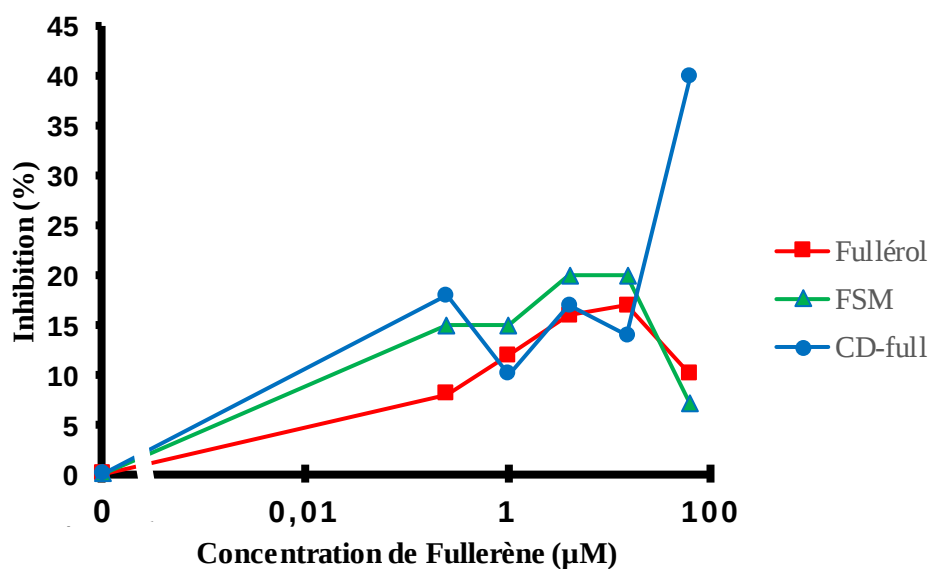


Figure 4 : Effet de l'addition de concentrations variables des dérivés du fullérène (0 à 100µM) au moment de la sensibilisation des cellules par un pool de sérums de patients allergiques au lait de vache sur la dégranulation induite par l'anti-IgE (Le27)

3.2. Dégranulation spécifique induite par l'extrait d'arachide/le lait de vache

Les résultats obtenus sur l'effet des dérivés du fullérène sur la **dégranulation spécifique** induite par l'extrait d'arachide (Figure 5) ou par le lait de vache (Figure 6) montrent que les courbes d'inhibition sont des courbes en cloches avec un maximum d'inhibition. L'effet préalablement observé avec le fullerol est reproduit. L'inhibition observée avec un sérum de patients allergiques au lait est modeste (inférieur à 12%). Le fullérol inhibe la dégranulation avec une maximum d'inhibition à 12% en présentant une courbe en cloche (Figure 6).

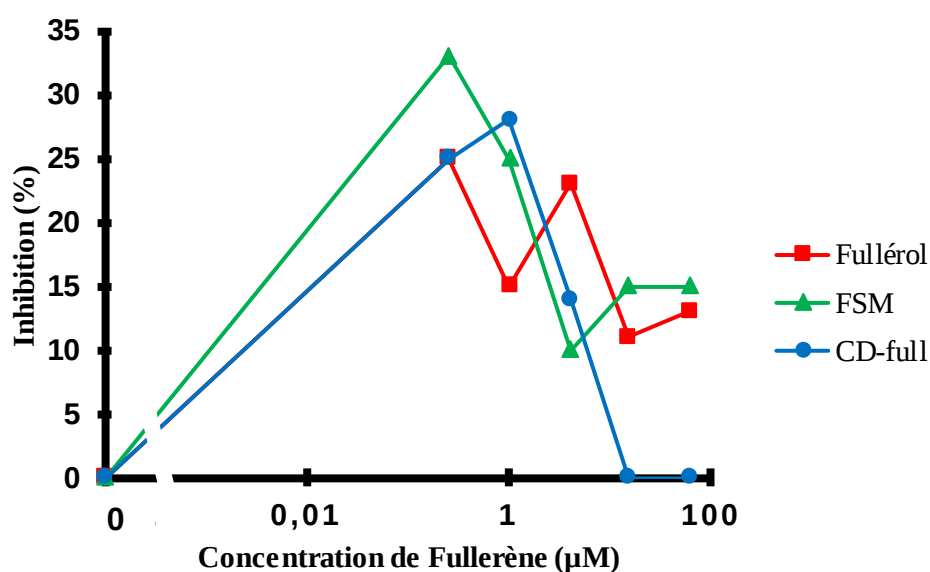


Figure 5 : Effet de l'addition de concentrations variables de dérivés de fullérène (0 à 100µM) au moment de la sensibilisation des cellules par un sérum de patient allergique à l'arachide sur la dégranulation induite par un extrait protéique d'arachide.

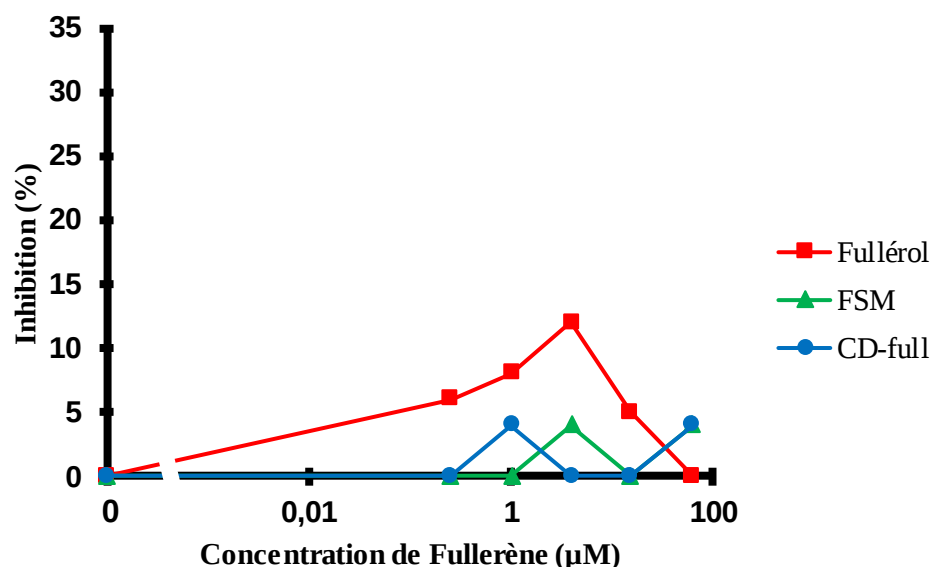


Figure 6 : Effet de l'addition de concentrations variables de dérivés de fullerène (0 à 100µM) au moment de la sensibilisation des cellules par un pool de sérums de patients allergiques au lait de vache sur la dégranulation induite par un extrait protéique de lait de vache.

4. Addition des dérivés du fullerène au moment de l'addition des activateurs

Conditions expérimentales : Après incubation avec le sérum de patient allergique à l'arachide et lavage, les dérivés du fullerène sont ajoutés en solution 10X (0 à 1000µM final) avec les activateurs soit l'anti-IgE ou l'extrait d'arachide à concentration fixe, préalablement déterminée comme induisant une dégranulation importante mais pas maximale avec le sérum testé.

Résultats

4.1. Dégranulations de référence et spécifique

Après la sensibilisation des cellules par un sérum de patient allergique à l'arachide puis analyse de l'effet de l'ajout de concentrations variables de dérivés de fullerène (0 à 1000µM) sur la dégranulation induite par l'anti-IgE ou par un extrait protéique d'arachide aucun effet n'a été observé, quel que soit le dérivé de fullerène testé et le type de dégranulation induite par l'anti-IgE ou par l'allergène.

Conclusion

Ces expériences confirment les autres résultats obtenus sur la lignée RBL-2H3 dans ce travail et les résultats obtenus sur les basophiles des patients allergiques et les donneurs non-allergiques. Ces résultats montrent que l'inhibition de la dégranulation induit par l'extrait protéique présente d'une façon reproductible des courbes en cloche tandis que l'inhibition de la dégranulation induit par l'anti-IgE présente souvent des courbes dose-réponse, c'est-à-dire que l'effet inhibiteur augmente en augmentant la concentration du fullerène.

L'inhibition observée sur les deux lignées mastocytaires RBL est moins importante que celle observée sur les basophiles humaines.

On n'observe aucun effet des dérivés de fullerène ni sur la liaison IgE/allergène ni sur la liaison IgE/Anti-IgE.

Références

1. Blanc F, Adel-Patient K, Drumare MF, Paty E, Wal JM, Bernard H. Capacity of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay: Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors. Clin Exp Allergy 2009; 39:1277-85

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives

Notre objectif de départ était de choisir et d'évaluer les outils analytiques nécessaires à l'établissement d'un critère de pureté pour les préparations commerciales de C_{60} . Ces préparations étant sous forme de poudre cristalline, nous avons d'abord fait appel à des techniques adaptées à l'analyse de l'"état solide" telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la diffraction des rayons-X (DRX), la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Ensuite, nous avons utilisé des techniques adaptées à l'analyse des échantillons en solution, telles que la spectrophotométrie UV-Visible, la chromatographie en phase liquide (CLHP) couplée à une barrette de diodes et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

Les résultats obtenus nous ont permis d'évaluer les avantages et les limites de chaque technique pour étudier la pureté d'un échantillon de C_{60} . En particulier, nos résultats montrent que la DSC est la technique de choix pour établir le critère de pureté d'un échantillon de C_{60} , fondé sur la transition de température et le changement d'enthalpie. Cependant, la FTIR est la technique la plus rapide pour détecter et caractériser le type d'impuretés présentes dans l'échantillon. Cette technique est certainement la plus appropriée pour le contrôle de qualité en cours de production. Par ailleurs, la CG-SM est nécessaire à l'identification des solvants résiduels et des impuretés volatiles, tandis que la CLHP reste incontournable pour détecter les fullerènes lourds et les dérivés du C_{60} , notamment les oxydes de C_{60} .

Cependant, il ne faut pas perdre de vue le fait que l'examen macroscopique d'un échantillon de C_{60} peut déjà fournir des informations très utiles sur sa pureté. Lorsqu'il contient des impuretés, l'échantillon est moins cristallin et se présente sous forme d'une poudre de couleur brune. Tandis que les échantillons hautement purs présentent un aspect cristallin métallique de couleur noire.

Conclusion et Perspectives

Il reste maintenant à définir le critère de pureté par DSC et à optimiser une méthode de contrôle de qualité, par FTIR.

Le second objectif de cette thèse a été d'explorer le mécanisme d'action du C₆₀ dans la lutte contre le stress oxydatif.

Dans une première partie de ce volet "biologie" nous avons d'abord étudié la bio-distribution subcellulaire du C₆₀, notamment au niveau des mitochondries des hépatocytes, après administration d'une solution huileuse dans un modèle expérimental chez la souris. En particulier, nous avons étudié l'effet du C₆₀ sur les enzymes mitochondriales. Ceci, nous a permis de voir, indirectement, si le C₆₀ peut atteindre ces organites, d'une part et d'étudier l'effet, proprement dit, d'autre part.

Les résultats obtenus ont montré la présence du C₆₀ au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, sans aucun signe de production du ROS et/ou de toxicité, ce qui confirme l'innocuité de ce fullerène. Par ailleurs, la modification de l'activité enzymatique de la malate déshydrogénase (MDH) et du complexe I (Cx I) de la chaîne respiratoire a confirmé la présence du C₆₀ au niveau de la mitochondrie et son effet bénéfique dans ce compartiment cellulaire.

Il reste maintenant à étudier la nature des interactions entre le C₆₀ et ces enzymes mitochondriales afin d'élucider le mécanisme d'action au niveau hépatique. Les études complémentaires pourraient être envisager afin d'étudier l'effet des fullerènes :

- sur les mitochondries isolées,
- sur la mitochondrie chez les souris en induisant l'hépatotoxicité
- sur la mitochondrie des cellules mastocytaires (lignée RBL-2H3) incubées avec les fullerènes

Conclusion et Perspectives

Dans la seconde partie de ce travail nous avons évalué l'effet du fullerène et de ses dérivés dans la pathologie "allergie" en utilisant les différents modèles *in vitro* sur les lignées cellulaires mastocytaires de rat (normales et transfectées avec les chaînes α , β et γ du récepteur Fc ϵ RI, récepteur humain de haute affinité pour les IgE), et *ex vivo* sur basophiles du sang de patients allergiques et des donneurs non-allergiques. Dans cette étude, nous avons comparé l'effet du C₆₀ et 4 de ses dérivés. Des expériences sur la toxicité du C₆₀ et ses dérivés sur les lignées cellulaires RBL-2H3 et RAW 264.7 ont montré que le dérivé cyclodextrine[60]fullerène a une toxicité cellulaire à des concentrations élevées (>1 μ M). Parmi les fullerènes utilisés dans cette étude le fullerénol et le dendro[60]fullerène ont inhibé significativement la libération des médiateurs IgE-dépendants et IgE-indépendants des RBL-2H3.

La deuxième série d'expériences a été réalisée sur les basophiles du sang de patients allergiques à l'arachide. Le test d'activation des basophiles (TAB) nous a permis suivre l'activation des basophiles des patients en absence et en présence de fullerènes et en présence des allergènes. Nous avons utilisé un protocole de sélection des basophiles avec lequel le CD63 et le CD203c, deux marqueurs d'activation des basophiles et de libération des médiateurs, ont été analysé par la cyométrie en flux dans leurs milieux naturels en présence toutes les autres cellules et molécules du sang total. Les cellules qui ont été pré-incubées pendant 1 h avec le dendro[60]fullerène, le [60]fullerène serinol malonate et fullerol ont montré une expression des marqueurs de surface CD203c et CD63 diminuée par rapport aux cellules témoins. Cette inhibition était plus importante pour les cellules incubées avec le dendro[60]fullerène que pour celles incubées avec les autres dérivés du C₆₀. Ces résultats pourraient être dus à la localisation des dérivés dans les différents compartiments cellulaires et aussi à la sensibilisation des différents patients allergiques étudiés. De plus, ces résultats ont été confirmés par les expériences faites sur les lignées cellulaires de RBL-2H3. Les résultats montrent que les fullerènes agissent à l'intérieur de la cellule et ils n'ont pas d'effet sur la liaison IgE-antigène ni sur la liaison IgE-

Conclusion et Perspectives

FcεRI. Nous avons observé un maximum d'inhibition à des concentrations nanomolaires, à 35 % du niveau d'expression des marqueurs de surface chez les patients allergiques à l'arachide. L'effet inhibiteur des fullerènes diminue dans les fortes concentrations, ce phénomène pourrait être due à l'agrégation des fullerènes qui diminue leurs capacités à agir avec les radicaux libres. Après l'activation des basophiles, les ROS dans la mitochondrie et le calcium dans le réticulum endoplasmique augmente dans la cellule. Étant donné que d'un côté la mitochondrie et le réticulum endoplasmique jouent un rôle important dans l'activation des cellules et d'un autre côté le C₆₀ et ses dérivés se localisent majoritairement dans ces organites, le mécanisme d'inhibition pourrait être due à l'interaction du fullerène avec la mitochondrie et/ou le réticulum endoplasmique.

Les expériences faites sur les basophiles purifiées des donneurs non-allergiques ont confirmés ces résultats. Dans ces expériences le dendro[60]fullerène présente une inhibition plus importante (jusqu'à 85%) par comparaison avec son effet sur les basophiles non purifiés du sang total. Le profil d'inhibition des fullerènes varie d'un patient à l'autre due à la variabilité interindividuelle.

Il reste maintenant à établir la relation structure/activité avec un plus grand nombre de dérivés de structure bien définie, afin de mieux appréhender le mécanisme d'action et de diriger la synthèse vers le dérivé le plus efficace et le moins toxique. Les études complémentaires pourraient être envisager afin d'étudier l'effet des fullerènes sur :

- les basophiles purifiées des patients allergiques,
- les modèles *in vivo* de l'allergie et de l'inflammation afin d'étudier aussi son effet sur la mitochondrie
- le signal de la dégranulation des mastocytes et des basophiles afin d'étudier son effet sur les enzymes impliquées dans la signalisation

Références

Références

1. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C60: buckminsterfullerene. *Nature* 1985;**318**:162–163.
2. Moussa F. 5 – [60]Fullerene and derivatives for biomedical applications. *Nanobiomaterials* 2018;:113–136.
3. Schergna S, Da Ros T, Linda P, Ebert C, Gardossi L, Prato M. Enzymatic modification of fullerene derivatives. *Tetrahedron Lett* 1998;**39**:7791–7794.
4. Friedman SH, DeCamp DL, Sijbesma RP, Srdanov G, Wudl F, Kenyon GL. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc* 1993;**115**:6506–6509.
5. Arbogast JW, Darmanyan AP, Foote CS, Rubin Y, Diederich FN, Anz SJ et al. Photophysical properties of C60. *J Phys Chem* 1991;**95**:11–12.
6. Krusic PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF. Radical reaction of C60. *Science (80-)* 1991;**254**:1183–1185.
7. McEwen CN, McKay RG, Larsen BS. C60 as a Radical Sponge. *J Am Chem Soc* 1992;**114**:4412–4414.
8. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin T-S, Choi DW. Buckminsterfullerenol Free Radical Scavengers Reduce Excitotoxic and Apoptotic Death of Cultured Cortical Neurons. *Neurobiol Dis* 1996;**3**:129–135.
9. Ali SS, Hardt JI, Quick KL, Jeong Sook K-H, Erlanger BF, Huang T et al. A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic Biol Med* 2004;**37**:1191–1202.
10. Sun T, Xu Z. Radical scavenging activities of alpha-alanine C60 adduct. *Bioorganic Med Chem Lett* 2006;**16**:3731–3734.
11. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric S a., Kostic TS, Bogdanovic GM et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, C 60(OH) 24. *Nitric Oxide - Biol Chem* 2004;**11**:201–207.
12. Enes RF, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Amorati R, Fumo MG, Pedulli GF et al. No Synthesis and antioxidant activity of [60]fullerene–BHT conjugates. *Chem a Eur J* 2006;**12**:4646–4653.
13. Witte P, Beuerle F, Hartnagel U, Lebovitz R, Savouchkina A, Sali S et al. Water solubility, antioxidant activity and cytochrome C binding of four families of exohedral adducts of C60and C70. *Org Biomol Chem* 2007;**5**:3599–3613.
14. Yang J, Alemany LB, Driver J, Hartgerink JD, Barron AR. Fullerene-derivatized amino acids: Synthesis, characterization, antioxidant properties, and solid-phase peptide synthesis. *Chem - A Eur J* 2007;**13**:2530–2545.
15. Dugan LL, Turetsky DM, Du C, Lobner D, Wheeler M, Almli CR et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:9434–9439.
16. Ali SS, Hardt JI, Dugan LL. SOD Activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2008;**4**:283–294.

Références

17. Hu Z, Guan W, Wang W, Huang L, Xing H, Zhu Z. Synthesis of β -alanine C60derivative and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Cell Biol Int* 2007;**31**:798–804.
18. Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol* 2007;**568**:89–98.
19. Zakharian TY, Seryshev A, Sitharaman B, Gilbert BE, Knight V, Wilson LJ. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: Synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture. *J Am Chem Soc* 2005;**127**:12508–12509.
20. Guan M, Ge J, Wu J, Zhang G, Chen D, Zhang W et al. Fullerene/photosensitizer nanovesicles as highly efficient and clearable phototheranostics with enhanced tumor accumulation for cancer therapy. *Biomaterials* 2016;**103**:75–85.
21. Zhou Z, Lenk R, Dellinger A, MacFarland D, Kumar K, Wilson SR et al. Fullerene nanomaterials potentiate hair growth. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2009;**5**:202–207.
22. Da Ros T, Prato M, Novello F, Maggini M, Banfi E. Easy Access to Water-Soluble Fullerene Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azomethine Ylides to C₆₀. *J Org Chem* 1996;**61**:9070–9072.
23. Zarubaev V V., Belousova IM, Kiselev OI, Piotrovsky LB, Anfimov PM, Krisko TC et al. Photodynamic inactivation of influenza virus with fullerene C60suspension in allantoic fluid. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2007;**4**:31–35.
24. Tegos GP, Demidova TN, Arcila-Lopez D, Lee H, Wharton T, Gali H et al. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem Biol* 2005;**12**:1127–1135.
25. Schinazi RF, Sijbesma R, Srdanov G, Hill CL, Wudl F. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60fullerene. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;**37**:1707–1710.
26. Cong W, Wang P, Qu Y, Tang J, Bai R, Zhao Y et al. Biomaterials Evaluation of the influence of fullerenol on aging and stress resistance using *Caenorhabditis elegans*. *Biomaterials* 2015;**42**:78–86.
27. Baati T, Bourasset F, Gharbi N, Njim L, Abderrabba M, Kerkeni A et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene. *Biomaterials* 2012;**33**:4936–4946.
28. Baati T, Bourasset F, Gharbi N, Njim L, Abderrabba M, Kerkeni A et al. Corrigendum to “The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene” [Biomaterials 33 (2012) 4936–4946]. *Biomaterials* 2012;**33**:6292–6294.
29. Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI. Biological applications of fullerenes. *Bioorganic Med Chem* 1996;**4**:767–779.
30. Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. In: *Bio-application of Nanoparticles*. 2007: 1–13.
31. Szwarc H, Moussa F. Toxicity of [60] fullerene : Confusion in the scientific literature. *J Nanosci Lett* 2011;**1**:61–62.

Références

32. Spohn P, Hirsch C, Hasler F, Bruinink a., Krug HF, Wick P. C60 fullerene: A powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environ Pollut* 2009;**157**:1134–1139.
33. Henry TB, Menn F, Fleming JT, Wilgus J, Compton RN, Sayler GS. Attributing Effects of Aqueous C 60 Nano-Aggregates to Tetrahydrofuran Decomposition Products in Larval Zebrafish by Assessment of Gene Expression. 2007;**115**:24–26.
34. Parker DH, Chatterjee K, Wurz P, Keith LR, Pellin MJ, Stock LM et al. Fullerenes and giant fullerenes : synthesis, separation, and mass spectrometric characterization. *Carbon N Y* 1992;**30**:1167–1182.
35. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Lett to Nat* 1991;**354**:56.
36. Ebbesen TW, Ajayan PM. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature* 1992;**358**:220–222.
37. Heiney PA. Structure, dynamics and ordering transition of solid C60. *J Phys Chem Solids* 1992;**53**:1333–1352.
38. Bethune DS, Johnson RD, Salem JR, de Vries MS, Yannoni CS. Atoms in carbon cages: the structure and properties of endohedral fullerenes. *Nature* 1993;**366**:123–128.
39. Lamb LD, Huffman DR. Fullerene production. *J Phys Chem Solids* 1993;**54**:1635–1643.
40. Milliken J, Keller TM, Baronavski AP, McElvany SW, Callahan JH, Nelson HH. Thermal and oxidative analyses of buckminsterfullerene, C60. *Chem Mater* 1991;**3**:386–387.
41. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W et al. Fullerene Nanomaterials Inhibit the Allergic Response. *J Immunol* 2007;**179**:665–672.
42. Huang S-T, Liao J-S, Fang H-W, Lin C-M. Synthesis and anti-inflammation evaluation of new C 60 fulleropyrrolidines bearing biologically active xanthine. *Bioorganic Med Chem Lett* 2008;**18**:99–103.
43. Dellinger A, Zhou Z, Lenk R, MacFarland D, Kepley CL. Fullerene nanomaterials inhibit phorbol myristate acetate-induced inflammation. *Exp Dermatol* 2009;**18**:1079–1081.
44. Roursgaard M, Poulsen SS, Kepley CL, Hammer M, Nielsen GD, Larsen ST. Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;**103**:386–388.
45. Fuller RB, Ward J. *The artifacts of R. Buckminster Fuller: a comprehensive collection of his designs and drawings*. 1985
46. Tawfik SA, Cui XY, Ringer SP, Stampfl C. Endohedral metallofullerenes, M@C60 (M = Ca, Na, Sr): Selective adsorption and sensing of open-shell NOx gases. *Phys Chem Chem Phys* 2016;**18**:21315–21321.
47. Rodríguez-Fortea A, Alegret N, Poblet JM. Endohedral Fullerenes. *Compr Inorg Chem II (Second Ed From Elem to Appl* 2013;**9**:907–924.
48. Manolopoulos DE, May JC, Down SE. Theoretical studies of the fullerenes: C34 to C70. *Chem Phys Lett* 1991;**181**:105–111.

Références

49. Fowler PW, Batten RC, Manolopoulos DE. The Higher Fullerenes - a Candidate for the Structure of C₇₈. *J Chem Soc Trans* 1991;**87**:3103–3104.
50. Schulman JM, Disch RL, Miller MA, Peck RC. Symmetrical clusters of carbon atoms: The C₂₄ and C₆₀ molecules. *Chem Phys Lett* 1987;**141**:45–48.
51. Häser M, Almlöf J, Scuseria GE. The equilibrium geometry of C₆₀ as predicted by second-order (MP2) perturbation theory. *Chem Phys Lett* 1991;**181**:497–500.
52. Yannoni CS, Bernier PP, Bethune DS, Meijer G, Salem JR. NMR Determination of the Bond Lengths in C₆₀. *J Am Chem Soc* 1991;**113**:3190–3192.
53. William I. F. David, Richard M. Ibberson, Judy C. Matthewman, Kosmas Prassides, T. John S. Dennis, Jonathan P. Hare, Harold W. Kroto RT& DRMW. Crystal structure and bonding of ordered C₆₀. *Nature* 1991;**353**:147–149.
54. HEDBERG K, HEDBERG L, BETHUNE DS, BROWN CA, DORN HC, JOHNSON RD et al. Bond lengths in free molecules of buckminsterfullerene, C₆₀, from Gas-Phase Electron Diffraction. *Science (80-)* 1991;**254**:410–412.
55. Schmalz TG, Seitz WA, Klein DJ, Hite GE. Elemental Carbon Cages. *J Am Chem Soc* 1988;**110**:1113–1127.
56. Kroto HW. The stability of the fullerenes C_n, with n = 24, 28, 32, 36, 50, 60 and 70. *Nature* 1987;**329**:529–531.
57. Hirsch A. The chemistry of the fullerenes. *Chem Fullerenes* 1994;**1**:1–203.
58. Ajie H, Alvarez MM, Anz SJ, Beck RD, Diederich F, Fostiropoulos K et al. Characterization of the soluble all-carbon molecules C₆₀ and C₇₀. *J Phys Chem* 1990;**94**:8630–8633.
59. Scuseria GE. The equilibrium structure of C₇₀. An ab initio Hartree-Fock study. *Chem Phys Lett* 1991;**180**:451–456.
60. Balch AL, Catalano VJ, Lee JW, Olmstead MM, Parkin SR. (η²-C₇₀)Ir(CO)Cl(PPh₃)₂: The Synthesis and Structure of an Organometallic Derivative of a Higher Fullerene. *J Am Chem Soc* 1991;**113**:8953–8955.
61. Bürgi HB, Venugopalan P, Schwarzenbach D, Diederich F, Thilgen C. The Crystal Structure of C₇₀ · 6(S8) at 100 K. *Helv Chim Acta* 1993;**76**:2155–2159.
62. Manolopoulos DE. Faraday communications. Proposal of a chiral structure for the fullerene C₇₆. *J Chem Soc Faraday Trans* 1991;**87**:2861–2862.
63. Manolopoulos DE, Fowler PW. Structural proposals for endohedral metal-fullerene complexes. *Chem Phys Lett* 1991;**187**:1–7.
64. Taylor R. A valence bond approach to explaining fullerene stabilities. *Tetrahedron Lett* 1991;**32**:3731–3734.
65. Balasubramanian K. Topological characterization of five C₇₈ fullerene isomers. *Chem Phys Lett* 1993;**206**:210–216.
66. Robert L. Murry GES. Theoretical Evidence for a C₆₀ ‘Window’ Mechanism. *Science (80-)* 1994;**263**:791–793.
67. B. L. Zhang, C. H. Xu, C. Z. Wang, C. T. Chan and KMH. Systematic study of

- p>structures and stabilities of fullerenes.
- Phys Rev BB*
- 1992;
- 46**
- :7333.
68. Tersoff J. Energies of fullerenes. *Phys Rev B* 1992;**46**:15546.
 69. Sivaraman N, Dhamodaran R, Kaliappan I, Srinivasan TG, Rao PRV, Mathews CK. Solubility of C60 in organic solvents. *J Org Chem* 1992;**57**:6077–6079.
 70. Ruoff RS, Tse DS, Malhotra R, Lorents DC. Solubility of fullerene (C60) in a variety of solvents. *J Phys Chem* 1993;**97**:3379–3383.
 71. Scrivens WA, Tour JM. Potent Solvents for C60 and Their Utility for the Rapid Acquisition of 13C NMR Data for Fullerenes. *J Chem Soc, Chem Commun* 1993;**3**:1207–1209.
 72. Gasyna Z, Schatz PN, Hare JP, Dennis TJ, Kroto HW, Taylor R et al. The magnetic circular dichroism and absorption spectra of C60 isolated in Ar matrices. *Chem Phys Lett* 1991;**183**:283–291.
 73. Leach S, Vervloet M, Desprès A, Bréheret E, Hare JP, John Dennis T et al. Electronic spectra and transitions of the fullerene C60. *Chem Phys* 1992;**160**:451–466.
 74. Hare JP, Kroto HW, Taylor R. Preparation and UV/visible spectra of fullerenes C60 and C70. *Chem Phys Lett* 1991;**177**:394–398.
 75. Fleming RM, Hessen B, Siegrist T, Kortan AR, Marsh P, Tycko R et al. Crystalline Fullerenes. *Am Chem Soc Symp Ser* 1992;**481**:25–39.
 76. Rees D, Ades S, Singer S, Hynes R. © 19 90 Nature Publishing Group. *J Colloid Interface Sci* 1990;**374**:685–689.
 77. Martín N. New challenges in fullerene chemistry. *Chem Commun* 2006;:2093–2104.
 78. Krätschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K, Huffman DR. Solid C60: a new form of carbon. *Nature* 1990;**347**:354.
 79. Hirsch A, Brettreich M. Heterofullerenes. In: *Fullerenes: Chemistry and reactions*. 2005: Chapter 12.
 80. Huang SS, Tsai SK, Chiang LY, Chih LH, Tsai MC. Cardioprotective effects of hexasulfobutylated C60 (FC4S) in anesthetized rats during coronary occlusion/reperfusion injury. *Drug Dev Res* 2001;**53**:244–253.
 81. Jin H, Chen WQ, Tang XW, Chiang LY, Yang CY, Schloss JV et al. Polyhydroxylated C60, fullerenols, as glutamate receptor antagonists and neuroprotective agents. *J Neurosci Res* 2000;**62**:600–607.
 82. Huang SS, Tsai SK, Chih CL, Chiang L-Y, Hsieh HM, Teng CM et al. Neuroprotective effect of hexasulfobutylated C60 on rats subjected to focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2001;**30**:643–649.
 83. TSAI M, CHEN YH, CHIANG LY. Polyhydroxylated C60, Fullerenol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-elicited Changes in Rat Hippocampus In-vitro. *J Pharm Pharmacol* 1997;**49**:438–445.
 84. Lai HS, Chen WJ, Chiang LY. Free radical scavenging activity of fullerenol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J Surg* 2000;**24**:450–454.
 85. Lai HS, Chen Y, Chen WJ, Chang J, Chiang LY. Free radical scavenging activity of

- fullerenol on grafts after small bowel transplantation in dogs. *Transplant Proc* 2000;**32**:1272–1274.
86. Lai Y-L, Wu H-D, Chen C-F. Antioxidants Attenuate Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;**32**:714–720.
87. Afreen S, Kokubo K, Manickam S. RSC Advances Hydration or hydroxylation : direct synthesis of fullerenol from pristine fullerene [C 60] via acoustic cavitation in the presence of hydrogen peroxide. 2017;;31930–31939.
88. Li Y, Luo HB, Zhang HY, Guo Q, Yao HC, Li JQ et al. RSC Advances Potential hepatoprotective effects of fullerenol nanoparticles on alcohol-induced oxidative stress by ROS. 2016;;31122–31130.
89. Beuerle F, Witte P, Hartnagel U, Lebovitz R, Parng C, Hirsch A. Cytoprotective activities of water-soluble fullerenes in zebrafish models. *J Exp Nanosci* 2007;**2**:147–170.
90. Xiao L, Takada H, Gan XH, Miwa N. The water-soluble fullerene derivative ‘Radical Sponge®’ exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorganic Med Chem Lett* 2006;**16**:1590–1595.
91. Tsao N, Luh TY, Chou CK, Chang TY, Wu JJ, Liu CC et al. In vitro action of carboxyfullerene. *J Antimicrob Chemother* 2002;**49**:641–649.
92. Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, Castoro JA, Wilkins C, Friedman SH et al. Synthesis of a Fullerene Derivative for the Inhibition of HIV Enzymes. *J Am Chem Soc* 1993;**115**:6510–6512.
93. Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, Balzarini J, Prato M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett* 2005;**15**:3615–3618.
94. Mashino T, Shimotohno K, Ikegami N, Nishikawa D, Okuda K, Takahashi K et al. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett* 2005;**15**:1107–1109.
95. Hu Z, Guan W, Wang W, Huang L, Xing H, Zhu Z. Protective effect of a novel cystine C60derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Biol Interact* 2007;**167**:135–144.
96. Gubskaya VP, Berezhnaya LS, Gubaidullin AT, Faingold II, Kotelnikova RA, Konovalova NP et al. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes. *Org Biomol Chem* 2007;**5**:976–981.
97. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, Shibata N, Takada K. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* 2005;**26**:7154–7163.
98. Nakamura E, Isobe H, Tomita N, Sawamura M, Jinno S, Okayama H. Functionalized fullerene as an artificial vector for transfection. *Angew Chemie - Int Ed* 2000;**39**:4254–4257.
99. Burger C, Chu B. Functional nanofibrous scaffolds for bone reconstruction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2007;**56**:134–141.
100. Isobe H, Nakanishi W, Tomita N, Jinno S, Okayama H, Nakamura E. Nonviral gene

- p>delivery by tetraamino fullerene.
- Mol Pharm*
- 2006;
- 3**
- :124–134.
101. Manuscript A. NIH Public Access. 2015;**76**:393–402.
 102. Sun Y, Qian Z, Wei G. The inhibitory mechanism of a fullerene derivative against amyloid- b peptide aggregation : an atomistic simulation study †. 2016;;12582–12591.
 103. Dis A. Neuroprotective effects of hydrated fullerene C60 : cortical and hippocampal EEG interplay in an amyloid-infused rat model of Alzheimer ' s disease . 2015;**45**:1–2.
 104. Benyamini H, Shulman-Peleg A, Wolfson HJ, Belgorodsky B, Fadeev L, Gozin M. Interaction of C60-fullerene and carboxyfullerene with proteins: Docking and binding site alignment. *Bioconjug Chem* 2006;**17**:378–386.
 105. Asuri P, Karajanagi SS, Vertegel AA, Dordick JS, Kane RS. Enhanced Stability of Enzymes Adsorbed onto Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;**7**:1675–1678.
 106. Yang X, Chen Z, Meng X, Li B, Tan X. Inhibition of DNA restrictive endonucleases and Taq DNA polymerase by trimalonic acid C60. *Chinese Sci Bull* 2007;**52**:1802–1806.
 107. Defuentes G, Rapp C, Vidal W. *Processus inflammatoires et infectieux*. 2014
 108. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. *Immunology*. 2003 doi:10.1016/B978-0-444-63319-4.00024-9
 109. Manuscript A, Imaging M. Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine* 2011;**31**:510–514.
 110. Chen Y, Hwang KC, Yen C, Lai Y. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;**287**:R21–R26.
 111. Dellinger AL, Cunin P, Lee D, Kung AL, Brooks DB, Zhou Z et al. Inhibition of Inflammatory Arthritis Using Fullerene Nanomaterials. *PLoS One* 2015;**10**:e0126290.
 112. Schuhmann MK, Fluri F. Effects of Fullerenols on Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells. 2017;;1–15.
 113. Byelinska I V., Kuznietsova HM, Dziubenko N V., Lynchak O V., Rybalchenko T V., Prylutskyy YI et al. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mater Sci Eng C* 2018;**93**:505–517.
 114. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyshnikov O et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C 60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology* 2016;**14**:1–11.
 115. Norton SK, Wijesinghe DS, Dellinger A, Sturgill J, Zhou Z, Barbour S et al. Epoxyeicosatrienoic acids are involved in the C70 fullerene derivative-induced control of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:761–769.e2.
 116. Dellinger AL, Zhou Z, Kepley CL. A steroid-mimicking nanomaterial that mediates inhibition of human lung mast cell responses. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2014;**10**:1185–1193.
 117. Norton SK, Dellinger A, Zhou Z, Lenk R, MacFarland D, Vonakis B et al. A new class of human mast cell and peripheral blood basophil stabilizers that differentially control

- allergic mediator release. *Clin Transl Sci* 2010;**3**:158–169.
118. Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ et al. Inhalation Toxicity and Lung Toxicokinetics of C60Fullerene Nanoparticles and Microparticles. *Toxicol Sci* 2008;**101**:122–131.
119. Heymann D, Chibante LPF, Brooks RR, Wolbach WS, Smalley RE. Fullerenes in the cretaceous-tertiary boundary layer. *Science* (80-) 1994;**265**:645–647.
120. Howard JB, McKinnon JT, Makarovskiy Y, Lafleur a L, Johnson ME. Fullerenes C60 and C70 in flames. *Nature*. 1991;**352**:139–141.
121. Howard JB, Lafleur AL, Makarovskiy Y, Mitra S, Pope CJ, Yadav TK. Fullerenes synthesis in combustion. *Carbon N Y* 1992;**30**:1183–1201.
122. Murr LE, Bang JJ, Esquivel E V, Guerrero PA, Lopez DA. Carbon nanotubes, nanocrystal forms, and complex nanoparticle aggregates in common fuel-gas combustion sources and the ambient air. *J Nanoparticle Res* 2004;**;**241–251.
123. Chai Y, Guo T, Jin C, Haufler RE, Chibante LPF, Fure J et al. Fullerenes with metals inside. *J Phys Chem* 1991;**95**:7564–7568.
124. Taylor R, Langley GJ, Kroto HW, Walton DRM. Formation of C60 by pyrolysis of naphthalene. *Nature* 1993;**366**:728.
125. Scott LT, Boorum MM, McMahon BJ, Hagen S, Mack J, Blank J et al. A Rational Chemical Synthesis of C60. *Science* (80-) Published Online First: 2002. doi:10.1126/science.1068427
126. Kroto HW. The stability of the fullerenes C_n, with n=24, 28, 32, 36, 50, 60 and 70. *Nature* 1987;**329**:529–531.
127. Andreoni W. *The physics of fullerene-based and fullerene-related materials*. 2000
128. Yeretdzian C, Wiley JB, Holczer K, Su T, Song N, Kaner RB et al. Partial separation of fullerenes by gradient sublimation. *J Phys Chem* 1993;**97**:10097–10101.
129. Ajie H, Alvarez MM, Anz SJ, Beck RD, Diederich F, Fostiropoulos K et al. Characterization of the soluble all-carbon molecules C60 and C70. *J Phys Chem* 1990;**94**:8630–8633.
130. Diederich F, Whetten RL. Beyond C60: The higher fullerenes. *Acc Chem Res* 1992;**25**:119–126.
131. Meier MS, Selegue JP. Efficient preparative separation of C60 and C70. Gel permeation chromatography of fullerenes using 100% toluene as mobile phase. *J Org Chem* 1992;**57**:1924–1926.
132. Taylor R, Hare JP, Abdul-Sada AK, Kroto HW. Isolation, separation and characterisation of the fullerenes C60 and C70: The third form of carbon. *J Chem Soc, Chem Commun* 1990;**;**1423–1425.
133. Johnson RD, Meijer G, Bethune DS. C60 Has Icosahedral Symmetry. *J Am Chem Soc* 1990;**112**:8983–8984.
134. Vassallo AM, Palmisano AJ, Pang LSK, Wilson MA. Improved separation of fullerene-60 and fullerene-70. *J Chem Soc Commun* 1992;**;**60–61.

Références

135. Scrivens WA, Bedworth P V., Tour JM. Purification of gram quantities of C60. A new inexpensive and facile method. *J Am Chem Soc* 1992;**114**:7917–7919.
136. Hawkins JM, Lewis TA, Loren SD, Meyer A, Heath JR, Saykally RJ et al. A crystallographic analysis of C60 (Buckminsterfullerene). *J Chem Soc, Chem Commun* 1991;**11**:775–776.
137. Chu CW. Growth of large , defect-free pure C60 single crystals. *Nature* 1991;**3402**:3402–3403.
138. De Vries MS, Wendt HR, Hunziker H, Peterson E, Chang S. Search for high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons and fullerenes in carbonaceous meteorites. *Abstr Lunar Planet Sci Conf* 1991;**22**:315–316.
139. Wilson MA, Pang LSK, Quezada RA, Fisher KJ, Dance IG, Willett GD. Fullerene production in alternative atmospheres. *Carbon N Y* 1993;**31**:393–397.
140. Braun T, Rauschs H. Trace element impurities in C60, C70, and graphite soot. *Anal Chem* 1995;**67**:1517–1520.
141. Creegan KM, Robbins JL, Robbins WK, Millar JM, Sherwood RD, Tindall PJ et al. Synthesis and characterization of C60O, the first fullerene epoxide. *Am Chem Soc* 1992;**114**:1103–1105.
142. Diederich F, Ettl R, Rubin Y, Whetten RL, Beck R, Alvarez M et al. The higher fullerenes: Isolation and characterization of C76, C84, C90, C94, and C70O, an oxide of D5h-C70. *Science (80-)* 1991;**252**:548–551.
143. Beck RD, Stoermer C, Schulz C, Michel R, Weis P, Bräuchle G et al. Enhanced coalescence upon laser desorption of fullerene oxides. *J Chem Phys* 1994;**101**:3243–3249.
144. Balch AL, Costa DA, Lee JW, Noll BC, Olmstead MM. Directing effects in a fullerene epoxide addition. Formation and structural characterization of (η^2 -C60O)Ir(CO)Cl(P(C6H5)3)2. *Inorg Chem* 1994;**33**:2071–2072.
145. Elmes Y, K. Silverman S, Sheu C, Kao M, S. Foote C, Alvarez M et al. Reaction of C60 with Dimethyldioxirane—formation of an epoxide and a 1,3dioxolane derivative. *Angew Chemie-international Ed* 1992;**31**:351–353.
146. Hamano T, Mashino T. Oxidation of [60]fullerene by cytochrome P450 chemical models. *J Chem Soc, Chem Commun* 1995;:1537–1538.
147. Ogrin D, Barron AR. Highly oxygenated fullerenes by catalytic epoxidation of C60 and single walled carbon nanotubes with methyltrioxorhenium-hydrogen peroxide. *J Mol Catal A Chem* 2006;**244**:267–270.
148. Taylor R, Parsons JP, Avent AG, Rannard SP, Dennis TJ, Hare JP et al. Degradation of C60 by light. *Nature*. 1991;**351**:277–277.
149. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1058–1062.
150. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM et al. C60 in Water : Nanocrystal Formation and Microbial Response. *Environ Sci Technol* 2005;**39**:4307–4316.

151. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 2005;**26**:7587–7595.
152. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative Pulmonary Toxicity Assessments of C 60 Water Suspensions in Rats : Few Differences in Fullerene Toxicity in Vivo in Contrast to in Vitro Profiles. *Nano Lett* 2007;**7**:2399–2406.
153. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR. [60]Fullerene is an in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Subacute Toxicity. *Nano Lett* 2005;**5**:2578–2585.
154. Fiorito S, Serafino A, Andreola F, Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon N Y* 2006;**44**:1100–1105.
155. Dugan LL, Tian L, Quick KL, Hardt JI, Karimi M, Brown C et al. Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates. *Ann Neurol* 2014;**76**:393–402.
156. Raoof M, Mackeyev Y, Cheney MA, Wilson LJ, Curley SA. Internalization of C60 fullerenes into cancer cells with accumulation in the nucleus via nuclear pore complex. *Biomaterials* 2012;**33**:2952–2960.
157. Guan M, Ge J, Wu J, Zhang G, Chen D, Zhang W et al. Fullerene / photosensitizer nanovesicles as highly efficient and clearable phototheranostics with enhanced tumor accumulation for cancer therapy. *Biomaterials* 2016;**103**:75–85.
158. Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R et al. Anti-Influenza Activity of C60 Fullerene Derivatives. *PLoS One* 2013;**8**. doi:10.1371/journal.pone.0066337
159. Moussa F. [60]Fullerene and derivatives for biomedical applications. In: *Nanobiomaterials*. 2018: 113–136.
160. Baati T, Bourasset F, Gharbi N, Njim L, Abderrabba M, Kerkeni A et al. Corrigendum to “The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60]fullerene” [Biomaterials 33 (2012) 4936–4946]. *Biomaterials* 2012;**33**:6292–6294.
161. Lee HB, Blaufox MD. Blood volume in the Rat. *J Nucl Med* 1985;**25**:72–76.
162. Halliwell B. Letters to the Editors THE DEFINITION AND MEASUREMENT OF ANTIOXIDANTS IN. *Free Radic Biol Med* 1995;**18**:125–126.
163. Moussa F, Roux S, Pressac M, Génin E, Hadchouel M, Trivin F et al. In vivo reaction between [60] fullerene and vitamin A in mouse liver. *New J Chem* 1998;**22**:989–992.
164. Masuda Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Yakugaku Zasshi* 2006;**126**:885–899.
165. Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, Sato K. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* 2004;**75**:1539–1549.
166. Basu S. *Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity: A Classic Model of Lipid Peroxidation and Oxidative Stress*. 2011
167. Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S et al.

- Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005;**115**:3072–3082.
168. Yoneyama H, Kai Y, Koyama J, Suzuki K, Kawachi H, Narumi S et al. in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. *Med Mol Morphol* 2007;**40**:191–197.
169. Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv Exp Med Biol* 2007;**620**:168–180.
170. Kubota R, Tahara M, Shimizu K, Sugimoto N, Hirose A, Nishimura T. Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicol Lett* 2011;**206**:172–177.
171. Shinohara N, Nakazato T, Tamura M, Endoh S, Fukui H, Morimoto Y et al. Clearance kinetics of fullerene C60 nanoparticles from rat lungs after intratracheal C60 instillation and inhalation C60 exposure. *Toxicol Sci* 2010;**118**:564–573.
172. Dziubla, Thomas ; Butterfield DA. *Oxidative Stress and Biomaterials*. 2016
173. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Rep* 2001;**6**:229–234.
174. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;**552**:335–344.
175. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**294**:116–119.
176. Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W et al. Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp Dermatol* 2007;**16**:429–436.
177. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walter P. *Biologie moléculaire de la cellule*. 2004
178. Gaignard P, Liere P, Théron P, Schumacher M, Garcia-segura LM. Role of Sex Hormones on Brain Mitochondrial Function , with Special Reference to Aging and Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2017;**9**:1–18.
179. Gaignard P, Liere MFP, Schumacher PTM, Guennoun R. Sex differences in brain mitochondrial metabolism : influence of endogenous steroids and stroke. *J Neuroendocrinol* 2018;**30**:1–12.
180. Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Théron P, Schumacher M et al. Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology* 2015;**156**:2893–2904.
181. Chretien D, Slama A, Briere J-J, Munnich A, Rotig A, Rustin P. Revisiting Pitfalls, Problems and Tentative Solutions for Assaying [General Articles] Mitochondrial Respiratory Chain Complex III in Human Samples. *Curr Med Chem* 2004;**11**:233–239.
182. Krähenbühl S, Talos C, Wiesmann U, Hoppel CL. Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rats and humans. *Clin Chim Acta* 1994;**230**:177–187.
183. Nohl H, Gille L, Kozlov A V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radic Biol Med* 1998;**25**:666–675.

Références

184. Taylor RW, Birchmachin MA, Bartlett K, Turnbull DM. Succinate-Cytochrome-C Reductase - Assessment of Its Value in the Investigation of Defects of the Respiratory-Chain. *Biochim Biophys Acta* 1993;**1181**:261–265.
185. Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Lowerson SA, Turnbull DM. The control of mitochondria oxidation by complex III in Rat muscle and liver mitochondria. *J Biol Chem* 1994;**269**:3523–3528.
186. Kubota T, Yoshikawa S, Matsubara H. Kinetic Mechanism of Beef Heart Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase. *J Biochem* 1992;**111**:91–98.
187. Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I MJ. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 1996;**16**:345–355.
188. Tretter L A-V V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc B* 2005;**360**:2335–2345.
189. Ribas V, García-Ruiz C F-CJ. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 2014;**5**:151.
190. MD. B. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 2000;**35**:811–820.
191. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 2001
192. Abbas AK, Lichtman AH. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. 2009
193. Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet* 2004;**5**:376–387.
194. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;**18**:673–683.
195. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**:93–104.
196. Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol* 2001;**13**:716–720.
197. Immunology NR. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Genet* 2008;**8**:205–217.
198. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;**18**:693–704.
199. Kaminogawa S, Hachimura S, Nakajima-Adachi H, Totsuka M. Food allergens and mucosal immune systems with special reference to recognition of food allergens by gut-associated lymphoid tissue. *Allergol Int* 1999;**48**:15–23.
200. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM, Stephen J. G, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2013;**454**:445–454.
201. Irani AM, Schwartz LB. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc Off J Reg State Allergy Soc* 1994;**15**:303–308.
202. Schwartz LB, Kepley C. Development of markers for human basophils and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1994;**94**:1231–1240.
203. Abraham SN, Malaviya R. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun* 1997;**65**:3501–3508.

Références

204. Durrani SR, Montville DJ, Pratt AS, Sahu S, Devries MK, Rajamanickam V et al. NIH Public Access. 2013;**130**:489–495.
205. Chirumbolo S. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: Is the time right to treat these cells with the respect they deserve? *Blood Transfus* 2012;**10**:148–164.
206. Siracusa MC, Artis D. Basophil function type 2 inflammation: initiators, regulators and effectors. *Open Allergy J* 2010;**3**:46–51.
207. Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 1996;**26**:2493–2498.
208. Kim S, Shen T, Min B. Basophils Can Directly Present or Cross-Present Antigen to CD8 Lymphocytes and Alter CD8 T Cell Differentiation into IL-10-Producing Phenotypes. *J Immunol* 2009;**183**:3033–3039.
209. Leung D, Boguniewicz M, Howell M, Nomura I, Hamid Q. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004;**113**:651–657.
210. Wang H, Mobini R, Fang Y, Barrenäs F, Zhang H, Xiang Z et al. Allergen challenge of peripheral blood mononuclear cells from patients with seasonal allergic rhinitis increases IL-17RB, which regulates basophil apoptosis and degranulation. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:1194–1202.
211. Dvorak AM, Mihm MC, Dvorak HF. Degranulation of Basophilic Leukocytes in Allergic Contact Dermatitis Reactions in Man. *J Immunol* 1976;**116**:687–695.
212. DVORAK HF., MARTIN C . MIHM J. Basophilic leucocytes in allergic contact dermatitis. *J Exp Med* 1972;**135**:235–254.
213. Khodoun M V., Orekhova T, Potter C, Morris S, Finkelman FD. Basophils Initiate IL-4 Production during a Memory T-dependent Response. *J Exp Med* 2004;**200**:857–870.
214. Galli SJ, Franco CB. Basophils Are Back! *Immunity* 2008;**28**:495–497.
215. Kim S, Prout M, Ramshaw H, Lopez AF, Legros G, Min B. NIH Public Access. 2011;**184**:1143–1147.
216. Voehringer D, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* 2004;**20**:267–277.
217. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengten E et al. NIH Public Access. 2010;**10**:889–898.
218. Hida S, Tadachi M, Saito T, Taki S. Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance. *Blood* 2005;**106**:2011–2017.
219. Wakahara K, Baba N, Van VQ, Bégin P, Rubio M, Ferraro P et al. Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood* 2012;**120**:4761–4771.
220. Borja-Cacho D, Matthews J. NIH Public Access. *Nano* 2008;**6**:2166–2171.
221. Sokol CL, Medzhitov R. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. *Mucosal Immunol* 2010;**3**:129–137.
222. Sabato V, Verweij MM, Bridts CH, Levi-Schaffer F, Gibbs BF, De Clerck LS et al.

Références

- CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2012;**82 B**:132–138.
223. Saenz SA, Noti M, Artis D. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends Immunol* 2010;**31**:407–413.
224. Siracusa CM, Saenz SA, Hill DA, Kim BS, Haedley MB, Doering TA et al. TSLP promotes IL-3-independent basophil hematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 2012;**477**:229–233.
225. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES et al. Basophils Produce IL-4 and Accumulate in Tissues after Infection with a Th2-inducing Parasite. *J Exp Med* 2004;**200**:507–517.
226. Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, Allenspach EJ, Taylor C, Giacomini PR et al. *Immunity*. 2010;**10**:697–705.
227. D MacGlashan Jr, J M White, S K Huang, S J Ono JTS and LML. Secretion of IL-4 from human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol* 2018;**152**:3006–3016.
228. Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N et al. Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J Clin Invest* 2010;**120**:2867–2875.
229. Coenraad H. From www.bloodjournal.org by guest on September 23, 2015. For personal use only. 2015;**74**:1763–1769.
230. Conti P, Kempuraj D, Di Gioacchino M, Boucher W, Letourneau R, Kandere K et al. Interleukin-6 and mast cells. *Allergy Asthma Proc* 2002;**23**:331–335.
231. Schneider E, Thieblemont N, De Moraes ML, Dy M. Basophils: New players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw* 2010;**21**:142–153.
232. Fewtrell C, Kessler A, Metzgar H. Comparative aspects of secretion from tumor and normal mast cells. *Adv Inflamm Res* 1979;**1**:205–221.
233. Kulczycki BYA, Isersky C, Metzgar H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. *J Exp Med* 1974;**139**:600–616.
234. Branch R. EFFECT OF pH AND METABOLIC INHIBITION. 1981;**644**:363–368.
235. Fewtrell C, Metzgar H. Stimulus-secretion coupling in Rat Basophilic Leukemia cells. *Biochem Acute Allerg React* 1981;**295**–314.
236. Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* 1981;**11**:317–323.
237. Oliver JM, Seagrave JC, Stump RF, Pfeiffer JR, Deanin GG. Single transduction and cellular response in RBL-2H3 mast cells. *Prog Allergy* 1988;**42**:185–245.
238. Seldin d. C, Adelman S, Austen KF, Stevens RL, Hein A, Caulfield JP et al. Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;**82**:3871–3875.
239. Chen SS, Gong J, F-T L, Mohammed U. Naturally occurring polyphenolic antioxidants

- modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology* 2000;**100**:471–480.
240. Yoshimaru T, Suzuki Y, Matsui T, Yamashita K, Ochiai T, Yamaki M et al. Blockade of superoxide generation prevents high-affinity immunoglobulin E receptor-mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils. *Clin Exp Allergy* 2002;**32**:612–618.
241. Daussant J, Desvaux F-X. *Introduction To Immunochemical Techniques for Medical Diagnosis, Food Quality Control and Environ- Mental Testing*. 2007
242. G. AR, G. MM. Ascorbic acid and pyridoxine in experimental anaphylaxis . *Agents Actions* 1981;**11**:89–93.
243. Yip K-H, Kolesnikoff N, Yu C, Hauschild N, Taing H, Biggs L et al. Vitamin D3 represses IgE-dependent mast cell activation via mast cell-CYP27B1 and -vitamin D receptor activity. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:1356–1365.
244. Guérin-Marchand C, Sénéchal H, Pelletier C, Fohrer H, Olivier R, David B et al. H₂O₂ impairs inflammatory mediator release from immunologically stimulated RBL-2H3 cells through a redox-sensitive, calcium-dependent mechanism. *Inflamm Res* 2001;**50**:341–349.
245. Ting S, Rauls D, Reiman BEF. Inhibitory effect of hydroxyzine on antigen-induced histamine release in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**75**:63–66.
246. Charlesworth EN, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Lichtenstein LM. Effect of cetirizine on mast cell-mediator release and cellular traffic during the cutaneous late-phase reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1989;**83**:905–912.
247. Ooi M, Matsuo H, Takahagi S, Ishii K, Yanase Y, Hiragun T et al. Aspirin Augments IgE-Mediated Histamine Release from Human Peripheral Basophils via Syk Kinase Activation. *Allergol Int* 2013;**62**:503–511.
248. Sultana F, Rasool M. A novel therapeutic approach targeting rheumatoid arthritis by combined administration of morin, a dietary flavanol and non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin with reference to pro-inflammatory cytokines, inflammatory enzymes, RANKL and transcription factors. *Chem Biol Interact* 2015;**230**:58–70.
249. Li X, Park SJ, Jin F, Deng Y, Yang JH, Chang JH et al. Tanshinone IIA suppresses FcεRI-mediated mast cell signaling and anaphylaxis by activation of the Sirt1/LKB1/AMPK pathway. *Biochem Pharmacol* 2018;**152**:362–372.
250. Nam ST, Kim HW, Kim HS, Park YH, Lee D, Lee MB et al. Furaladone suppresses IgE-mediated allergic response through the inhibition of Lyn/Syk pathway in mast cells. *Eur J Pharmacol* 2018;**828**:119–125.
251. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;**6**:135–142.
252. Barten DM, Ruddle NH. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1994;**51**:123–133.
253. Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells:

- Regulation by icam-1, vcam-1, e-selectin and pecam-1. *J Neuroimmunol Exp Neurol* 1999;**58**:138–152.
254. Life C, Cmls S, Antonio S. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. 2007;;1–4.
255. Dekhuijzen PN, van Beurden WJ. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;**1**:99–106.
256. Brettreich M, Hirsch A. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lettters* 1998;**39**:2731–2734.
257. Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M. Fullerene derivatives: An attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem* 2003;**38**:913–923.
258. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. [60] Fullerene is an in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Sub-acute Toxicity. *Nano Lett* 2005;**5**:2578–2585.
259. Patil SU, Shreffler WG. BATting above average: Basophil activation testing for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**:653–654.
260. Jeng U-S, Lin T-L, Chang T-S, Lee H-Y, Hsu C-H, Hsieh Y-W et al. Comparison of the aggregation behavior of water-soluble hexa(sulfobutyl)fullerenes and polyhydroxylated fullerenes for their free-radical scavenging activity. *Trends Colloid Interface Sci XV* 2001;**60**:232–237.

Annexe

Liste des publications et des communications

- **Keykhosravi S.**, Rietveld, I., Coutou D., Tamarit, J., Barrio M., Ceolin R., Moussa F.; Purity assessment of [60]fullerene samples, (*Submitted: American Chemical Society Oméga*)
- **Keykhosravi S.**, Sénéchal H., Arif R., Busnel J.M., Alter M., Selva M.A., Couderc R., Zhang Y., Hirsh A., Wilson L.J., Poncet P., Moussa F.; Fullerenes inhibit *ex vivo* activation of peanut allergic patient's basophils (*ready to submit to Allergy*)
- Sénéchal H. **Keykhosravi S.**, Couderc R., Selva M.A., Shahali, Y., Aizawa T., Busnel J.M., Arif R., Mercier I., Pham-Thi N., Charpin D.A., Poncet P; Pollen/fruit syndrome: clinical relevance of the cypress pollen allergenic Gibberellin-regulated protein, *Allergy Asthma Immunol Res* 2019, 11, 143-51
- **Keykhosravi S.**, Sénéchal H., Moussa F., Couderc R., Bayry J., Poncet P.; Fullerenes & Allergy: a review (*ready to submit: Immunotherapy*)
- **Keykhosravi S.**, Sénéchal H., Arif R., Busnel J.M., Selva M.A., Couderc R., Poncet P., Moussa F.; Fullerenes inhibit *ex vivo* activation of peanut allergic patient's basophil, *1st meeting of the French Mast Cell and Basophil Club (Paris, November 2018)*
- **Keykhosravi S.**, Sénéchal H., Arif R., Busnel J.M., Selva M.A., Couderc M., Poncet P., Zhang Y. Hirsh A., Wilson L.J., Moussa F.; Inhibition *ex vivo* par des fullerènes de l'activation de basophiles humains de patients allergiques à l'arachide, *Chimie Physic Paris-Saclay federation's conference (Orsay, July 2018)*
- **Keykhosravi S.**, Arif R.2, Busnel J., Mercier I., Pham-Thi N., Aizawa T., Gomes A., Selva M., Couderc R., Senechal H., Poncet P.; Cypress Pollen/Peach associated syndrome: Clinical Exploration and In-Depth Biological Characterization of a Patient Reactive to Both Species, *Immunology / Allergens: characterisation (new allergens), European Academy of Allergy and Cinical Immunology congress (Munich, may 2018)*
- **Keykhosravi S.**, Arif R., Busnel J.M., Mercier J., Aizawa T., Selva M.A., Couderc R., Sénéchal H. et Poncet P.; Exploration clinique et biologique d'un patient présentant une allergie croisée au pollen de cyprès et à la pêche L'allergène croisant BP14 du pollen de cyprès est pertinent au niveau clinique, *13e Congrès Francophone d'Allergologie (Paris, April 2018)*
- **Keykhosravi S.**, Poncet P., Sénéchal H., Couderc R., Moussa F., Effect of fullerenes on cells involved in allergic diseases: basophiles, *Conference of Ecole Doctorale "Sciences Chimiques: Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)" (Orsay, October 2017)*
- **Keykhosravi S.**, Poncet P., Sénéchal H., Couderc R., Moussa F.; Effect of fullerene on basophil related cell line, *Chimie Physic Paris-Saclay federation's conference (Orsay, Jun 2016)*
- **Keykhosravi S.**, Coutou D., DE Person M., Moussa F.; Purity criteria of [60]fullerene (C₆₀), *Research day of UFR pharmacy of Châtenay-Malabry (Châtenay-Malabry, November 2015)*

Introduction

La prévalence des syndromes associés pollen/aliment est en augmentation que ce soit pour les adultes ou les enfants. Ces syndromes impliquent de nombreux pollen et aliments comme le syndrome pomme/bouleau ou LTP mais d'autres allergènes peuvent être incriminés.

Après exploration clinique, les réactivités IgE spécifiques des patients sélectionnés sont étudiées par test unitaire classique, microarray, immunoempreinte et test d'activation des basophiles.

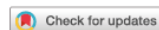
La découverte de la péamacléine (allergène Pru p 7 de pêche), une protéine régulée par la Gibbérelline (GRP), a été le point de départ de celle d'allergènes de la même famille dans d'autres fruits et aussi dans le pollen de cyprès : BP14. BP14 croise avec Pru p 7, la snakine-1 (GRP de pomme de terre) et une petite protéine cationique des agrumes, probablement Cit s 7 (GRP de l'orange), ce qui a permis de proposer une explication aux syndromes cyprès/pêche et cyprès/agrumes décrits. Ces allergènes sont résistants à la chaleur et à la trypsine et possèdent des épitopes IgE conformationnels. La protéine BP14, comme Pru p 7, a une pertinence clinique car elle peut induire *ex vivo* la dégranulation de basophiles d'un patient atteint du syndrome cyprès/pêche. Ce patient a des IgE spécifiques de Pru p 7 et aussi d'une petite protéine cationique de la grenade (probablement Pun g 7), fruit auquel il est allergique.

De nombreuses GRP, petites protéines cationiques, ont été décrites dans le monde végétal mais leur allergénicité en tant que pneumallergène ou trophallergène n'a pas fait l'objet de nombreuses publications. Avec des identités de séquences de plus de 80%, elles seraient candidates aux réactivités croisées IgE. Nos expériences préliminaires d'inhibitions croisées sur Pru p 7, Cit s 7 et BP14 laissent cependant penser qu'il existe une grande diversité de réactivité IgE au sein de cette famille de protéine malgré une faible diversité de structure primaire sur des protéines de faible masse moléculaire.

Des études immunostructurales permettraient de rechercher des différences subtiles de structure tertiaire ou l'existence de cofacteurs/ligands moléculaires impliqués dans l'allergénicité de cette famille de protéines.

Cette étude nous a permis de mettre au point la méthode « test d'activation de basophile » et d'évaluer le protocole expérimental de nos préparations d'extrait afin d'étudier ultérieurement l'effet des fullerènes sur les basophiles des patients allergiques.

Brief Communication



OPEN ACCESS

Received: Jul 12, 2018

Revised: Sep 4, 2018

Accepted: Sep 5, 2018

Correspondence to

Pascal Poncet, PhD

C2RT Department, Pasteur Institute, Center of Resources and Technological Research, 25-28 rue du Dr Roux, Paris 75015, France.
 Tel: +33-140-613-028
 E-mail: pascal.poncet@pasteur.fr

Copyright © 2019 The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology - The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID iDs

Yousef Shahali

<https://orcid.org/0000-0003-3188-4374>

Tomoyasu Aizawa

<https://orcid.org/0000-0001-9134-7576>

Pascal Poncet

<https://orcid.org/0000-0003-0757-5424>

Disclosure

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

Pollen/Fruit Syndrome: Clinical Relevance of the Cypress Pollen Allergenic Gibberellin-Regulated Protein

Hélène Sénéchal,¹ Sanaz Keykhosravi,^{1,2} Rémy Couderc,³ Marie-Ange Selva,³ Youcef Shahali ,⁴ Tomoyasu Aizawa ,⁵ Jean-Marc Busnel,⁶ Rihane Arif,⁶ Inna Mercier,⁷ Nhan Pham-Thi,⁷ Denis-André Charpin,⁸ Pascal Poncet ^{1,9*}

¹Department of Biochemistry, Armand Trousseau Children Hospital, APHP, A&E Research Team, Paris, France

²Paris-Sud Analytical Chemistry Group, Paris-Sud University, Orsay, France

³Department of Biochemistry, Armand Trousseau Children Hospital, APHP, Paris, France

⁴Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

⁵Global Institution for Collaborative Research and Education, Protein Science Laboratory, Hokkaido University, Sapporo, Japan

⁶Beckman Coulter, Life Sciences Research, Marseille, France

⁷Department of Allergology, Pasteur Institute Medical Center, Paris, France

⁸Department of Pneumonology and Allergy, La Timone Hospital, APHM, Aix-Marseille University, Marseille, France

⁹Pasteur Institute, Center of Resources and Technological Research, Paris, France

ABSTRACT

A pollen/food-associated syndrome (PFAS) has been described between peach and cypress pollen. Cross-reactive allergens were characterized which belong to the Gibberellin-regulated protein (GRP) family, BP14 in cypress pollen and Pru p 7 in peach. GRP are small cationic protein with anti-microbial properties. A patient suffering from a peach/cypress syndrome was explored clinically and biologically using 2 types of immunoglobulin E (IgE) multiarray microchip, immunoblots and a basophil activation test to assess the clinical relevance of various extracts and purified allergens from fruits or cypress pollen. In addition to PR10 sensitization, the patient showed specific IgE to Pru p 7, BP14 and allergen from pomegranate. These last 3 allergens and allergenic sources are able to induce *ex vivo* basophil activation characterized by the monitoring of the expression of CD63 and CD203c, both cell surface markers correlated with a basophil mediator release. Up to 100% of cells expressed CD203c at 50 ng/mL of BP14 protein. In contrast, snakin-1, a GRP from potato sharing 82% sequence identity with Pru p 7 did not activate patient's basophils. These results strongly suggest that, like Pru p 7, BP14 is a clinically relevant allergenic GRP from pollen. Allergen members of this newly described protein family are good candidates for PFAS where no cross-reactive allergens have been characterized.

Keywords: Cypress; pollen; peach; pomegranate; allergen; basophil

INTRODUCTION

With no exception in the field of allergy, cases of pollen/food-associated syndromes (PFAS) are increasing. Between 20% to 40% of pollen-sensitized patients are also sensitized to fruits worldwide, with peach, apple and kiwi in the top 3 fruits.¹ Many efforts have been put on the study of the birch/apple syndrome,² but few data are reported on the cypress/peach syndrome.³ Recently, we have shown that immunoglobulin E (IgE) cross reactivity between peach and Italian cypress (*Cupressus sempervirens*, Cups) pollen is borne by members of the Gibberellin-regulated protein (GRP) family present in both allergenic sources, BP14 in cypress pollen and Pru p 7 in peach.⁴ GRPs are small cationic proteins, expressed in plant in response to a biotic or abiotic stress.⁵ They exhibit anti-microbial properties,⁶ and 4 allergens from this protein family are characterized in fruit (peach, orange, pomegranate and Japanese apricot) and 1 in pollen (Cups pollen).

To assess the clinical relevance of cross-sensitization to BP14 and Pru p 7, the case of a patient suffering since childhood from cypress pollen allergy and also food allergy to fruits including peach and pomegranate was thoroughly explored clinically (anamnesis and skin prick test [SPT]) and biologically using not only conventional diagnostic techniques to study the serum IgE specificities (single and multi-arrays) but also immunoprints and a basophil activation test (BAT) with total allergenic sources extracts and purified allergens.

MATERIALS AND METHODS

Cypress pollen and fruit protein extractions

Cups pollen grains (10%, w:v) (Allergon AB, Ängelholm, Sweden) were incubated overnight in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 at 4°C by rotation. After centrifugation (18,000 g, 4°C, 20 minutes), the supernatant was dialyzed against distilled water and lyophilized. The lyophilized extract was dissolved in distilled water and stored as aliquots at -20°C until use.

Peach, grapefruit, orange and pomegranate were purchased in market. The peach was prepared by crushing the fruit peel. The grapefruit and orange pulps were deprived of juice by pressing and the remaining insoluble part used for protein extraction. The pulp pomegranate was prepared after removal of the seed. These 4 preparations were then submitted to protein extraction using a multidimensional grinder FastPrep-24 (MP-Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), for 40 seconds at 4°C at 6 m/sec using matrix C (1 mm diameter silica beads) in presence of PBS. After centrifugation (18,000 g at 4°C, 20 minutes) supernatants were collected and stored as aliquots at -20°C until use.

Native and recombinant proteins

Recombinant snakin-1 and peamaclein

Recombinant snakin-1 and peamaclein were prepared in *Pichia pastoris* and purified essentially as described in Kuddus *et al.*⁶ Briefly, after induction phase, yeast pellet and supernatant were separated by centrifugation (14,000 g, 4°C, 30 minutes). The protein containing supernatant was purified on a cation exchange column followed by a RP-HPLC, lyophilized and stored at -30°C.

BP14 from cypress pollen

Pieces of gel containing BP14 were excised from a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 8%–18% where only cypress pollen basic proteins were

run.⁷ The in-gel BP14 was then eluted from the gel with distilled water in a multidimensional grinder MP-Biomedicals FastPrep-24 for 40 seconds at 6 m/sec with 1 mm diameter silica beads. The beads, acrylamide residues and the BP14-protein were then filtered on an ultrafree-MC filter (5 µm; Millipore, Billerica, MA, USA). The filtrate containing BP14 was stored at -20°C. MS/MS experiments were performed on the purified protein which confirms that it is a GRP (data not shown).

Patients and their sera

The cypress pollen and food allergic patient was selected based on clinical symptoms (rhinitis, conjunctivitis and asthma) and SPT using cypress and birch pollen extracts. Sensitization was determined with either individual classical fluorescence enzyme immunoassay (FEIA) (Thermo Fischer Scientific, Villebon, France; Phadia, Uppsala, Sweden) on the ImmunoCAP 2500 apparatus, according to the manufacturer's recommendations with a detection limit set at 0.10 kU/L or using 2 types of IgE multiarray microchips: ISAC (Thermo Fischer Scientific) and FABER (CRDiagnostics SAS, Bullion, France; a partner of P-Friendly Allergen Nano-Bead Array) with a detection limit set at 0.30 ISU-E and 0.10 FIU/mL, respectively. Written informed consent was obtained from the patients.

The serum from a healthy individual (non allergic, non atopic) and sera from atopic patients with other types of allergy were used as negative controls and corresponded to residues from biological analysis laboratories for the diagnosis of allergy. The sera were stored at -20°C until use.

Gel electrophoresis analysis

Proteins were separated in unreduced conditions in 1-dimensional gel electrophoresis (1-DE) SDS-PAGE in a 8%–18% gradient polyacrylamide gel (ExcelGel; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) on a flat-bed electrophoretic chamber (Multiphor II; GE Healthcare) at 12°C. Molecular mass (Mr) markers (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) ranging from 14.4 to 94 kDa were used as comparative references. Separated proteins were then either electrotransferred onto a 0.2 µm cyanogen bromide activated nitrocellulose (NCA) membrane (Optitran®BA-S 83; Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) for immunoblotting assays or stained with Coomassie blue or silver nitrate for protein detection.

Cups protein extract was submitted to double one-dimensional gel electrophoresis (D1-DE) with basic proteins (pI 8.5–9.5) previously separated in isoelectric focusing (pH 2–11) and to classical two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) according to Shahali *et al.*⁷ Isoelectric point markers (Serva, Heidelberg, Germany) ranging from 4.45 to 9.6 were used as comparative references in first dimension.

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as described in Shahali *et al.*⁷ Briefly, NCA membranes, either intact for 2-DE or cut in 2.5-mm wide strips for 1-DE and D1-DE screening, were first incubated with serum (1:10 dilution) followed by alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgE Fcε-specific antibodies (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then substrate. For each immunoblot analysis, no serum and the serum from a healthy individual (non atopic, non allergic) were used as negative controls.

BAT

Ethylenediaminetetraacetic acid anti-coagulated whole blood was mixed with a Research-Use-Only (RUO) dried down antibody panel (Duraclone) specific to CD45, CD3, CRTH2,

CD203c and CD63 in addition to activation buffer (Beckman Coulter, Marseille, France) and considered allergenic sources, further incubated at 37°C for 15 minutes. Extracts and purified proteins were the same as those used for immunoblots. After incubation, red blood cells were lysed using CE-IVD OptiLyse C lysis solution and associated protocol (Beckman Coulter) and further analyzed on a RUO 13-color Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Basophils were gated as CD45+, CD3-, low SS and CRTH2+ cells. Activation level was characterized by monitoring the expression of CD203c and CD63. Positive control tubes correspond to anti-IgE stimulation and are used to verify the presence of *ex vivo* reactivity of the considered whole blood sample. The Duraclone based approach for BAT that has been used herein is for RUO and not for diagnostic procedures.

RESULTS

Clinical evaluation

The studied patient is a 40 year-old-man currently living in Paris (northern France) and born in South-west France. He experienced an anaphylactic shock after ingestion of pomegranate (*Punica granatum*, Lythraceae family) and strong oral syndrome after ingestion of Rosaceae fruits (apple and peach). He has seasonal rhinoconjunctivitis during the cypress and birch pollen seasons which overlap in the north of France, relieved by antihistaminic treatment. SPT are positive with birch and cypress pollen extracts.

Biological evaluation: serum IgE binding

Specific IgE antibodies to cypress and birch pollen, peach, citrus, apple, strawberry, kiwi and cherry were found using either an individual classical FEIA or 2 types of IgE multiarray microchips (Table). Despite some inconsistencies, the 3 assays were coherent for IgE reactivities to PR10 allergenic proteins from various sources and also for the major allergens from Cupressaceae pollen Cup a 1 and Cry j 1. No IgE binding was found against LTPs or profilins.

Table. Specific IgEs of studied specimens (case and control) against various extracts or allergens using either an individual classical fluorescence enzyme immunoassay (CAP, kUA/L) or two types of IgE multiarray microchips: ISAC (ISU-E) and FABER (FIU/mL)

Allergenic source	Allergen	Protein family	Case patient			Control patient		
			FABER (FIU/mL)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)	
Pollen								
Birch	E		1.18		27.2		3.7	
Birch	Bet v 1	PR10	19.13	22	31	20	43.4	
Birch	Bet v 2	Profilin	0	0	0	0		
Birch	Bet v 4	Polcalcine		0		0		
Hazelnut tree	E		1.35					
Hazelnut tree	Cor a 1	PR10	1.02	2.9		5.4		
Japanese cedar	E		0.85					
Japanese cedar	Cry j 1	Pectate lyase		0.5		0		
Arizona cypress	E				1.42			
Arizona cypress	Cup a 1	Pectate lyase	0.51	3.6		0		
Alder	Aln g 1	PR10		2.2		3.4		
Plane	E		0				0	
Plane	Pla a 1	Invertase inhibitor	0	0		0		
Plane	Pla a 2	Polygalacturonase		0.25		0.1		
Olive	E		0					
Olive	Ole e 1		0	0.16		0		
Common timothy	E		0				0	
Common timothy	Phl p 1	Expansin	0	0		21	0	
Common timothy	Phl p 4	Berberine bridge enzyme		0.1		0		

(continued to the next page)

Allergenic Gibberellin-Regulated Protein in Pollen and Food

Table. (Continued) Specific IgEs of studied specimens (case and control) against various extracts or allergens using either an individual classical fluorescence enzyme immunoassay (CAP, kUA/L) or two types of IgE multiarray microchips: ISAC (ISU-E) and FABER (FIU/mL)

Allergenic source	Allergen	Protein family	Case patient			Control patient	
			FABER (FIU/mL)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)
Common timothy	Phl p 5	Ribonuclease	0	0.07		1.8	
Bermuda grass	Cyn d 1	Expansin		0.08		7.6	0
Weeds	(All tested)		0	0		0	
Vegetables							
Onion	E		0.94				
Garlic	E		0.85				
Fennel	E		1.85				
Leek	E		0.85				
Celery	Api g 1	PR10	0.51	0.4	1.13	2.7	
Lettuce	E		0.85				
Carrot	E		2.34				
Seed							
Chickpea	E		0.77				
Buckwheat	E		0.85				
Buckwheat	Fag e 2	2S albumin		0		0	
Red amaranth	E		0.94				
Flax	E		1.18				
Peanut	E		0				0.9
Peanut	Ara h 1	7S vicilin	0	0		0.4	0.7
Peanut	Ara h 8	PR10	0.51	1.4		7.4	
Soya	Gly m 4	PR10		0		2.6	0.7
Soya	Gly m 5	b-conglycinin		0		0.2	
Soya	Gly m 6	Glycinin		0		0.2	
Carob	E		0.94				
Nuts							
Chestnuts	E		1.01				
Walnut	E		2.19				0
Walnut	Jug r 1	2S albumin		0		0	
Walnut	Jug r 2	7S globulin	0	0		0.1	
Walnut	Jug r 3	LTP	0	0		0	
Almond	E		1.01				
Brazil nut	E		0				
Brazil nut	Ber e 1	2S albumin		0		0	
Hazelnut	E		0				2.9
Hazelnut	Cor a 1	PR10		1.9		6.7	42.8
Hazelnut	Cor a 8	LTP	0	0		0	0
Cashew nut	E						0.9
Cashew nut	Ana o 3	2S albumin	0	0		1.0	
Pistachio	E		0				1.9
Sesame	E		0				0.6
Sesame	Ses i 1	2S albumin		0		4.4	
Mustard	E						0
Fruits							
Mandarin	E		3.91				
Orange	E				1.38		
Strawberry	E		0.51		0.49		
Apple	E		0		2.62		
Apple	Mal d 1	PR10	1.85	3.2	4.37	11	
Apple	Mal d 3	LTP			0		
Apricot	E		1.01				
Peach	E				1.78		
Peach	E (peel)		0				
Peach	E (pulp)		1.02				
Peach	Pru p 1	PR10		2.5	7.42	9.8	
Peach	Pru p 3	LTP	0	0	0	0.1	
Peach	Pru p 4	Profilin			0		
Peach	Pru p 7	Snakin/GRP	0				

(continued to the next page)

Allergenic Gibberellin-Regulated Protein in Pollen and Food

Table. (Continued) Specific IgEs of studied specimens (case and control) against various extracts or allergens using either an individual classical fluorescence enzyme immunoassay (CAP, kUA/L) or two types of IgE multiarray microchips: ISAC (ISU-E) and FABER (FIU/mL)

Allergenic source	Allergen	Protein family	Case patient			Control patient	
			FABER (FIU/mL)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)	ISAC (ISU-E)	CAP (kUA/L)
Pomegranate	E		0				
Pomegranate	Pun g 1	LTP	0				
Pomegranate	Pun g 5	Hevein-like	0				
Pomegranate	Pun g 7	Snakin/GRP	0				
Pomegranate	Pun g 14	Chitinase	0				
Kiwi	E		0		0.43		6.4
Kiwi	Act d 8	PR10		0.09		3.5	
Cherry	E				1.99		
Fish, crustaceans (All tested)			0	0			
Fish (Cod)	E		0				4.3
Fish (Cod)	Gad c 1	Parvalbumin		0		10	4.7
Fish (Carp)	Cyp c 1	Parvalbumin					8.6
Shrimp	E		0				0
Animals (All tested)			0	0			
Hen's egg white	E		0				7.1
Hen's egg	Gal d 1	Ovomucoid	0	0		0	0
Hen's egg	Gal d 2	Ovalbumin	0	0		0.2	8.1
Cat (Squame)	E		0				0
Cat (Squame)	rFel d 1	Uteroglobin	0	0		3.7	
Horse	rEqu c 1	Lipocalin		0		0.2	
Dust mites (All tested)			0	0	0	0	
Parasites, insects (All tested)			0	0		0	
Venom (Hymenoptera)			0	0		0	
Moulds (All tested)			0	0		0	

Colors are standardized according to the proposed ISAC scale: red, very high; orange, moderate/high; yellow, weak; grey, very weak; and 0, undetectable. IgE, immunoglobulin E.

After separation of proteins by 1-DE or D1-DE, IgE immunoblots were performed on proteins extracted from Cups pollen, potato and fruits reported to contain allergenic GRP: peach, citrus (orange and grapefruit) and pomegranate. Purified native or recombinant proteins from cypress pollen (BP14), peach (peamaclein, Pru p 7) and potato (snakin-1) were also used (Fig. 1A). Specific IgE antibodies against BP14, a 14 kDa cationic protein were evidenced in the total Cups extract (lane 1) and the basic protein fraction (lane 2), and was confirmed on the native purified BP14 (lane 3). The additional IgE reactivity at 43 kDa corresponds to the binding to the major allergen Cup s 1 and Cup s 2^s (Fig. 1A, lanes 1 and 2; Fig. 1B). In peach, IgE reactivities are found against a protein of 20 kDa (lane 4), likely to be Pru p 1 and another of 14 kDa, probably Pru p 7, since Pru p 7 is recognized in purified recombinant form by the patient's serum IgE (lane 5). Moreover, an IgE binding was observed against a single 14-kDa protein in the pomegranate extract (lane 6) in agreement with the severe symptoms reported by the patient upon ingestion of pomegranate. Concerning citrus, only a very weak (non cationic, data not shown) IgE reactivity towards a 15-17 kDa protein was detected in orange and grapefruit pulp extracts (lanes 9 and 10). The recombinant snakin-1 (lane 8) reported to cross-react with BP14 and to share 82% sequence identity with Pru p 7⁴ was recognized by the patient's IgE, and a similar reactivity was also found in total crude potato extract (lane 7). Immunoblot performed with 2-DE separated proteins from cups pollen extract confirmed the IgE binding pattern to Cup s 1, Cup s 2 (cationic 43 and 55 kDa) and BP14 allergen (Fig. 1B).

Biological evaluation: BAT

Finally, the use of BAT allowed us to demonstrate that the basophils of this patient could be activated *ex vivo* with total protein extracts from cypress pollen, peach, pomegranate or orange and also with purified proteins such as BP14 and Pru p 7. Both activation markers, CD63 and

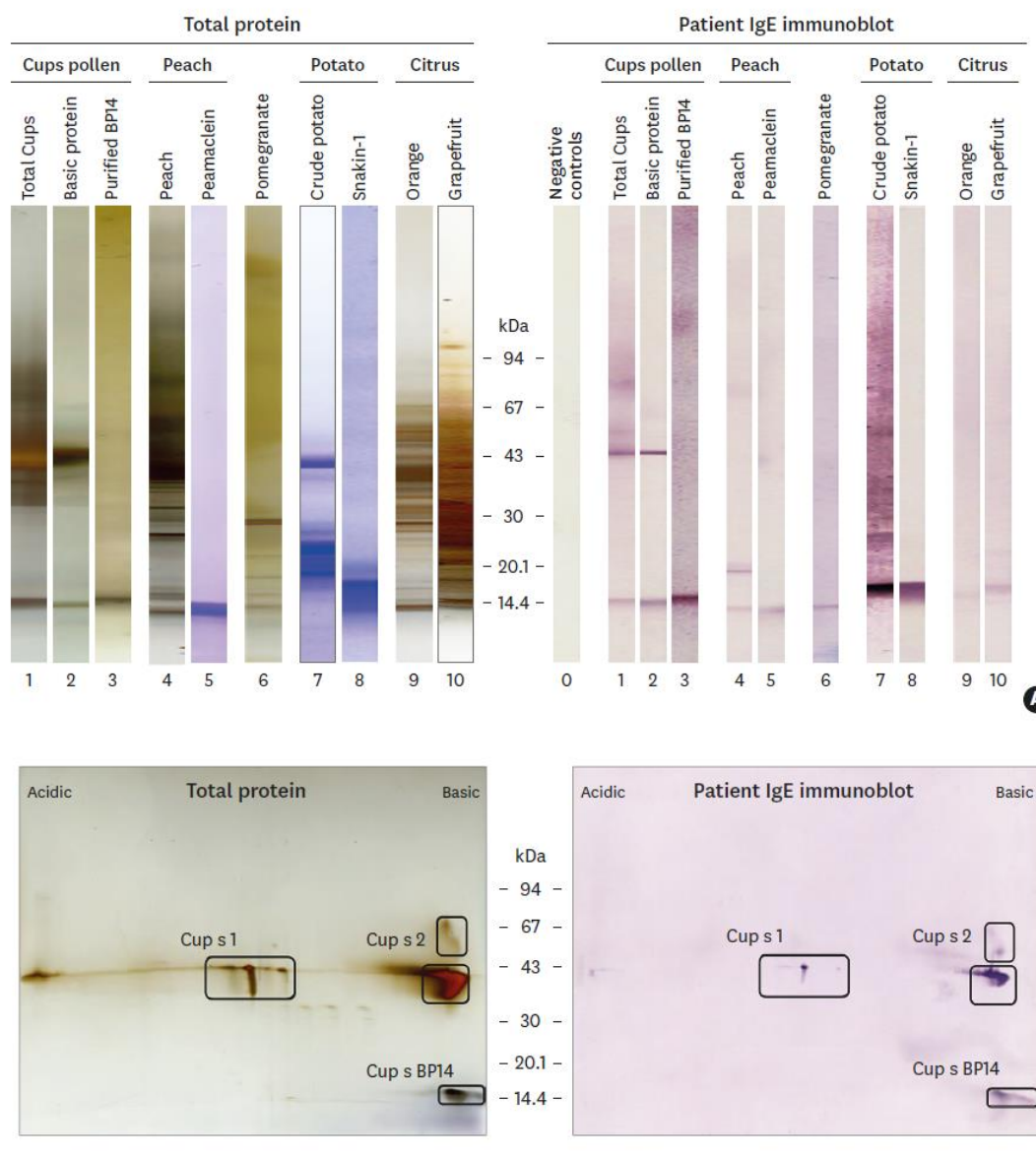


Fig. 1. IgE immunoreactivity to extracts and proteins. (A) SDS-PAGE coomassie blue (lanes 5, 7, 8) or silver nitrate (lanes 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10) stained proteins. IgE immunoblots with patient serum (lanes 0 to 10). Negative controls (B) 2-DE. Left panel: silver-stained total proteins. Right panel: IgE immunoblot with patient serum. Relative molecular masses in kDa. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis.

CD203c, were overexpressed in a dose-dependent manner following addition of allergenic sources to basophils (Fig. 2). Interestingly, while IgE binding of patient's IgE to snakin-1 was observed (Fig. 1A), no basophil activation was shown, in keeping with the tolerance to potatoes mentioned by the patient. Considering the observed *ex vivo* activation of basophils from a control atopic patient, not allergic to cypress pollen but to birch and alder pollen and some foods (Fig. 2 and Table), the used BAT assay might be considered specific in the studied

Allergenic Gibberellin-Regulated Protein in Pollen and Food

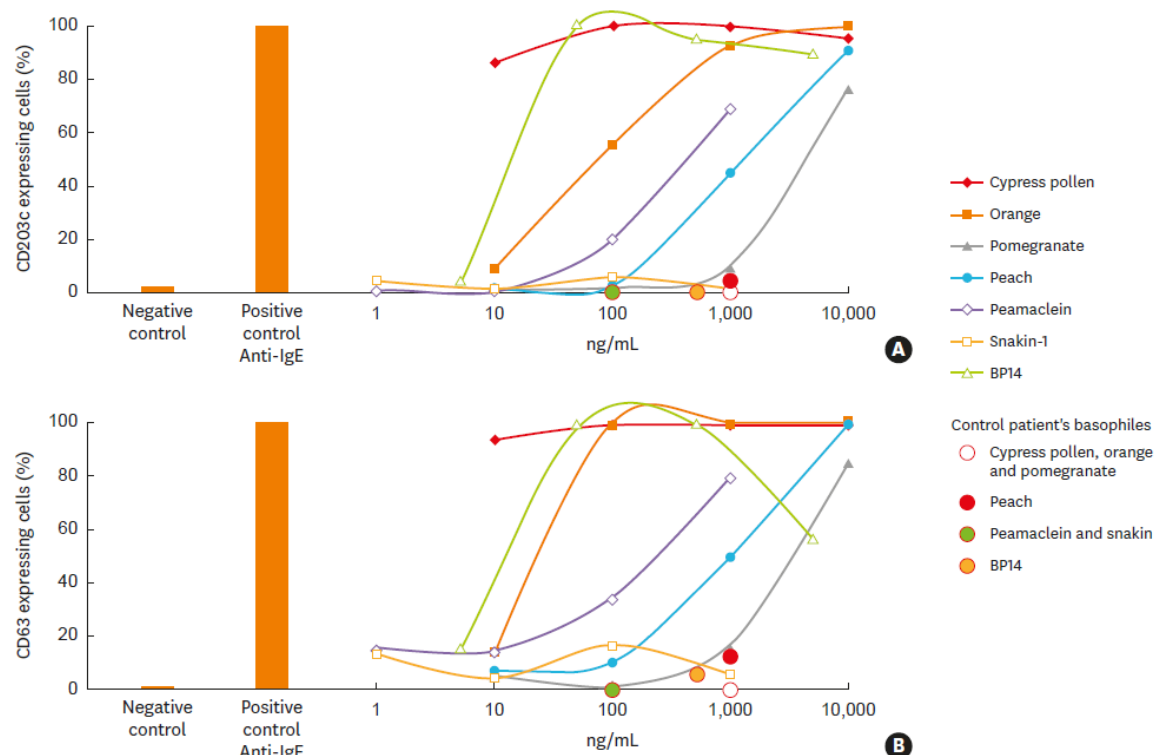


Fig. 2. Basophil activation test: *ex vivo* activation of patient's basophils expressing CD203c (A) or CD63 (B) standardized activation markers (anti-IgE, 100% activation), (no allergen, 0% activation). Four serial concentrations were used: 10 to 10⁴ ng/mL of each extract, 1 to 10³ ng/mL for recombinant proteins and 5 to 5 × 10³ ng/mL for native BP14. One concentration of each allergenic source was used for the control patient's basophils.

case. Indeed, the basophils from this control atopic patient were not activated *ex vivo* by cypress pollen, orange, pomegranate or snakin-1 and only weakly activated by BP14 and peach extracts, in agreement with the results of the presence of specific IgEs to peach (Table).

DISCUSSION

The results show that BP14, the only pollen allergen member of the GRP protein family reported so far, is able to induce *ex vivo* mediator release from basophils of a cypress allergic patient. It is therefore strongly suggested that this allergen is clinically relevant like the cross-reactive allergen Pru p 7 in peach and we can therefore propose that these *ex vivo* reactivities, associated with previously published cross-inhibitions,⁹ are on the basis of the reported PFAS cypress/peach described by Hugues *et al.*³ in 2006.

IgE reactivity was found against a 14 kDa protein in pomegranate extract otherwise able to activate patient's basophils. Despite the negative results obtained with pomegranate allergens tested on the microarray chip, it is tempting to speculate that the IgE binding protein in pomegranate is Pun g 7,¹⁰ because Pun g 7 shares structural (Mr, charge, member of GRP family) and functional properties (allergenicity) with BP14 and Pru p 7.¹¹

GRPs are diversified in structure comprising a variable domain in size and amino acid sequence with a conserved C-terminal domain.⁵ Snakin-1 belongs to this protein family. It shares 82% sequence identity with Pru p 7 and was shown to cross-react with BP14,^{4,9} although to our knowledge, the snakin-1 from potato has not yet been described as an allergen. Moreover, in contrast to Pru p 7, snakin-1 was unable to inhibit the binding of specific IgE to BP14 and to activate patient's basophils which may be related to a lower affinity of cross-reactive BP14 specific IgE antibodies for snakin-1 than for Pru p 7.

Taken together, the results further gain insights into the properties of allergen members of this newly described GRP family. Whether other GRPs in pollen and/or food are specific markers for PFAS remain to be studied.

REFERENCES

- Kim MA, Kim DK, Yang HJ, Yoo YY, Park HS, et al. Pollen-Food allergy syndrome in Korean pollinosis patients: a nationwide survey. *Allergy Asthma Immunol Res.* Forthcoming 2018.
[CROSSREF](#)
- Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015;70:1079-90.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Hugues B, Didierlaurent A, Charpin D. Cross-reactivity between cypress pollen and peach: a report of seven cases. *Allergy* 2006;61:1241-3.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Sénéchal H, Šantrůček J, Melčová M, Svoboda P, Zidková J, Charpin D, et al. A new allergen family involved in pollen food-associated syndrome: Snakin/gibberellin-regulated proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:411-414.e4.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Nahiriak V, Almasia NI, Hopp HE, Vazquez-Rovere C. Snakin/GASA proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signal Behav* 2012;7:1004-8.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Kuddus MR, Rumi F, Tsutsumi M, Takahashi R, Yamano M, Kamiya M, et al. Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2016;122:15-22.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Shahali Y, Sutra JP, Haddad I, Vinh J, Guilloux L, Peltre G, et al. Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2012;33:462-9.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Shahali Y, Sutra JP, Hilger C, Swiontek K, Haddad I, Vinh J, et al. Identification of a polygalacturonase (Cup s 2) as the major CCD-bearing allergen in *Cupressus sempervirens* pollen. *Allergy* 2017;72:1806-10.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Senechal H, Charpin D, Couderc R, Poncet P. Gibberellin-regulated proteins and the enigma of the "missing link". *Rev Fr Allergol* 2018;58:63-7.
- Tuppo L, Alessandri C, Pasquariello MS, Petriccione M, Giangrieco I, Tamburrini M, et al. Pomegranate cultivars: identification of the new IgE-binding protein pommaclein and analysis of antioxidant variability. *J Agric Food Chem* 2017;65:2702-10.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Tuppo L, Alessandri C, Pomponi D, Picone D, Tamburrini M, Ferrara R, et al. Peamaclein--a new peach allergenic protein: similarities, differences and misleading features compared to Pru p 3. *Clin Exp Allergy* 2013;43:128-40.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

Présentation orale à la journée scientifique CPPS à l'école Polytechnique (5 juillet 2018)

Inhibition *ex vivo* par des fullérènes de l'activation de basophiles humains de patients allergiques à l'arachide

Sanaz Keykhosravi^{1,2}, Hélène Sénéchal¹, Rihane Arif³, Jean-Marc Busnel³, Rémy Couderc¹, Pascal Poncet^{1, 4} et Fathi Moussa^{1, 2}.

1) *Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, APHP, Laboratoire de Biochimie*

2) *Letiam EA 7375, Universités Paris-Sud et Paris-Saclay*

3) *Beckman Coulter, Life Science Research, Marseille*

4) *Institut Pasteur, CITECH, Paris.*

Des études ont montré que le [60]fullérène[1] et ses dérivés présentent une large gamme d'activités biologiques dans le domaine biomédical[2, 3]. Ces activités seraient liées aux 30 double-liaisons présentes à la surface de cette molécule sphérique, formée de 60 atomes de carbone[4]. Ces composés présentent des propriétés anti-oxydantes avec des activités cyto- et neuro-protectrices[2-4]. Pour évaluer la capacité des fullérènes à interférer avec des mécanismes cellulaires impliquant un stress oxydatif leurs effets ont été testés sur l'activation des basophiles[5]. Il a été démontré que la stimulation de ce type de cellules par le récepteur de haute affinité aux IgE induit la libération de médiateurs de l'inflammation et s'accompagne de la production de sous-produits du stress oxydatif[6]. Le fullérène ayant une faible solubilité dans les solvants polaires et formant des agrégats, des dérivés hydrosolubles, ont été synthétisés. Le C₆₀ et 4 dérivés hydrosolubles dont fullerène-cyclodextrine (FD), fullerène-sérinyl-malonate (FSM), dendro-[60]fullérène (DF) et poly-hydroxylé, le fullérol ont été utilisés pour étudier leur impact sur l'activation IgE dépendante de basophiles humains. Le test d'activation des basophiles (TAB) est l'une des méthodes utilisées pour le diagnostic des allergies. Cette activation entraîne la libération des médiateurs de l'inflammation et de la réponse immune contenus dans les granules intra cytoplasmiques. Ce test est évalué par l'expression des marqueurs de surface CD63 et CD203c, induite par un allergène, mesurée par cytométrie de flux[6]. L'étude a été réalisée *ex vivo* sur le sang de 5 enfants allergiques aux protéines de l'arachide en présence ou en absence de fullérènes à concentrations variables.

Nos résultats montrent que certains des dérivés testés, notamment le fullérol, le DF et le FSM, pré-incubés (1h) avec les cellules à des concentrations nano-molaires, sont capables de diminuer l'expression de CD203c traduisant une inhibition significative (jusqu'à 20 %) de l'activation des basophiles. Cette inhibition est plus importante avec les dérivés mono-adduit (ex :dendro-fullérène), ce qui suggère que cette inhibition serait liée à la molécule de C₆₀ elle-même, plus accessible pour réagir avec les sites impliqués dans la réponse biologique. L'inhibition n'est observée que pour les concentrations les plus faibles. Au-delà d'un certain seuil de concentration, l'effet diminue de manière significative. Ceci pourrait être lié à l'agrégation des fullérènes[2-4]. Le C₆₀ et ses dérivés n'agissent que lorsqu'ils sont en solution, lorsque la surface de la cage « fullérène » est directement accessible[4]. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences complémentaires sont en cours pour déterminer la taille des agrégats, la bio-localisation des fullérènes et de plus des expériences sur des modèles *in vivo* sont envisagées pour confirmer cet effet antiallergique.

[1] H. W. Kroto et al., *Nature*, vol. 318, pp. 162–163, 1985.

[2] S. Bosi, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 38, no. 11–12, pp. 913–923, 2003.

[3] F. Moussa. *Nanobiomaterials: Nanostructured materials for biomed. appl.* Elsevier S&T Books, 2018.

[4] N. Gharbi, et al. *Nano Lett.*, vol. 5, no. 12, pp. 2578–2585, 2005.

- [5] J. J. Ryan, et al., *The Journal of Immunology* 179 (1): 665–72.
- [6] S. U. Patil et al. *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 134, no. 3, pp. 653–654, 2014.

Fullerenes inhibit *ex vivo* activation of peanut allergic patient's basophilMarie-Ange Selva¹, Rémy Couderc¹, Pascal Poncet^{1,4,*} et Fathi Moussa^{1,2,*}.

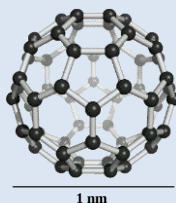
*¹Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, APHP, Laboratoire de Biochimie, ²Letiam EA 7375, Universités Paris-Sud et Paris-Saclay, ³Beckman Coulter, Life Science Research, Marseille, ⁴Institut Pasteur, CI-TECH, Paris. *These authors worked equally in this study.*

Since its discovery, many studies demonstrated that [60]fullerene(1) and its derivatives have various applications in chemical, physical and biomedical fields.(2,257) Fullerene is well known due to its antioxidant and its free radical scavenging activity. These activity is due to the 30 double bonds presenting in this large 60-carbon cage molecule.(2,257,258) For evaluating fullerene capacity in oxidative stress we are tested their effect on activation of cells involving in allergic response.(41) It was reported that FcεRI-mediated basophil/mast cell stimulation induced the liberation of inflammation mediators and accompanied the production of oxidative stress by-products.(259) [60]fullerene has a low solubility in water-based solutions. To increase its solubility the different derivatives with hydrophil groups has been synthesized. In this work [60]fullerene and four [60]fullerene derivatives: [60]fullerene serinol malonate (C60-ser), dendro[60]fullerene, fullerenol and β-cyclodextrin[60]fullerene were utilized to study their activity in allergic response. Basophil activation test (BAT) is one of the methods used for diagnostic of allergy. It is based on the detection of expression of cell surface marker. Basophil activation leads to the release of inflammation mediators and the allergic symptoms. Activated cells are detected by evaluating the expression of CD203c and CD63 by flow cytometry.(259) Our results demonstrated that cells pre-incubated for 1 hour with dendro[60]fullerene, [60]fullerene serinol malonate and fullerenol have lower expression level of CD203c and CD63 comparing with non-treated cells. Inhibition effect is more important in mono adduct fullerene derivatives such as dendro[60]fullerene. This fact may suggest that a mono adduct C₆₀ derivative is more active and/or more accessible comparing with poly adduct derivatives. Otherwise, maximum inhibition effect was observed (up to 32%) in nano molar range and not in higher concentrations. It may be due to concentration-dependent fullerene aggregation phenomenon which changes its antioxidant or free radical scavenger activity.(260) The complementary studies will be performed to: obtain statistically significant results by testing more allergic patients, define the fullerene aggregation size in solution, determine the optimal pre-incubation time with fullerenes.

S Keykhosravi^{1,2}, H Sénéchal¹, R Arif³, JM Busnel³, MA Selva¹, R Couderc¹, P Poncet^{1,4*}, F Moussa^{1,2*}
¹Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, APHP, Laboratoire de Biochimie, équipe Allergie & Environnement, ²LETIAM EA 7375, Universités Paris-Sud, Paris-Saclay, ³Beckman Coulter, Life Science Research, Marseille, ⁴Institut Pasteur, C2RT, Paris. *These authors worked equally in this study.

FULLERENE

60 carbon spherical nanoparticle
(12 pentagones, 20 hexagones)



1 nm

PROPERTIES

- 30 double bonds
- Free radical scavenger
- Anti-oxidant
- Can encapsulate metal atoms (imagery/radiotherapy)

In vivo : animal models

- Increase rat life span
- Prevent CCl₄-induced hepatotoxicity
- Attenuate arthritis in mice
- Protect microvascular endothelial cells
- Improve atopic dermatitis in mice
- Delay aging and stress processes in *Caenorhabditis elegans*
- Improve ulcerative colitis in rats
- Reduce the apomorphine effect in the Aβ1-42-treated rats model of Alzheimer's diseases
- Reduce striatal injury and improve functional outcome in a primate model of Parkinson disease
- Prevent anaphylaxis
- Decrease irradiation damage in zebra fish
- Attenuate neutrophil lung inflammation in mice
- Inhibit asthma pathogenesis in mice

BIOAPPLICATIONS

In vitro

- Inhibit enzymes (proteases, polymerases, ...)
- Suppress microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenase
- Inhibit Aβ1-42 peptide dimerization
- Impact on isolated cells
 - Inhibit cytokines and metabolites production (TNFα, NO, histamine, ROS, tyrosine kinase Syk, NF-κB, IL-1, IL-6, ...)
 - Inhibit cell surface markers
 - Has no toxicity, no effect on cell growth
 - Prevent the catabolic activity of vertebral bone marrow stromal cells

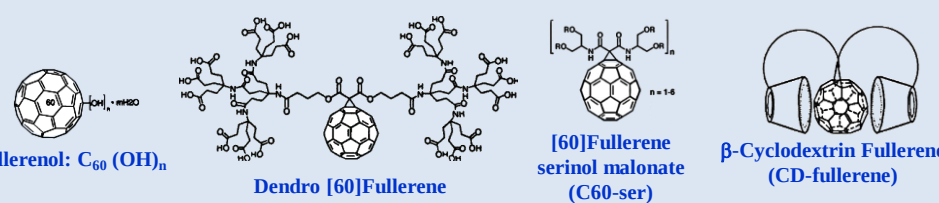
➔ **Anti-inflammatory capabilities**

PROBLEM

Poor solubility of fullerene in polar solvent

SOLUTION

Production of water soluble fullerene derivatives



Fullerenol: C₆₀ (OH)_n

Dendro [60]Fullerene

[60]Fullerene serinol malonate (C60-ser)

β-Cyclodextrin Fullerene (CD-fullerene)



ALLERGIE

Inflammatory responses

Immune responses

Basophile Activation Test (kit Beckman)

Blood from peanut allergic patients

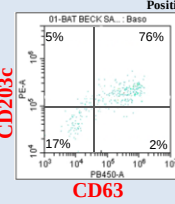
Transfer to Tubes « pre-coated » with fluorescent antibodies to:

CD45, CD3, CRTH2, CD203c, CD63

Incubation at 37°C

Phenotype of gated basophiles:

low SSC, CD45 + CD3 - CRTH2 + CD203c, CD63



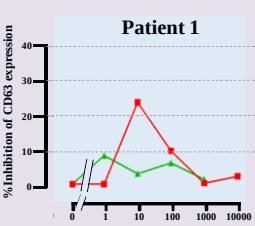
Flow cytometry

RESULTS

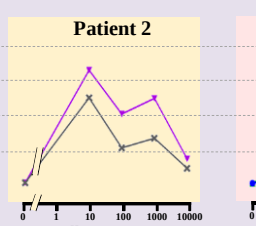
Same results were obtained for CD203c expression

Legend: C₆₀ (blue circle), Dendro [60]fullerene (red square), Fulleranol (green triangle), C₆₀-ser (purple diamond), CD fullerene (grey cross)

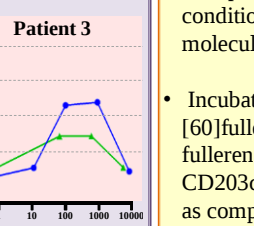
Patient 1



Patient 2

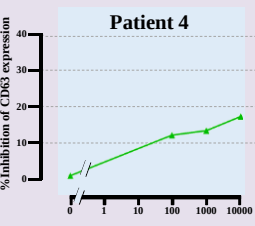


Patient 3



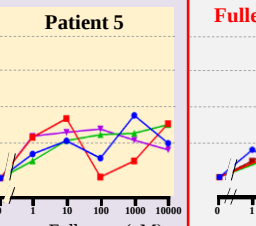
Bell-shape curve: optimal inhibition

Patient 4



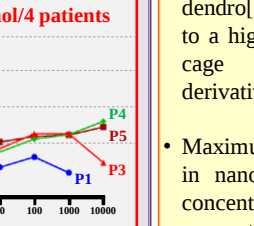
Linear increase: Dose/response effect

Patient 5



Mixt pattern: linear & bell-shape curve

Fullerenol/4 patients



CONCLUSION

- Basophiles were tested ex vivo in natural conditions together with the whole blood molecules and cells of allergic patients.
- Incubation with dendro[60]fullerene, [60]fullerene serinol malonate and fulleranol resulted in an inhibition of CD203c and CD63 expression up to 32% as compared to non-treated cells.
- The inhibition effect is more important in mono adduct fullerene derivatives, such as dendro[60]fullerene. This might be related to a higher accessibility of the 60-carbon cage as compared to polyadduct derivatives.
- Maximum inhibition effect was observed in nanomolar range and not in higher concentrations. This might be due to a concentration - dependent fullerene aggregation decreasing antioxidant and free radical scavenger activities.

Congrès EAACI (Munich, May 2018) Poster oral

Cypress Pollen/Peach associated syndrome: Clinical Exploration and In-Depth Biological Characterization of a Patient Reactive to Both Species

S. Keykhosravi ^{1,2}, R. Arif ³, J-M Busnel ³, I. Mercier ⁴, N. Pham-Thi ⁴, T Aizawa ⁵, A. Gomes ², M-A. Selva ², R. Couderc ², H. Sénéchal ² et P. Poncet ^{2,6}

¹ LETIAM, South-Paris Analytical Chemistry Group, South-Paris University, Orsay, France ² Armand Trousseau Children Hospital, AP-HP, Biochemistry Department, Paris, France ³ Beckman Coulter, Life Sciences Research, Marseille, France ⁴ Institut Pasteur Medical Center, Allergy Department, Paris, France ⁵ Global Institution for Collaborative Research and Education, Laboratory of Protein Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan, ⁶ Institut Pasteur, Center for Innovation and Technological Research, Paris, France.

Background - Increasing evidence of cross reactivity syndromes between pollen grains and fruits, with immediate or delayed reactions, has been reported. While some syndromes such as the birch pollen/apple syndrome are well documented, some other such as the cypress pollen/peach syndrome remain to be understood. For the latter, significant progress has recently been made with the discovery of a new allergen family, the gibberellin regulated proteins (GRPs), which has been shown to be responsible for the observed cross reactivity *i.e.* Pru p 7 and BP14 (1, 2) for the peach and the cypress pollen respectively. GRPs are small cationic proteins with anti-microbial properties and have been shown to be over produced in response to a stress. Herein, the case of a patient, born and raised in the south of France but currently living in Paris, has been studied. This patient has been suffering since childhood from allergic rhinoconjunctivitis to cypress pollen and from some oral symptoms to peach and other fruits (including pomegranate).

Methods – In addition to the clinical exploration and cutaneous tests, a very thorough biological characterization of the patient samples has been performed through various specific IgE quantitation techniques, western blotting after one and two-dimensional gel electrophoresis and flow cytometry based basophil activation testing (BAT).

Results – Specific IgEs to cypress pollen, birch pollen, peach, orange and apple have been found. PR10 allergenic proteins are recognized by IgEs but no LTPs. The presence of specific IgEs to cypress pollen BP14, peach peamaclein (Pru p 7) and a cationic 14 kDa protein from pomegranate has been shown through western blotting after gel electrophoresis separation of the protein extracts. The use of BAT finally enabled to demonstrate that the basophils of this patient were, *ex vivo*, strongly activated with protein extracted from orange and cypress pollen and also with purified proteins such as BP14 and Pru p 7.

Discussion – These results unambiguously show that the cypress pollen GRP, BP14, is clinically relevant, similarly to its homologous protein in peach, Pru p 7. It can be proposed that these two allergens are at the basis of the observed cross-reactivity syndrome.

Conclusion - The search for new cross-reactive allergenic GRPs in pollen, fruits or vegetables may enable to better understand other pollen/food associated syndromes that still remain unexplained.

Bibliographie :

1. Sénéchal et al. JACI 2017;
2. Sénéchal et al. Rev Fr Allergol 2018

13^{ème} congrès CFA (Paris, avril 2018) Poster

Exploration clinique et biologique du cas d'un patient présentant des syndromes d'allergie croisée au pollen de cyprès et à la pêche

S. Keykhosravi ^{1,2}, R. Arif ³, J-M Busnel ³, I. Mercier ⁴, T Aizawa ⁵, M-A. Selva ⁶, R. Couderc ⁶, H. Sénéchal ² et P. Poncet ^{2,7}

¹ LETIAM, Lip(Sys)², Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, AP-HP, Paris, France : ² Laboratoire de Biochimie, Equipe de Recherche Allergie & Environnement, ³ Beckman-Coulter, Immunotech, Marseille, France, ⁴ Institut Pasteur, service d'allergologie Paris, France, ⁵ Global Institution for Collaborative Research and Education, Université d'Hokkaido, Sapporo, Japon, ⁶ Laboratoire de Biochimie, ⁷ Institut Pasteur, CITECH, Paris, France,

Introduction : Les syndromes pollen/fruit sont en augmentation avec des déclenchements parfois tardifs des symptômes croisés chez les patients. Le syndrome cyprès/pêche est moins documenté que celui du bouleau/pomme car ce n'est que récemment qu'une nouvelle famille d'allergène a été décrite, les protéines régulées par la gibbérelline (GRP) comme étant responsable de la réactivité croisée entre la pêche, Pru p 7, et le pollen de cyprès, BP14 (1,2). Les GRPs sont des petites protéines cationiques exprimées en réponse à un stress et qui possèdent des propriétés anti-microbiennes. Le cas d'un patient vivant à Paris, né dans le sud de la France et souffrant depuis son enfance de rhinoconjonctivite allergique au pollen de cyprès et présentant des symptômes oraux d'allergie alimentaire à certains fruits dont la pêche a été étudié.

Méthodes : Outre l'exploration clinique (anamnèse et tests cutanés), différents tests biologiques pour l'étude des réactivités IgE spécifiques ont été utilisés, test unitaire classique, 2 types de microarray, immunoempreinte (après séparation des protéines de différents extraits par électrophorèses en 1 et 2 dimensions) et tests d'activation des basophiles (TAB).

Résultats : Des IgE spécifiques vis-à-vis de pollen de cyprès, de bouleau, de la pêche, de l'orange et de la pomme ont été retrouvées dans le sérum de ce patient. Les immunoempreintes (1 et 2DE), sur extrait de pollen de cyprès, montrent que ce patient a des IgE dirigées contre BP14 et son homologue dans la pêche, la péamacléine (Pru p 7) recombinante. Le TAB de ce patient est très fortement positif vis-à-vis d'extraits d'orange et de pollen de cyprès ainsi que vis-à-vis de la BP14 purifiée et de Pru p 7.

Discussion : La GRP de pollen de cyprès BP14 a par conséquent une pertinence clinique comme son homologue dans la pêche Pru p 7. Ces deux allergènes sont donc à la base des symptômes, IgE-dépendants, pollen/aliments observés.

Conclusion : La recherche de GRP allergéniques dans différents pollen et différents fruits et/ou légumes permettrait de comprendre d'autres syndromes pollen/aliments aux bases structurales encore inexpliquées.

Bibliographie :

1. Sénéchal et al. JACI 2017
2. Sénéchal et al. Rev Fr Allergol 2018



Exploration clinique et biologique d'un patient présentant une allergie croisée au pollen de cyprès et à la pêche

Rech-08 L'allergène croisant BP14 du pollen de cyprès est pertinent au niveau clinique



S. KEYKHOSRAVI^{1,2}, R. ARIF³, J.-M. BUSNEL³, I. MERCIER⁴, T. AIZAWA⁵, M.-A. SELVA²,
R. COUDERC², H. SÉNÉCHAL² et P. PONCET^{1,6}

¹ LETIAM, Lip(Sys)[®], Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ² Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, AP-HP, Laboratoire de Biochimie, Equipe de Recherche Allergie & Environnement, ³ Beckman-Coulter, Immunotech, Marseille, France, ⁴ Institut Pasteur, service d'allergologie Paris, France, ⁵ Laboratoire Science des protéines, Université d'Hokkaido, Sapporo, Japon, ⁶ Institut Pasteur, CITECH, Paris, France.

INTRODUCTION

Allergies croisées pollen/fruit:

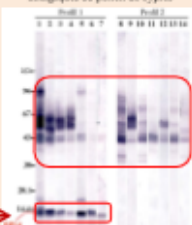
- Nombreuses études sur l'allergie croisée entre pollen de bouleau / pomme
- Très peu d'études sur le syndrome pollen de cyprès/pêche
- Nous avons montré que les réactivités croisées entre la pêche et le pollen de cyprès de Provence (*Cupressus sempervirens*: Cups) décrites de façon clinique sont dues à la présence de protéines de la famille des protéines régularisées par la gibbéréline (GRP) dans ces 2 sources allergéniques, Pru p 7 et la BP14.

- Ragusa et al. (2006) Allergy
- Delbet et al. (2007) Rev Fr Allergol Clin Immunol
- Caton et al. (2014) Allergy

- Sénéchal et al. (2015) J Allergy Clin Immunol
- Sénéchal et al. (2016) Rev Fr Allergol

Réactivités croisées décrites

Immunoréactivité IgE de 14 patients allergiques au pollen de cyprès



Pollen de Cyprès

Pêche

Péamacleïne Pru p 7

- Patient: Homme de 40 ans né dans le sud de la France (Aude) vivant à Paris et souffrant depuis son enfance d'allergie au pollen de cyprès et d'allergie alimentaire à certains fruits dont la pêche et la grenade.

- Symptômes:

- Rhino-conjonctivite et asthme saisonnier durant la saison pollinique du cyprès et du bouleau (se chevauchant au nord de la Loire) soulagés par la prise d'anti-histaminique
- Syndromes oraux très marqués après ingestion de fruits de la famille des rosacées dont la pêche et la pomme
- Chocs anaphylactiques après ingestion de grenade (Lythracées)

- Tests cutanés: positif au pollen de Bétulacées, légers au pollen de cyprès

- Tests biologiques de dosage des IgE spécifiques (IgEs):

- ImmunoCap[®] unitaires, micropuces: ISAC[®] et FABER[®]
- Immunoeempreintes (1 et 2D) sur différents extraits de pollen de Cups et de fruits
- Tests d'activation des basophiles (TAB - Beckman[®]) avec les mêmes extraits qui ont servi pour les immunoeempreintes

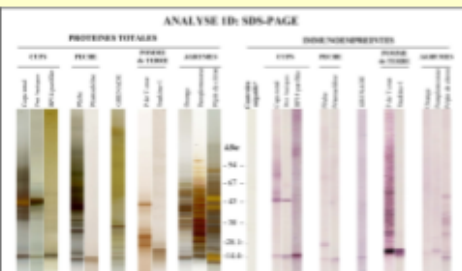
La péamacleïne de pêche, la snakine-1 de pomme de terre, BP14 du pollen de cyprès et une protéine de 14 kDa de grenade sont reconnues par les IgE du patient

- Extraction des protéines par broyage multidirectionnel des sources allergéniques (broyeur MPBiomedicals, FastPrep24).
- Allergènes purifiés recombinants : péamacleïne (Pru p 7), snakine-1
- Allergène purifié natif: BP14

Sensibilisation IgE spécifiques du patient: Pollen de bouleau, pollen de cyprès, PR10

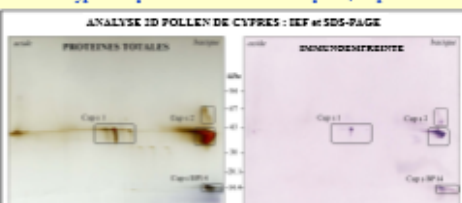
Item	Allergène	Protéine de prévalence	ISAC	ISAC	ISAC	ISAC	ISAC	ISAC
Pollen	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
	Bouleau	0	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44

ANALYSE 1D SDS-PAGE



Pollen de cyprès: le patient est sensibilisé à Cup s 1, Cup s 2 et BP14

ANALYSE 2D POLLEN DE CYPRÈS: SEF et SDS-PAGE



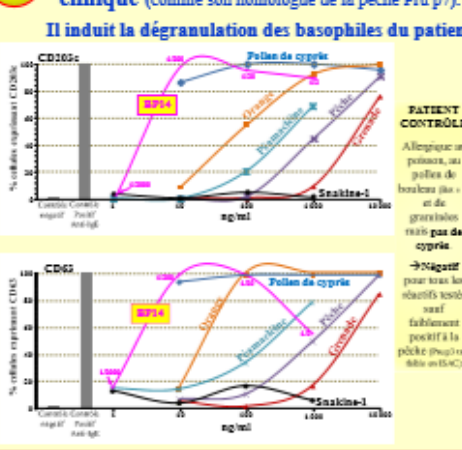
Rappel: la famille des snakin/GRP

- Petites protéines cationiques aux propriétés anti-microbiennes
- 12 cystéines, 6 ponts disulfures
- Résistantes à la trypsine
- Partie C-terminale conservée, partie N-terminale variable
- Présentes dans les fruits et les plantes
- Impliquées dans la maturation du pollen, la réponse de la plante au stress biologique (ex: parasite) ou autre (ex: chaud/froid), la transmission de signaux hormonaux, l'équilibre redox, ...
- La péamacleïne partage 82% d'identité avec la snakine-1 de pomme de terre
- 4 GRP - allergènes dans des fruits: Pru p 7: pêche (*Prunus persica*), Cit s 7: orange (*Citrus sinensis*), Pru m 7: abricot japonais (*Prunus mume*), Pun g 7: grenade (*Punica granatum*)



- Tague et al. 2012, Clin Exp Allergy, 2014, J Allergy Clin Immunol, 2017, J Agric Food Chem
- Jermolov et al. 2017, J Allergy Clin Immunol, 2018, J Allergy Clin Immunol

TAB BP14 du pollen de cyprès a une pertinence clinique (comme son homologue de la pêche Pru p 7). Il induit la dégranulation des basophiles du patient



PATIENT CONTRÔLE
Allergène au pollen de cyprès ou de bouleau (ou s 1) et de granules mais pas de cyprès
→ Négatif pour tous les réactifs testés sauf faiblement positif à la pêche (pas réactif en ISAC)

CONCLUSION:

- Le patient étudié, allergique au pollen de cyprès et à la pêche, est sensibilisé à Cup s 1, 2 et BP14, l'allergène croisant avec Pru p 7 de la pêche. La réactivité IgE à une petite protéine de 14 kDa de la grenade suggère une sensibilisation aussi à Pun g 7.
- BP14 purifié active les basophiles du patient et induit leur dégranulation, il est donc pertinent au niveau clinique, comme Pru p 7.
- La détermination de la séquence peptidique de BP14 et la production d'une molécule recombinante permettront d'affiner le diagnostic des syndromes pollen/aliment