



**HAL**  
open science

## Vers des quantum dots moins toxiques, une approche "safer by design"

Fanny Dussert

► **To cite this version:**

Fanny Dussert. Vers des quantum dots moins toxiques, une approche "safer by design". Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV028 . tel-03227423

**HAL Id: tel-03227423**

**<https://theses.hal.science/tel-03227423>**

Submitted on 17 May 2021

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Fanny DUSSERT**

Thèse dirigée par **Marie CARRIERE (CSV), CEA-Grenoble**

préparée au sein du laboratoire **Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé du CEA de Grenoble**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Vers des quantum dots moins toxiques, une approche « *safer by design* ».**

Thèse soutenue publiquement le **12 novembre 2020**,  
devant le jury composé de :

**Pr. Valérie FOREST**

Professeur à l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, Rapporteur

**Dr. Olivier JOUBERT**

Maître de conférence à l'Université de Lorraine, Rapporteur

**Pr. Vincent BONNETERRE**

Professeur et praticien hospitalier au CHU Grenoble Alpes, Président du jury

**Pr. Elisa BOUTET**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, Examineur

**Dr. Thierry ORSIERE**

Ingénieur de Recherche à l'Université Aix-Marseille, Examineur

**Dr. Marie CARRIERE**

Chercheur CEA-Grenoble, Directrice de thèse

**Dr. Hélène DESQUEYROUX**

Ingénieur de recherche à l'ADEME, Membre invité

**Dr. Peter REISS**

Chercheur CEA-Grenoble, Membre invité





Je remercie chaleureusement les organismes qui ont financé et accueilli ces travaux de thèse :

L'ADEME, le LabEx SERENADE (Aix-Marseille Université) et le CEA





# Remerciements

---

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury : Valérie Forest, Olivier Joubert, Vincent Bonnetterre, Elisa Boutet, et Thierry Orsière, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel, Thierry Rabilloud et Thierry Orsière, qui m'ont apporté leurs conseils ainsi que leurs expertises durant ces 3 ans. Merci pour votre disponibilité, votre pédagogie et vos remarques constructives.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse Marie Carrière, pour m'avoir enrichie de son savoir et pour m'avoir fait confiance au cours de ces 3 ans. Merci pour ton soutien, notamment durant cette année particulière. Merci aussi pour toutes les belles opportunités que j'ai pu saisir grâce à toi durant cette thèse. Cela m'a permis de découvrir diverses choses en dehors du labo et de faire de nombreuses rencontres scientifiques.

Je remercie vivement mon co-encadrant Peter Reiss pour l'apprentissage de la chimie des QDs. Merci pour ta patience et ta disponibilité lorsque j'avais des questions et merci pour les relectures de certaines parties de ce manuscrit.

Merci à L'ADEME et au LabEX SERENADE pour le co-financement de cette thèse. En particulier, merci à Hélène Desqueyroux, ingénieur à l'ADEME, pour le suivi des travaux. Je remercie aussi Valérie Pineau et Maguy Favrelière à l'ADEME, pour leur travail du côté administratif et organisationnel, notamment lors des journées annuelles des doctorants qui permettent des rencontres et des échanges scientifiques riches, dans un cadre convivial.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ces travaux par le biais des nombreuses collaborations effectuées. Plus spécialement, merci à Karl David Wegner et Peter Reiss au STEP, pour les synthèses de QDs et l'apprentissage de la méthode de transfert en phase aqueuse ainsi que la caractérisation physico-chimique. Etienne Omnes de la plateforme Hybriden et Sylvie Motellier à la PNS, pour l'apprentissage des méthodes de vieillissement en enceinte climatique. Didier Gasparutto et Christine Saint-Pierre au CREAB, pour l'aide apportée sur les mesures de spectrométrie effectuées sur la plateforme BIOMADE. Olivier Proux à l'ESRF et Gautier Landrot à SOLEIL, pour leur aide sur les lignes synchrotrons. Géraldine Sarret à l'ISerre, pour les analyses XAS ainsi que pour le temps passé à m'expliquer le fonctionnement des lignes synchrotrons et le traitement des données. Benoit Gallet et Christine Moriscot à l'IBS, pour les mesures de microscopie électronique en transmission.

Pierre-Henri Jouneau de la plateforme de Nanocaractérisation, pour les mesures de microscopie STEM-EDX. Et enfin, Thierry Rabilloud à PROMD, pour l'analyse protéomique et pour l'aide apporté lors du traitement des données.

Un grand merci à toute l'équipe du CIBEST pour la superbe ambiance qui règne au sein du laboratoire, ce fut un réel plaisir de travailler dans cet environnement chaleureux. Merci pour ces 5 belles années passées avec certains d'entre vous (Jean-Luc, Thierry, Marie, Morgane, David, Sylvain...).

Plus spécialement, je remercie les personnes avec qui j'ai tissé de vrais liens d'amitiés durant cette thèse : Antonia, Giovanna, Laura, Xavier, Michaël. Merci pour les bons moments partagés autour des diverses activités effectuées en dehors du labo.

Une pensée toute particulière à mon amie de longue date : Cécile. Même si on ne se voit pas très souvent, merci pour ta présence dans les moments importants.

Enfin, un grand merci à mes parents sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui, à mes frères et sœur : Enzo, Mathis et Amélie, pour leur soutien et leurs encouragements, ainsi qu'à ma plus belle rencontre au cours de cette thèse : Jérémy, merci pour ta grande contribution dans la réussite de ce projet.

# Sommaire

---

Liste des abréviations.....	11
Liste des figures .....	13
Liste des tableaux .....	15
Préambule .....	17
Chapitre 1 : Contexte de l'étude .....	25
1. Les nanomatériaux .....	27
1.1. Définition des nanomatériaux .....	27
1.2. Les applications des nanomatériaux .....	28
1.3. La réglementation des nanomatériaux .....	30
2. L'approche « <i>safer by design</i> » .....	32
2.1. Définition.....	32
2.2. Aspects socio-économiques .....	33
2.3. Aspects environnementaux et de santé publique .....	34
2.4. Nanomatériaux « <i>safer by design</i> » générés dans le cadre du LabEx SERENADE ... .....	36
3. Les quantum dots à base de phosphore d'indium (InP) .....	37
3.1. L'indium.....	37
3.2. Les quantum dots colloïdaux à base de métaux.....	38
3.2.1. Généralités.....	38
3.2.2. La physique des QDs.....	39
3.2.3. La caractérisation des QDs.....	40
3.2.4. Applications des QDs.....	42
3.3. Le développement des nouvelles générations de quantum dots .....	42
4. Les effets des QDs sur la santé .....	44
4.1. Généralités .....	44
4.1.1. Population exposée.....	44
4.1.2. Voies d'exposition et principaux effets .....	45
4.2. Toxicité des quantum dots .....	48
4.2.1. Mécanismes de toxicité cellulaire relatifs aux QDs .....	48
4.2.2. Toxicité de l'indium non nanométrique .....	50
4.2.3. Toxicité des quantum dots d'InP .....	51
4.2.4. Toxicité des éléments de la coquille.....	53
5. La barrière cutanée chez l'Homme.....	54
5.1. Les structures et fonctions .....	54
5.1.1. Généralités.....	54



5.1.2.	L'épiderme .....	55
5.1.3.	Le derme.....	57
5.1.4.	L'hypoderme .....	59
5.1.5.	Les annexes .....	59
5.1.6.	Le microbiote cutané .....	60
<b>5.2.</b>	<b>Les modèles cellulaires in vitro de la barrière cutanée .....</b>	<b>60</b>
5.2.1.	Généralités.....	60
5.2.2.	Le modèle des kératinocytes primaires humains .....	61
<b>5.3.</b>	<b>Les grandes fonctions cellulaires étudiées .....</b>	<b>62</b>
5.3.1.	Les mécanismes de défenses immunitaires .....	62
5.3.2.	Les mécanismes de défenses antioxydants.....	64
5.3.3.	Les autres mécanismes cellulaires étudiés.....	66
	<b>Objectif de l'étude .....</b>	<b>69</b>
	<b>Chapitre 2 : Matériel et Méthodes .....</b>	<b>79</b>
<b>1.</b>	<b>Les quantum dots d'InZnP.....</b>	<b>81</b>
1.1.	Synthèse.....	81
1.2.	Transfert en phase aqueuse .....	82
<b>2.</b>	<b>Viellissement et caractérisation physico-chimique des QDs.....</b>	<b>83</b>
2.1.	Viellissement accéléré en enceinte climatique.....	83
2.2.	Caractéristiques des QDs après synthèse .....	84
2.3.	Mesures d'absorbance en spectroscopie UV-visible (UV-vis) et de photoluminescence (PL).....	87
2.4.	Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) .....	88
2.5.	Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) associée à une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX).....	90
<b>3.</b>	<b>Modèles cellulaires .....</b>	<b>90</b>
3.1.	Les kératinocytes primaires humains mammaires (HKPM).....	90
3.2.	Les modalités d'expositions des HKPM aux QDs.....	93
3.3.	L'observation des HKPM en MET-EDX .....	93
<b>4.</b>	<b>Caractérisation des effets toxiques des QDs sur les HKPM .....</b>	<b>94</b>
4.1.	Evaluation de la cytotoxicité.....	94
4.1.1.	Mesure de l'activité métabolique : test WST-1 .....	94
4.1.2.	Mesure de l'intégrité membranaire : test LDH.....	95
4.1.3.	Comptage des noyaux : marquage Hoechst 33342.....	96
4.2.	Evaluation de la génotoxicité.....	97
4.2.1.	Quantification des lésions de l'ADN : test des comètes.....	97
4.2.2.	Quantification des lésions double-brin de l'ADN : immunomarquage 53BP1 en HCS....	99

4.3.	Quantification des espèces réactives de l'oxygène : H <sub>2</sub> DCFDA et DHR-123 .....	101
4.4.	Evaluation du protéome.....	102
4.4.1.	Observation globale : L'analyse protéomique.....	102
4.4.2.	Quantification du niveau d'expression de certains gènes : RT-qPCR.....	104
5.	Statistiques .....	106
<b>Chapitre 3 : Evolution physico-chimique des quantum dots au cours d'un vieillissement accéléré reproduisant les conditions environnementales.....</b>		<b>111</b>
1.	Introduction .....	113
2.	Article 1 :.....	114
<b>Physicochemical transformation of InP quantum dots during artificial weathering under simulated sunlight and identification of secondary products.....</b>		<b>114</b>
3.	Conclusion.....	139
<b>Chapitre 4 : Développement et optimisation de méthodes de criblage à moyen et haut débit des effets cytotoxiques et génotoxiques .....</b>		<b>141</b>
1.	Comptage des noyaux au Hoechst 33342.....	144
2.	Immunomarquage 53BP1.....	146
3.	Test des micronoyaux.....	150
4.	Marquage CellROX pour l'évaluation des ROS .....	153
5.	Test des comètes à moyen/haut débit.....	154
6.	Discussion et conclusion .....	156
<b>Chapitre 5 : Les effets des quantum dots sur les kératinocytes primaires humains.....</b>		<b>159</b>
1.	Introduction .....	161
2.	Article 2 :.....	162
<b>Toxicological effects of shell designed InP quantum dots on human primary keratinocytes upon environmental aging .....</b>		<b>162</b>
3.	Résultats complémentaires (étude protéomique).....	188
3.1.	Analyse par classification globale .....	188
3.1.1.	L'échelle multidimensionnelle non-métrique (MDS).....	189
3.1.2.	Le <i>clustering</i> hiérarchique.....	190
3.2.	Exploration fonctionnelle.....	192
3.2.1.	Effets des QDs Thick shell et de leur vieillissement sur les kératinocytes primaires humains .....	193
3.2.2.	L'effet du relargage d'ions In <sup>3+</sup> ou Zn <sup>2+</sup> observé lors du vieillissement des QDs.....	196
3.3.	Résultats et discussion.....	198
4.	Conclusion.....	202
<b>Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives.....</b>		<b>205</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>215</b>
	Annexe 1 : Article Frontiers in Chemistry .....	217

Annexe 2 : Article NanoImpact.....	231
Annexe 3 : Résultats de l'analyse protéomique.....	247
Annexe 4 : Communications scientifiques.....	291
<b>Résumé/Abstract .....</b>	<b>294</b>

# Liste des abréviations

---

8-oxodG	8-oxo-2'-désoxyguanosine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMP	AntiMicrobial Peptide
ANSES	Agence Nationale de SEcurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénine TriPhosphate
BPE	Bovine Pituitary Extract
CAT	Catalase
CDK	Cyclines kinases dépendantes
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CLP	Classification, labelling and packaging
DC	Cellule dendritique
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
D-pen	D-penicillamine
ECHA	Agence européenne des produits chimiques
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EDX	Energie dispersive des rayons X
EFSA	Agence européenne de sécurité des aliments
EGF	Epidermal growth factor
GLC	Glutamate-cystéine ligase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HAADF	High-angle annular dark-field
HCS ou HCA	High content scattering (or analysis)
HKPM	Human keratinocytes from plasty mammary
HO	Hème oxygénase
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HSP70 ou HSPA6	Heat shock proteins
IgG	Immunoglobuline G
IL(1 $\beta$ ,6,...)	Interleukines
INERIS	Institut national de l'environnement industriel et des risques
INF	Interférons
INRA	Institut national de la recherche agronomique
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
InVS	Institut national de veille sanitaire
ITO	Indium tin oxide
K-SFM	Keratinocytes serum-free medium
LED	Light-emitting diode

LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MET	Microscopie électronique en transmission
MRE	Metal response element
MT	Métallothionéines
MTF	Metal-responsive transcription factor
NIOSH	National institute for occupational safety and health
NKT	Lymphocytes T “natural killer”
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONG	Organisation non gouvernementale
PBS	Tampon phosphate salin/phosphate buffered saline
pDC	Cellules dendritiques plasmatoïdes
PFA	Paraformaldéhyde
PL	Photoluminescence
PSNH <sub>2</sub>	Polystyrene amino-modified nanoparticles
QDs	Quantum dots
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of CHemicals
ROS	Reactive oxygen species
RoSH	Restriction of Hazardous Substances in electrical and electronic equipments
RT	Reverse transcriptase
SOD	Superoxyde dismutase
STEM	Microscopie électronique en transmission à balayage/scanning transmission electron microscopy
SVF	Sérum de veau fœtal
TCEP	Chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TNF	Facteur de nécrose tumorale /tumor necrosis factor
UFC	Union fédérale des consommateurs
UV	Ultraviolets
UV-vis	UV visible
VLEP	Valeurs limites d'exposition professionnelle
XAS	Spectroscopie d'absorption des rayons X/ X-ray absorption spectroscopy
XPS	spectroscopie photoélectronique X/ X-ray photoelectron spectroscopy
ZnT/ZIP	Zinc transporters

# Liste des figures

---

Figure 1 : Schéma récapitulatif de la composition chimique des trois QDs étudiés au cours de ces travaux de thèse. ....	21
Figure 2 : Les frontières du nanomonde par rapport au monde du vivant. ....	27
Figure 3 : Evolution du nombre de publications sur les nanomatériaux par an depuis 2000... ..	29
Figure 4 : Principales étapes de l'approche « <i>safer by design</i> » des nanomatériaux. ....	33
Figure 5 : Dispersion et transformation des nanomatériaux au cours de leur cycle de vie induisant des risques pour la santé et l'environnement. ....	34
Figure 6 : Dépôt des particules le long de l'arbre respiratoire en fonction de leur taille. ....	36
Figure 7 : Schéma de la structure d'un quantum dot. ....	39
Figure 8 : Schéma adapté de l'évolution de la bande interdite en fonction de la taille du cristal pour les matériaux semi-conducteurs. ....	40
Figure 9 : Schéma adapté de l'absorption et de l'émission des QDs de CdSe-ZnS. ....	41
Figure 10 : Gammes d'émission de différents QDs, modulables en fonction de leurs tailles. ....	43
Figure 11 : Schéma adapté des principaux mécanismes de toxicité cellulaire induits par les nanoparticules. ....	48
Figure 12 : Schéma structurel de la barrière cutanée. ....	55
Figure 13 : Schéma structurel de l'épiderme. ....	56
Figure 14 : Schéma d'un mélanocyte. ....	57
Figure 15 : Schéma structurel du derme. ....	58
Figure 16 : Schéma d'un adipocyte. ....	59
Figure 17 : Kératinocytes primaires humains à forte densité observés en microscopie. ....	61
Figure 18 : Schéma du fonctionnement de l'immunité cutanée. ....	63
Figure 19 : Schéma des différents mécanismes de défenses antioxydants enzymatiques. ....	65
Figure 20 : Régulation des métallothionéines par le zinc et le stress oxydant. ....	66
Figure 21 : Schéma de la localisation des différents transporteurs de zinc dans la cellule humaine. ....	67
Figure 22 : Mécanismes induits par P21. ....	68
Figure 23 : Photos des solutions stocks des QDs synthétisés en phase organique sous éclairage classique (A) et sous éclairage UV (B). ....	81
Figure 24 : Photos des QDs avant et après transfert en phase aqueuse. ....	82
Figure 25 : Photo de l'enceinte climatique Q-SUN Xe-1 ainsi que du système d'agitation pour irradier les échantillons. ....	84
Figure 26 : Caractérisation photophysique des QDs avant fonctionnalisation. ....	85
Figure 27 : Caractérisation chimique des QDs via des mesures EDX. ....	86
Figure 28 : Détermination de la taille des QDs ainsi que leur état d'agrégation et d'agglomération dans le PBS. ....	86
Figure 29 : Schéma du fonctionnement des lignes FAME et SAMBA. ....	89
Figure 30 : Protocole d'exposition des HKPM aux QDs. ....	93
Figure 31 : Observations de comètes en microscopie à fluorescence. ....	99
Figure 32 : Observation des foci de 53BP1 en microscopie automatisée à fluorescence. ....	100
Figure 33 : Plateforme de screening à haut débit CellInsight CX5. ....	101

Figure 34 : Conversion des réactifs H <sub>2</sub> DCFDA et 123 DHR par la cellule en composés fluorescents.....	102
Figure 35 : Mesure de la cytotoxicité des nanoparticules PSNH <sub>2</sub> sur les cellules A549, via le test colorimétrique WST-1 (A) ainsi que le test du marquage fluorescent Hoechst 33342 en HCS (B).....	145
Figure 36 : Observation des foci de 53BP1 dans les noyaux des cellules en A, ainsi que les paramètres de détection par le CellInsight en B.....	146
Figure 37 : Optimisation de la dilution de l'Ac I pour la mise au point du test 53BP1 en HCS sur des cellules A549.....	147
Figure 38 : Evaluation des cassures double-brin de l'ADN après exposition des cellules A549 pendant 24 h à des résidus d'abrasion de peintures non vieilles (0 h) ou préalablement vieilles en enceinte climatique pendant 500 h et 1000 h.....	149
Figure 39 : Evaluation de la cytotoxicité des résidus de peintures non vieillis ou préalablement vieillis en enceinte climatique pendant 500 h et 1 000 h après exposition des cellules A549 pendant 24h. ....	149
Figure 40 : Observation des cellules binucléées possédant des micronoyaux en A, ainsi que les paramètres de détection par le CellInsight en B.....	151
Figure 41 : Test des micronoyaux après exposition des cellules A549 pendant 24 h à des slurries de peintures à base de TiO <sub>2</sub> .....	152
Figure 42 : Optimisation de la méthode d'évaluation des ROS par le marquage au CellROX deep red. ....	153
Figure 43 : Optimisation de la concentration en Ir (IV) pour la détection de lésions 8-oxoG par le test des comètes.....	156
Figure 45 : Représentation MDS en 2D des échantillons analysés en protéomique en fonction de leur similarité.....	190
Figure 46 : Représentation en dendrogramme, des échantillons analysés en protéomique en fonction de leur similarité.....	192
Figure 47 : Schéma récapitulatif de la composition chimique des trois QDs étudiés au cours de ces travaux de thèse.....	207
Figure 48 : Schéma bilan des travaux de thèse. ....	210

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Exemples d'applications des nanomatériaux classés par secteurs d'activité. ....	28
Tableau 2 : Classification des phototypes selon l'échelle de Fitzpatrick. ....	62
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR. ....	106
Tableau 4 : Processus biologiques mis en évidence dans chaque cluster après analyse des différentes listes de protéines par le logiciel DAVID, après exposition des kératinocytes aux QDs Thick shell vieillis (V) et non vieillis (NV). ....	194
Tableau 5 : Processus biologiques mis en évidence dans chaque cluster après analyse des différentes listes de protéines par le logiciel DAVID, concernant l'exposition des kératinocytes aux ions $\text{In}^{3+}$ et $\text{Zn}^{2+}$ . ....	197





# **Préambule**



Les nanocristaux semi-conducteurs colloïdaux fluorescents, également connus sous le nom de Quantum Dots (QDs), possèdent des propriétés optiques uniques, ce qui les rend attrayants dans les domaines de l'optoélectronique et de l'imagerie biomédicale. Ils améliorent la pureté et la précision de la reproduction des couleurs grâce à certaines caractéristiques telles que : une résistance élevée au photoblanchiment, une forte photoluminescence avec un spectre d'excitation très large et un spectre d'émission étroit pouvant aller du visible au proche infrarouge. Leur rendement quantique est également intéressant avec une stabilité en milieux aqueux qui reste supérieure aux fluorophores organiques [1].

Même si leur découverte remonte aux années 80s, ce n'est qu'au cours de ces 20 dernières années que le marché des QDs a explosé, notamment dans l'industrie des écrans de télévisions et tablettes ainsi que celle des panneaux photovoltaïques [2]. Les plus populaires sont les QDs à base de cadmium (CdSe et CdTe). Cependant, depuis 2012, le cadmium (Cd) est classé dans la catégorie des agents cancérigènes certains (groupe 1) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) [3]. Les études de toxicité *in vivo* réalisées par injection des QDs à base de Cd dans des rats et des souris mettent en avant une augmentation des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant. Elles montrent également une élévation du taux de cassures de l'ADN ainsi que l'apparition d'aberrations chromosomiques, ce qui révèle une forte génotoxicité [4]. Ces résultats sont confirmés par des études *in vitro* qui démontrent une forte cytotoxicité de ces QDs ainsi qu'une augmentation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsable de l'élévation du stress oxydant et à l'origine de lésions de l'ADN [4]. Ces lésions, si elles s'accumulent dans les cellules, peuvent donner lieu à des mutations et au développement de cancers chez l'Homme. Les mécanismes de toxicité des QDs, qui ne sont pas totalement connus de nos jours, sont en partie dus à leur dissolution. Ils libèrent alors des ions toxiques, comme par exemple les ions  $Cd^{2+}$  [4]. L'utilisation du Cd, à l'origine de nombreux débats, a été réglementé par la directive européenne RoHS 2002/95/CE (*Restriction of the use of certain Hazardous Substances in electrical and electronic equipment*) qui vise à limiter l'utilisation de substances dangereuses notamment dans les équipements électriques et électroniques [5]. Cela a poussé les industries et les laboratoires de recherche à trouver des alternatives pour réduire la toxicité des QDs.

Actuellement, l'alternative en plein essor est l'approche « *safer by design* », qui a pour but d'optimiser le rapport bénéfices/risques des nanomatériaux dès leur conception [6]. Une des solutions pour réduire la toxicité des QDs est de les recouvrir d'une ou plusieurs coquilles constituées de soufre et de zinc (ZnS) pour protéger le cœur qu'elles renferment. Ces coquilles

ont pour double effet de renforcer les propriétés optiques et d'éviter la dissolution du cœur, empêchant ainsi le relargage des ions toxiques [4], [7]. Cependant, la présence de coquilles ralentit la dégradation des QDs mais n'empêche pas leur dissolution à long terme [8]. Une autre alternative complémentaire à la précédente est de remplacer le cœur de Cd par un élément moins toxique. Actuellement, l'élément très étudié et prometteur est le phosphore d'indium (InP). C'est sur cet élément que repose ce travail de thèse. De précédentes études sur les QDs à base d'InP montrent une nette diminution de la toxicité en comparaison avec les QDs à base de CdSe, tout en conservant les mêmes propriétés optiques [9], [10]. D'autres paramètres pouvant influencer la toxicité des QDs ont également été étudiés comme l'influence de la taille, de la réactivité de surface ou encore de la fonctionnalisation par différents ligands et notamment de la charge globale que ces derniers confèrent aux QDs [11]–[14]. Ces différents points seront détaillés dans ce manuscrit.

Un autre enjeu important de l'approche « *safer by design* » est de concevoir un nanomatériau qui reste stable et peu toxique tout au long de son cycle de vie. Même si des techniques de recyclage de l'indium commencent à voir le jour en Allemagne et au Japon, la plupart des nanomatériaux finissent leurs vies enfouis sous terre [15]. Ces déchets, présents en très grande quantité, sont en partie à l'origine de la pollution des sols. En effet, les QDs sont composés de métaux lourds qui peuvent, si leur stabilité n'est pas maîtrisée, libérer des éléments toxiques dans le sol, qui sont ensuite lixiviés par les eaux de pluies et qui se retrouvent bioaccumulés dans les plantes, puis dans les animaux et plus généralement dans notre chaîne alimentaire. Il est donc important de connaître la toxicité des QDs après synthèse mais également après vieillissement dans l'environnement. Cette approche reste peu mise en œuvre et peu de données sont présentes dans la littérature [8], [16].

Le travail de cette thèse repose sur trois grands axes, le premier étant la caractérisation de trois types de QDs à base d'InP, synthétisés au laboratoire. Ils sont composés d'un noyau de phosphore d'indium et de zinc (InZnP), recouvert soit d'une coquille de type gradient composée de zinc, de sélénium et de soufre (Zn(Se,S)), soit d'une double coquille. La première coquille de Zn(Se,S) est alors recouverte d'une couche supplémentaire de ZnS (Figure 1). Nos collaborateurs chimistes ont également conçu des coquilles dont l'épaisseur est soit fine soit épaisse, ce qui permet d'obtenir des QDs d'environ 4 à 6 nm [8]. La caractérisation de ces trois types de QDs a été réalisée sur les composés natifs ou vieillis, grâce aux techniques de microscopie électronique en transmission associées à l'analyse dispersive en énergie par rayonnements-X (MET-EDX), spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS et XANES),

spectroscopie UV-visible et fluorescence. Le deuxième axe correspond à la mise au point de tests de toxicité divers, sur un microscope automatisé, pour le screening des effets de nanoparticules, ce qui pourrait permettre de systématiser les tests afin d'obtenir une banque de données en nanotoxicologie qui pourrait éventuellement servir pour la réglementation. Enfin, le troisième axe correspond à l'étude toxicologique détaillée des trois types de QDs vieilliss *versus* non-vieillis, ainsi que la recherche des mécanismes de toxicité grâce aux mesures de cytotoxicité et de génotoxicité, l'évaluation du stress oxydant ainsi que des mesures de l'expression de certains gènes et protéines.

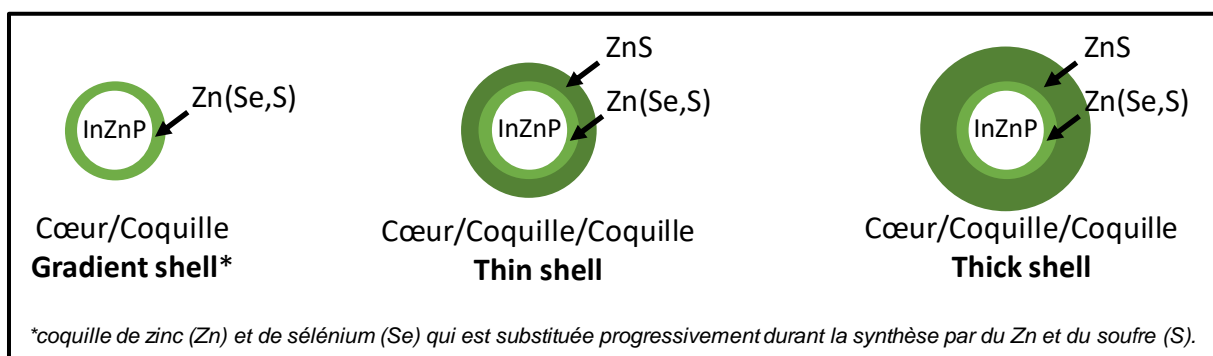


Figure 1 : Schéma récapitulatif de la composition chimique des trois QDs étudiés au cours de ces travaux de thèse.

Ce manuscrit est divisé en 6 chapitres :

- Le chapitre 1 résume l'état de l'art sur la toxicité des QDs à base d'InP, les potentielles voies d'expositions ainsi que l'approche « *safer by design* ». Il fait également le bilan de la réglementation en vigueur sur ces composés. L'objectif de l'étude est présenté à la fin de ce chapitre.
- Le chapitre 2 détaille les différentes méthodes et approches expérimentales utilisées.
- Le chapitre 3 est consacré aux résultats de caractérisation des différents QDs d'InZnP ainsi que leur évolution physico-chimique au cours de vieillissements accélérés dans une enceinte climatique mimant une dégradation environnementale.
- Le chapitre 4 présente le développement et l'optimisation de méthodes de criblage à moyen débit sur un microscope automatisé pour la réalisation de tests de toxicité.
- Le chapitre 5 décrit tous les résultats de toxicité des différents QDs d'InZnP vieilliss *versus* non vieilliss sur des kératinocytes primaires humains. Les mécanismes de toxicité sont également recherchés dans ce chapitre.
- Le chapitre 6 conclut le travail effectué par une discussion générale et présente les perspectives qui découlent de cette étude.

Les références bibliographiques sont répertoriées à la fin de chaque chapitre et les annexes sont placées à la fin du manuscrit.

## **Références :**

- [1] M. Claudel, « Carbon dots: synthèse pour des études toxicologiques et développement d'outils théranostiques », p. 191.
- [2] « Les milles usages du quantum dot », *Techniques de l'Ingénieur*.  
<https://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/articles/les-milles-usages-du-quantum-dot-2173/> (consulté le déc. 18, 2019).
- [3] « List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans ». <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications/> (consulté le déc. 18, 2019).
- [4] P. Reiss, M. Carrière, C. Lincheneau, L. Vaure, et S. Tamang, « Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials », *Chem. Rev.*, vol. 116, n° 18, p. 10731-10819, sept. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00116.
- [5] « REGLEMENTATIONS - Directive RoHS », *Eco-3e*, oct. 18, 2011.  
<http://eco3e.eu/reglementations/rohs/> (consulté le mars 06, 2020).
- [6] « Veillenanos, une veille citoyenne sur les nanos : NanoSafeByDesign ». <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=NanoSafeByDesign> (consulté le déc. 18, 2019).
- [7] M. Ando, M. Horie, Y. Akazawa-Ogawa, Y. Hagihara, N. Murase, et Y. Shigeri, « Cytotoxicity of CdSe-based quantum dots incorporated in glass nanoparticles evaluated using human keratinocyte HaCaT cells », *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, n° 1, p. 210-213, janv. 2016, doi: 10.1080/09168451.2015.1069702.
- [8] K. D. Wegner *et al.*, « Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity », *Front. Chem.*, vol. 7, p. 466, juin 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00466.
- [9] D. H. Atha *et al.*, « Quantifying engineered nanomaterial toxicity: comparison of common cytotoxicity and gene expression measurements », *J. Nanobiotechnology*, vol. 15, n° 1, p. 79, déc. 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0312-3.
- [10] V. Brunetti *et al.*, « InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment », *Nanoscale*, vol. 5, n° 1, p. 307-317, 2013, doi: 10.1039/C2NR33024E.
- [11] J. Liu *et al.*, « Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, p. 222-231, déc. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.07.044.
- [12] T. Chen *et al.*, « Cytotoxicity of InP/ZnS Quantum Dots With Different Surface Functional Groups Toward Two Lung-Derived Cell Lines », *Front. Pharmacol.*, vol. 9, p. 763, juill. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00763.
- [13] A. Hoshino *et al.*, « Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification », *Nano Lett.*, vol. 4, n° 11, p. 2163-2169, nov. 2004, doi: 10.1021/nl048715d.
- [14] Y. Tang *et al.*, « The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core-shell quantum dots », *Biomaterials*, vol. 34, n° 34, p. 8741-8755, nov. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.087.
- [15] Y. Traore, « Perspective nouvelle pour la récupération de l'indium issu des e-déchets par électrodéposition dans les liquides ioniques à température ambiante », p. 260.
- [16] A. Tarantini *et al.*, « Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation », *NanoImpact*, vol. 14, p. 100168, févr. 2019, doi: 10.1016/j.impact.2019.100168.





**Chapitre 1 :**  
*Contexte de l'étude*



# 1. Les nanomatériaux

## 1.1. Définition des nanomatériaux

Les nanomatériaux font partie du nanomonde, c'est-à-dire de l'infiniment petit (Figure 2). En effet, le préfixe « nano » trouve son origine dans le grec ancien « nanos » qui signifie « nain/de très petite taille ». Il peut s'agir de poudres, d'aérosols, de gels, de suspensions liquides ou colloïdales constitués d'éléments de taille nanométrique. L'unité de référence établie par le système international est le nanomètre (nm). Un nanomètre correspond à un milliardième de mètre ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), ce qui est environ 50 000 fois plus petit que l'épaisseur d'un cheveu [1].

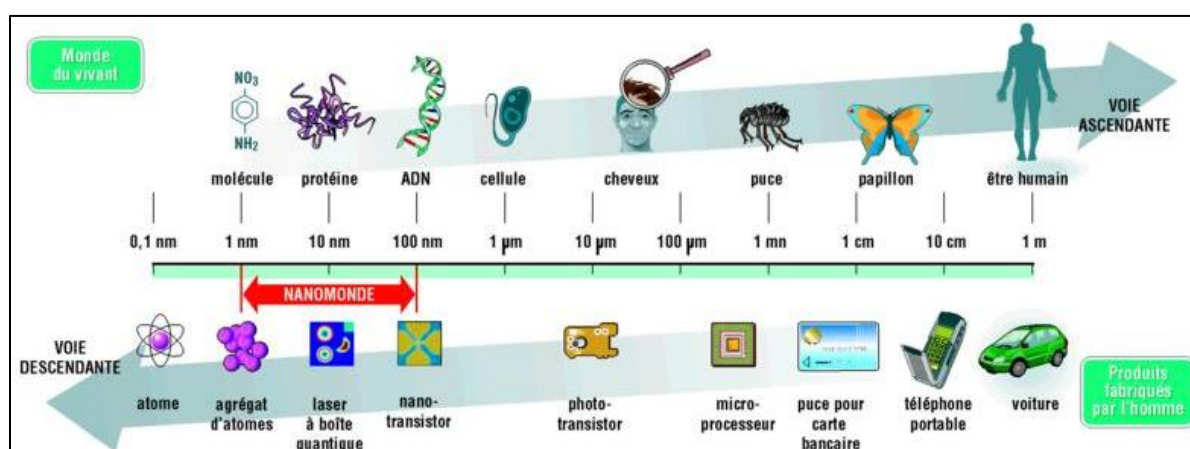


Figure 2 : Les frontières du nanomonde par rapport au monde du vivant [2].

Les nanomatériaux sont issus des nanotechnologies, faisant appel aux nanosciences qui étudient la matière à l'échelle atomique et moléculaire. Un nanomatériau est défini par la commission européenne en octobre 2011 comme étant « *un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm* ». Cette recommandation prévoit également de prendre en compte la surface spécifique de ces objets: « *Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition établie précédemment dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$*  » [3].

Même si certains nanomatériaux sont d'origine naturelle comme, par exemple, les particules ultrafines dans les fumées de volcans, la plupart sont produits par l'Homme. Ils peuvent être produits de façon intentionnelle, c'est ce que l'on appelle « nanomatériaux manufacturés » et c'est le cas des quantum dots, qui sont le sujet de cette thèse. Ils peuvent aussi être le résultat de procédés thermiques et mécaniques produits de manière non-

intentionnelle, comme par exemple les particules s'échappant du pot d'échappement des voitures. Les nanomatériaux sont classés en deux grandes familles : les nano-objets et les matériaux nanostructurés. Parmi les nano-objets, il existe trois catégories : les nanoparticules qui possèdent 3 dimensions nanométriques, les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobatonnets qui n'ont que 2 dimensions nanométriques et les nano-feuillets, nano-films ou nano-plaquettes qui ne possèdent qu'une dimension nanométrique (on entend ici par nanométrique une dimension comprise entre 1 et 100 nm). En ce qui concerne les matériaux nanostructurés, ce sont des matériaux qui ont une structuration (interne ou de surface) à l'échelle nanométrique. Leur rapport surface/volume est alors très important ce qui leur permet d'acquérir des propriétés uniques, comme par exemple, le confinement des électrons dans les quantum dots [4].

## 1.2. Les applications des nanomatériaux

Les nanomatériaux sont omniprésents et les secteurs d'activité dans lesquels ils sont employés sont vastes. Ils sont présents, par exemple, dans le secteur de l'automobile, mais aussi dans le secteur de la cosmétique en passant par les secteurs de l'agroalimentaire ou encore de la défense (Tableau 1). Un nanomatériau peut avoir diverses applications et sert, en général, dans plusieurs domaines. Par exemple, les QDs qui nous intéressent particulièrement dans cette thèse, servent dans les domaines de l'optoélectronique, dans la conception de panneaux photovoltaïques et également dans le domaine de l'imagerie biomédicale [5]. Le marché des nanomatériaux est très important et n'a cessé de croître ces dernières années. L'intérêt scientifique est très important, comme en témoigne la forte augmentation du nombre d'articles publiés au cours des 20 dernières années (Figure 3).

Tableau 1 : Exemples d'applications des nanomatériaux classés par secteurs d'activité (tableau adapté du rapport de l'INRS [1]).

<b>SECTEURS D'ACTIVITE</b>	<b>EXEMPLES D'APPLICATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES</b>
<b>Automobile, aéronautique et aérospatial</b>	Matériaux renforcés et plus légers, peintures extérieures avec effets de couleur (plus brillantes, anti-rayures, anti-corrosion et anti-salissures), capteurs optimisant les performances des moteurs, détecteurs de glace sur les ailes d'avion, additifs pour diesel permettant une meilleure combustion, pneumatiques plus durables et recyclables, ...
<b>Electronique et communications</b>	Mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés, cellules solaires, bibliothèques électroniques de poche, ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides, technologie sans fil, écrans plats ...

<b>Agroalimentaire</b>	Emballages actifs, additifs, colorants, anti-agglomérants, émulsifiants, ...
<b>Chimie et matériaux</b>	Pigments, charges, poudres céramiques, inhibiteurs de corrosion, catalyseurs multi-fonctionnels, textiles et revêtements anti-bactériens et ultra-résistants, ...
<b>Construction</b>	Ciments autonettoyants et anti-pollution, vitrages autonettoyants et anti-salissures, peintures, vernis, colles, mastics, ...
<b>Pharmacie et santé</b>	Médicaments et agents actifs, surfaces adhésives médicales anti-allergènes, médicaments sur mesure délivrés à des organes précis, surfaces bio-compatibles pour implants, vaccins oraux, imagerie médicale, ...
<b>Cosmétique</b>	Crèmes solaires transparentes, pâtes à dentifrice abrasives, maquillage avec une meilleure tenue, ...
<b>Energie</b>	Cellules photovoltaïques nouvelles générations, nouveaux types de batteries, fenêtres intelligentes, matériaux isolants plus efficaces, entreposage d'hydrogène combustible, ...
<b>Environnement et écologie</b>	Diminution des émissions de dioxyde de carbone, production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer, pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageable, analyseurs chimiques spécifiques, ...
<b>Défense</b>	Détecteurs d'agents chimiques et biologiques, systèmes de surveillance miniaturisés, systèmes de guidage plus précis, textiles légers et qui se réparent d'eux-mêmes ...

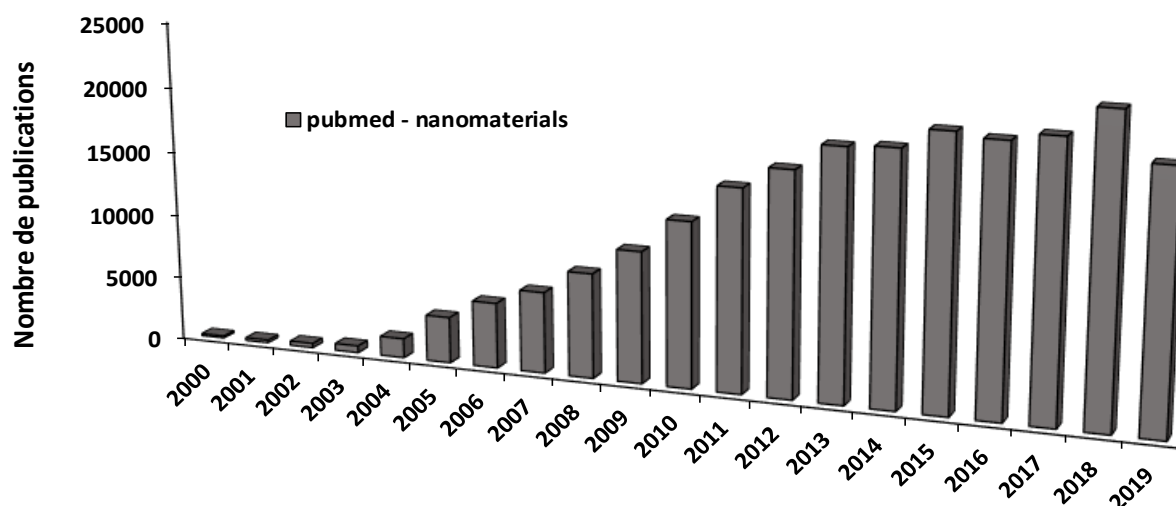


Figure 3 : Evolution du nombre de publications sur les nanomatériaux par an depuis 2000 (recherche PubMed le 20/02/2020).

### 1.3. La réglementation des nanomatériaux

Pour permettre une traçabilité des substances à l'état nanoparticulaire produites, utilisées et importées, la France a mis au point en 2009 un dispositif de déclaration pour l'utilisation, l'importation et la fabrication de nanomatériaux (loi Grenelle I du 03/08/2009) qui a été rendue obligatoire le 1<sup>er</sup> janvier 2013. Ainsi, les entreprises doivent déclarer toutes les substances fabriquées, utilisées ou importées en quantité supérieure à 100 grammes sur le registre R-Nano [6]. Ces données sont ensuite traitées par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui publie un rapport de synthèse chaque année. Par exemple, en 2018, le rapport mentionne 387 886 tonnes de substances « nano » importées, fabriquées ou distribuées en France en 2017 [7].

En ce qui concerne l'évaluation des risques pour la santé et l'environnement, l'utilisation des nanomatériaux est à l'origine de nombreux débats. Actuellement, les nanoparticules sont réglementées au niveau européen, comme toute substance chimique, par le règlement REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of CHemicals*). Pour se conformer à cette réglementation, les entreprises doivent démontrer la bonne gestion du risque des produits chimiques qu'elles commercialisent dans l'Union Européenne auprès de l'Agence Européenne des produits Chimiques (ECHA). Il est à noter que cette réglementation européenne possède une portée mondiale puisque les industriels non européens qui souhaitent commercialiser leurs produits sur le marché européen doivent être en accord avec celle-ci. Jusqu'à récemment, ce règlement ne tenait pas compte de l'état nanoparticulaire des substances. L'évaluation des risques était donc basée sur la composition chimique des substances « nano ». Cependant, un certain nombre d'études mettant en évidence une variation de la toxicité des substances chimiques en fonction de leur taille ont commencé à voir le jour ces dernières années. C'est pourquoi les autorités ont revu et modifié le règlement pour intégrer les substances de formes nanoparticulaires dans l'évaluation des risques. Il s'agit du Règlement (UE) 2018/1881 de la commission du 03/12/2018 qui est entré en vigueur le 1<sup>er</sup> janvier 2020. [8], [9]

Il est important de noter qu'actuellement, aucune réglementation spécifique aux nanomatériaux n'est définie pour protéger les travailleurs. En attendant, les travailleurs qui sont potentiellement exposés à ces substances « nano » sont soumis aux règles du code du travail concernant la prévention des risques mises au point pour les agents chimiques dangereux, cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques. Certaines valeurs limites d'exposition

professionnelle (VLEP) aux nanomatériaux sont données à titre indicatif par différents organismes, et visent à réduire au maximum l'exposition. Par exemple, pour le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), une agence fédérale américaine (le NIOSH : *National Institute for Occupational Safety and Health*) a établi deux VLEP, à savoir  $2,4 \text{ mg/m}^3$  pour le  $\text{TiO}_2$  fin et  $1 \text{ }\mu\text{g/m}^3$  pour le  $\text{TiO}_2$  ultrafin ( $< 100 \text{ nm}$ ). Cependant ces valeurs ne garantissent pas une sécurité absolue puisqu'elles ne sont pas basées sur des études toxicologiques [1]. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a publié un rapport basé sur le principe de précaution et recommande des études épidémiologiques pour suivre l'état de santé des travailleurs exposés aux substances nanoparticulaires [10]. L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) a également rédigé un guide sur la prévention des risques des nanomatériaux dans les laboratoires [4]. Des certifications commencent aussi à se développer dans le domaine de la sécurité au poste de travail comme NanoCERT, développé par l'Institut National de l'Environnement Industriel et des RISques (INERIS), avec la mise en place de référentiels [11]. Une étude de surveillance épidémiologique des travailleurs exposés aux nanomatériaux (EpiNano) a été mise en place en 2014 par l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS). Cette étude permet de suivre l'état de santé des travailleurs exposés aux nanoparticules au cours du temps. Elle cible principalement les nanoparticules de dioxyde de titane ainsi que les nanotubes de carbone pour lesquels un certain nombre de données toxicologiques sont déjà disponibles, et qui présentent un danger pour la santé.

Pour les consommateurs, un autre règlement est entré en vigueur le 1er juin 2015. Il concerne l'obligation d'étiquetage et d'emballage des substances et mélanges avant leur mise sur le marché (règlement européen CLP : *Classification, Labelling and Packaging*) [12]. Pour les substances nanoparticulaires, l'étiquetage de la mention [nano] est obligatoire en Europe sur trois classes de produits : dans les produits cosmétiques depuis juillet 2013 (règlement cosmétique (CE) n°1223/2009), les produits biocides depuis septembre 2013 (règlement biocides (UE) n°528/2012) et dans l'alimentation, initialement prévu en décembre 2014 puis retardé par la pression des lobbys industriels à octobre 2015 (réglementation nouveaux aliments (UE) n°2015/2283) [13]. Ces règlements s'appliquant seulement à quelques secteurs d'activité spécifiques, d'autres produits, auxquels la population est très exposée et qui sont susceptibles de contenir des nanomatériaux, ne sont pas réglementés, notamment les textiles, détergents, peintures, dispositifs médicaux, ...

Les associations citoyennes et organisations non gouvernementales (ONG) font preuve d'une grande vigilance face aux nanomatériaux. Ils veillent à ce que la réglementation en



vigueur soit appliquée et mènent des actions de communication pour inciter à la prise en compte des risques liés à l'exposition aux nanomatériaux. En France par exemple, la suspension de la mise sur le marché des denrées contenant l'additif alimentaire E171 (dioxyde de titane - TiO<sub>2</sub>) a été fortement incitée par l'association citoyenne AVICENN. Cette suspension est prévue pour une durée de 1 an renouvelable à compter du 1er janvier 2020 (arrêté JORF n°0097), pour permettre à l'EFSA (Agence Européenne de Sécurité des Aliments) et à l'ANSES de fixer une dose journalière admissible. Cela fait suite à une étude de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) qui met en évidence un potentiel effet cancérigène du E171 chez le rat [14]. Au niveau européen, le règlement n°2018/848 (article 7) prévoit, à compter du 1er janvier 2021, « d'exclure les denrées alimentaires contenant des nanomatériaux manufacturés ou consistant en de tels nanomatériaux. » [15].

## **2. L'approche « *safer by design* »**

### **2.1. Définition**

L'approche « *safer by design* » est une théorie de conception qui permet d'améliorer le rapport bénéfices/risques d'une substance ou d'un produit. Elle prévoit de concevoir le nanomatériau le plus sûr possible dès l'étape de fabrication, mais aussi lors de son utilisation et jusqu'à sa fin de vie, que celle-ci consiste en une mise en décharge ou un recyclage (Figure 4). Cette approche associe les aspects socio-économiques du risque ainsi que les aspects environnementaux et de santé publique [16].

Pour les nanomatériaux, le but de cette approche est de diminuer le risque pour la population (travailleurs et consommateurs, le risque étant la combinaison de l'exposition au nanomatériau et du danger inhérent à ce nanomatériau), tout en conservant ou en améliorant les propriétés. Par exemples en fonctionnalisant la surface des nanomatériaux ou en substituant certaines substances par d'autres, moins toxiques.

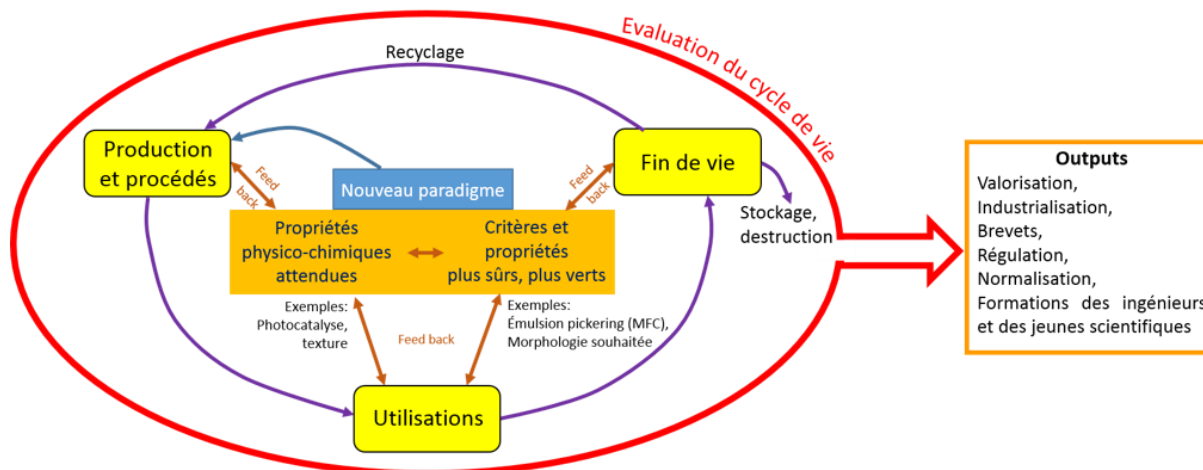


Figure 4 : Principales étapes de l'approche « safer by design » des nanomatériaux [17].

## 2.2. Aspects socio-économiques

De nos jours, les nanoparticules et nanomatériaux sont omniprésents au quotidien. Ils sont incorporés dans les cosmétiques et dans les produits d'hygiène (dans les crèmes solaires comme filtre UV, dans les produits de maquillage et de coloration capillaire comme pigments, mais aussi dans les dentifrices comme agents blanchissants). Ils sont également présents dans l'alimentation (dans le sel et le sucre comme anti-mottant ou dans certains bonbons et plats cuisinés comme agent opacifiant), dans les médicaments, dans les peintures, dans les écrans... Leur utilité, très controversée, peut aller du ciblage moléculaire dans certains traitements, à un simple aspect esthétique en pâtisserie.

Les potentiels effets toxiques de ces nanomatériaux sont à l'origine de nombreuses craintes pour les consommateurs. Celles-ci proviennent de plusieurs facteurs. Le manque de données de toxicologie avant la mise sur le marché des nanomatériaux est l'une des principales sources d'inquiétude. En effet, une meilleure connaissance des produits, par le biais de tests toxicologiques au sein des laboratoires, suivie d'une sensibilisation du grand public, permettraient d'instaurer une relation de confiance avec le consommateur qui s'exposerait plus facilement au produit. Un deuxième problème est la réticence des entreprises à se plier à la réglementation et d'exposer la mention [nano] sur leurs produits par peur, soit de voir le consommateur se détourner du produit, soit d'être la seule responsable en cas de problème. Après de nombreuses sollicitations d'acteurs de la société comme l'association Agir pour l'Environnement ou 60 millions de consommateurs qui publient la présence de nanoparticules non étiquetées sur l'emballage de nombreux produits alimentaires et cosmétiques, la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF)

confirme ces résultats depuis novembre 2017. Des associations citoyennes, comme UFC Que Choisir, ont déposé des plaintes contre les fabricants. Il va de soi que ce manque de transparence de la part des entreprises ne rassure pas le consommateur qui pense que l'entreprise cherche à lui cacher la présence de composés dangereux. De leur côté, les entreprises, bien qu'elles sachent ce qu'elles mettent dans les produits finaux, ne disposent pas toujours de toutes les informations de la part des fournisseurs et en particulier ne savent pas toujours si les matières premières contiennent des nanomatériaux [13].

Dans ce contexte, l'approche « *safer by design* » est une solution pour rapprocher les secteurs privés et la société civile qui sont souvent en désaccord. Le développement de nanomatériaux plus sûrs pour la santé et l'environnement ainsi qu'une meilleure connaissance du rapport bénéfices/risques pourraient permettre aux entreprises de mieux étiqueter leurs produits et aux consommateurs d'être rassurés.

### 2.3. Aspects environnementaux et de santé publique

L'émergence des nanomatériaux a entraîné l'apparition de nouveaux risques qu'il convient d'évaluer et de maîtriser (Figure 5).

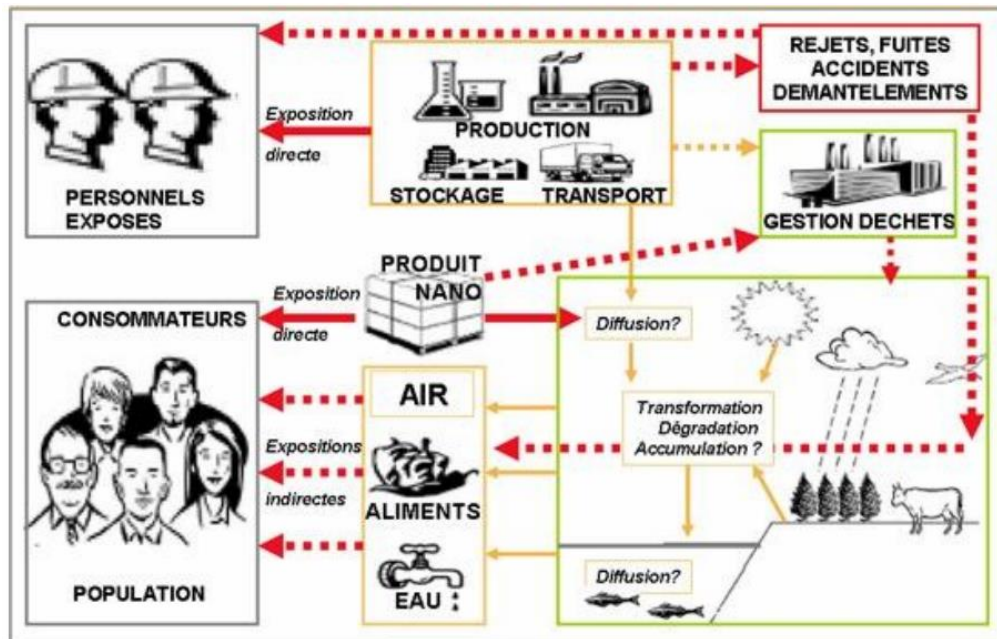


Figure 5 : Dispersion et transformation des nanomatériaux au cours de leur cycle de vie induisant des risques pour la santé et l'environnement [18].

Tout d'abord, des risques environnementaux principalement dus aux rejets des nanomatériaux sont apparus. Il est important de prendre en compte des aspects comme la pollution (de l'air, de l'eau et des sols), mais aussi la gestion des déchets et le recyclage des

produits. En effet, à l'heure actuelle, très peu de nanomatériaux sont recyclés. Si leur inclusion dans des matrices réduit fortement le risque environnemental au stade de la conception et de la fabrication, il en est différemment en ce qui concerne la fin de vie de ces produits. Par exemple, les nanomatériaux provenant des déchets électroniques (smartphones, tablettes, écrans plats, ...) qui finissent leur vie brisés dans des décharges, peuvent potentiellement se répandre dans les sols puis dans l'eau via le ruissellement de surface dû à la pluie. D'autres exemples comme les déchets nanocomposites et pneumatiques peuvent rejeter des nanoparticules dans l'air via les fumées d'incinérations. Les filtres utilisés pour limiter ce phénomène ne sont pas toujours adaptés pour les composés de tailles nanométriques [16]. Ces relargages peuvent correspondre au composé initial, qui est simplement réémis dans l'environnement, ou à des composés plus complexes issus du composé initial qui a subi une transformation physique ou chimique. Celles-ci peuvent être dues, par exemple, à un changement de pH dans le sol ou au changement de température lors de l'incinération. Cela peut avoir un impact considérable sur la faune et la flore à tous les niveaux (aquatique ou terrestre).

D'autre part, l'omniprésence des nanomatériaux génère des risques en termes de santé publique. Il a été démontré aujourd'hui que l'échelle nanométrique pouvait rendre un matériau volatile dangereux pour la santé, notamment puisqu'il se déposera plus profondément dans l'arbre respiratoire (Figure 6). D'autres exemples montrent une toxicité des nanomatériaux en fonction de leur forme. Des études sur l'animal ont montré que les nanotubes de carbone possèdent des formes caractéristiques (semblables aux fibres d'amiantes), qui sont probablement à l'origine de développement de mésothéliomes pulmonaires. Ils ont été classés par le CIRC dans la catégorie 2B, à savoir, cancérogènes possibles pour l'Homme [19]. Ces exemples montrent qu'il faut rester vigilant quant aux potentiels effets toxiques des éléments nanoparticulaires. Des études de toxicité doivent être menées systématiquement pour écarter les risques de cancérogénicité. Ces études peuvent se révéler très complexes, notamment lors d'expositions croisées à divers nanomatériaux. Par exemple, les consommateurs peuvent être exposés à de nombreux additifs présents dans leur alimentation, ou encore les travailleurs peuvent être exposés à plusieurs nanomatériaux en mélange. C'est ce qui est appelé « effet cocktail », qui est l'effet conjugué de divers produits chimiques pouvant avoir des interactions combinées. Ce type d'effet peut également être abordé par l'approche « *safer by design* ».

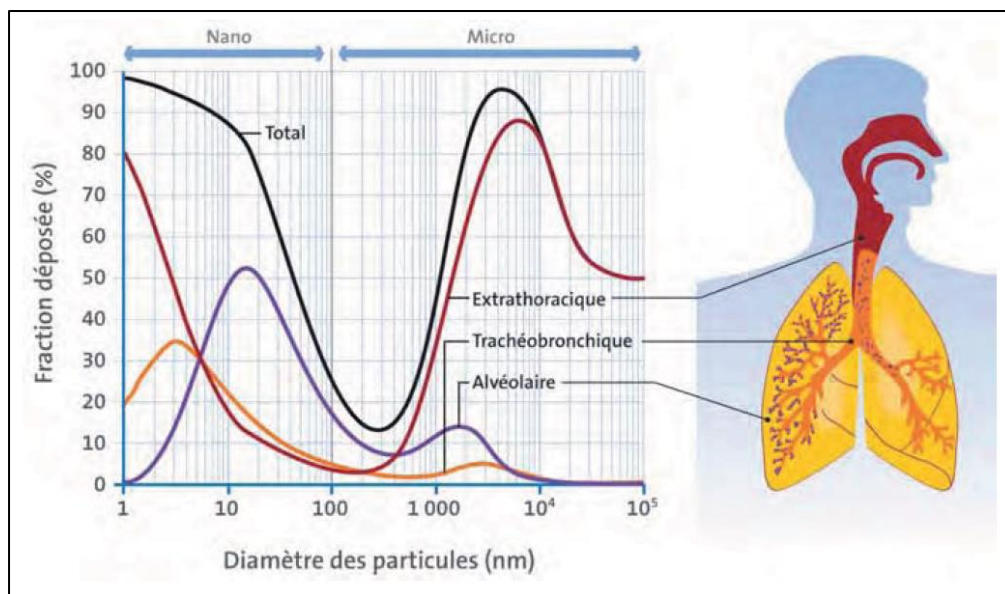


Figure 6 : Dépôt des particules le long de l'arbre respiratoire en fonction de leur taille (modèle de la commission internationale de protection radiobiologique) [20].

Au niveau de la réglementation spécifique au « *safer by design* », une norme est mondialement utilisée par les entreprises, la norme ISO 14040 : 2006. Elle est internationale et permet de réaliser des analyses de cycle de vie de divers produits. Elle est associée à de nombreuses bases de données, comme la base ECOINVENT qui possède des milliers d'inventaires sur l'évaluation du cycle de vie de divers produits.

## 2.4. Nanomatériaux « *safer by design* » générés dans le cadre du LabEx SERENADE

Le LabEx SERENADE (*Laboratory of Excellence for Safer Ecodesign Research and Education applied to NANomaterial DEVELOPMENT*), qui a cofinancé cette thèse, est dédié à l'approche « *safer by design* ». Il s'agit d'un réseau dynamique de laboratoires de recherche académique et de partenaires industriels, financé par le Programme investissement d'avenir pour une durée de huit ans (2012-2020). L'objectif principal est de développer des nanomatériaux innovants plus sûrs pour la santé et l'environnement, en prenant en compte toutes les étapes de leur cycle de vie. Cette thèse se focalise principalement sur l'étude de la toxicité de nouvelles formulations de QDs « *safer by design* » qui ont été étudiées dans le cadre du projet SAQUADO financé par le LabEx SERENADE. Elle a également permis de tester des nanomatériaux provenant d'autres partenaires du LabEx via le projet TILT, en particulier pour le développement de méthodes de criblage à haut débit afin d'évaluer leurs effets toxiques. Ainsi des données toxicologiques, sur certains nanomatériaux « *safer by design* » générés par les partenaires du LabEx SERENADE, sont rapportées dans ce manuscrit, comme par exemple,

des nanoparticules de dioxyde de titane dont la surface a été modifiée pour une utilisation plus sûre dans la fabrication de peintures photocatalytiques. Ces nanomatériaux ont été testés sous leur forme brute, et après incorporation dans une matrice de peinture, étalage et séchage de cette peinture, suivis d'un vieillissement en enceinte climatique et d'une abrasion, qui mime le cycle de vie d'une peinture commerciale. D'autres exemples ont été testés mais ne sont pas abordés dans ce manuscrit, comme des nanoparticules d'argent utilisées pour leurs propriétés antibactériennes dans divers produits, mais aussi des dérivés sulfurés qui miment la transformation des nanoparticules d'argent en fin de vie lors du relargage dans l'environnement et notamment les eaux usées. Des nanoparticules d'oxyde de cérium utilisées comme additif dans le diesel sont également étudiées avant et après vieillissement à 850 °C, mimant une combustion moteur. Ce travail a été mené en étroite collaboration avec des partenaires industriels (ALLIOS) et des partenaires académiques provenant du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives) à Grenoble, du laboratoire ISTERRE à Grenoble, du CEREGE (Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement) à Aix en Provence, de l'INRAE (l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) à Nantes, de l'IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale) à Marseille...

### **3. Les quantum dots à base de phosphore d'indium (InP)**

#### **3.1. L'indium**

L'indium, de symbole In, est un élément chimique métallique malléable et ductile avec un point de fusion bas et un point d'ébullition élevé. Relativement stable, sa cinétique de dissolution dans des acides minéraux augmente cependant en fonction de la température et de l'acidité du milieu. Il s'agit du 49<sup>ème</sup> élément du tableau périodique de Mendeleïev. Il se situe, colonne 13 dans le bloc p. Il se place au 61<sup>ème</sup> rang de par son abondance sur Terre (abondance similaire au cadmium et environ deux fois plus élevée que l'argent). Dans la nature, il n'est pas directement accessible mais est généralement lié à des minéraux sulfurés qui sont difficilement exploitables. Son extraction provient en grande partie des gisements de zinc, mais aussi de cuivre, de plomb et d'étain. Les plus grandes réserves sont localisées au Canada, aux États-Unis, en Amérique du sud et en Chine [21]. Il s'agit donc d'un sous-produit de métallurgie.

L'indium est utilisé en alliage avec d'autres éléments non métalliques tels que N, P, Sb, As, Te et Se pour former des composés semi-conducteurs comme le phosphore d'indium InP. Les oxydes d'indium comme  $\text{In}_2\text{O}_3$  sont également très utilisés et sont obtenus en chauffant le

métal en présence d'oxygène. Les applications sont principalement électroniques, avec plus de 50 % de l'indium produit qui est transformé en oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO). Ce dernier joue le rôle de conducteur en optoélectronique et plus précisément dans la conception d'écrans plats. L'inconvénient de l'ITO est que son procédé de fabrication nécessite des quantités importantes d'indium et génère beaucoup de déchets. Dans une moindre mesure, l'indium est utilisé dans d'autres applications, tel qu'en bijouterie, où il fait partie des alliages de métaux dans la confection de bijoux en or teinté. Puisqu'il est peu disponible et très demandé, l'indium est un métal onéreux, même si son prix s'est stabilisé depuis que des méthodes de recyclage ont été développées.

En effet, malgré les ressources limitées en indium sur Terre, la demande ne cesse d'augmenter ces dernières années avec l'engouement pour les ordinateurs portables, les tablettes et tout autre écran plat. L'approvisionnement devient de plus en plus critique, ce qui crée un déséquilibre entre l'offre et la demande. Le risque de pénurie étant fort, le recyclage devient indispensable, mais aujourd'hui le procédé existant est complexe et son rendement est faible. De nombreux pays ont investi dans le recyclage des déchets issus de la fabrication d'ITO qui est à l'origine de nombreux gaspillages. Son processus de fabrication peu efficace est à l'origine d'un rejet de plus de 70 % du produit. Le Japon, par exemple, a déjà mis en place un système de recyclage de ces déchets et récupère plus de la moitié de l'ITO pour en extraire à nouveau de l'indium appelé indium secondaire. D'autres pays, comme la Belgique, recyclent également une partie des autres déchets à base d'indium. Le manque d'infrastructures pour la collecte des produits en fin de vie et le coût du procédé de récupération de l'indium sont les principaux freins pour une généralisation du recyclage dans tous les pays. Cependant, l'appauvrissement des ressources primaires d'indium et le recyclage partiel ne répondent pas correctement à la demande. Il est donc essentiel d'investir dans le recyclage des produits manufacturés qui, de plus, ont une durée de vie courte, comme les écrans qui sont régulièrement remplacés [21], [22].

## **3.2. Les quantum dots colloïdaux à base de métaux**

### **3.2.1. Généralités**

Les Quantum dots (QDs) sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. Ils possèdent des propriétés optiques uniques, qui en font des nanocristaux de choix pour une utilisation dans les domaines de l'optoélectronique et de l'imagerie biomédicale. Par exemple, lorsqu'ils sont incorporés dans des écrans, ils améliorent la pureté de la reproduction des

couleurs. Ils possèdent un rapport surface/volume important du fait de leur taille nanométrique. Ils sont généralement constitués d'un cœur inorganique de semi-conducteurs possédant un nombre fini d'atomes, à la différence des métaux massifs. Ils peuvent être recouverts ou non de coquilles, composées d'autres semi-conducteurs dans le but de protéger et d'améliorer les propriétés optiques du cœur. De plus, leur surface est généralement recouverte de ligands (molécules organiques) qui induisent la répulsion des nanocristaux entre eux (Figure 7). Cela permet aux QDs d'être transférés dans des solvants adaptés, d'augmenter leur stabilité et d'acquérir des fonctions spécifiques en surface pour le ciblage moléculaire, par exemple. Les QDs se présentent donc généralement sous forme de suspensions colloïdales et peuvent être synthétisés de diverses manières, soit directement en milieu aqueux, soit en milieu organique puis transférés en milieu aqueux si besoin, notamment pour les applications en milieu biologique [23], [24]. Ils peuvent également être directement incorporés après synthèse dans des matrices polymères pour la fabrication d'écrans par exemple.

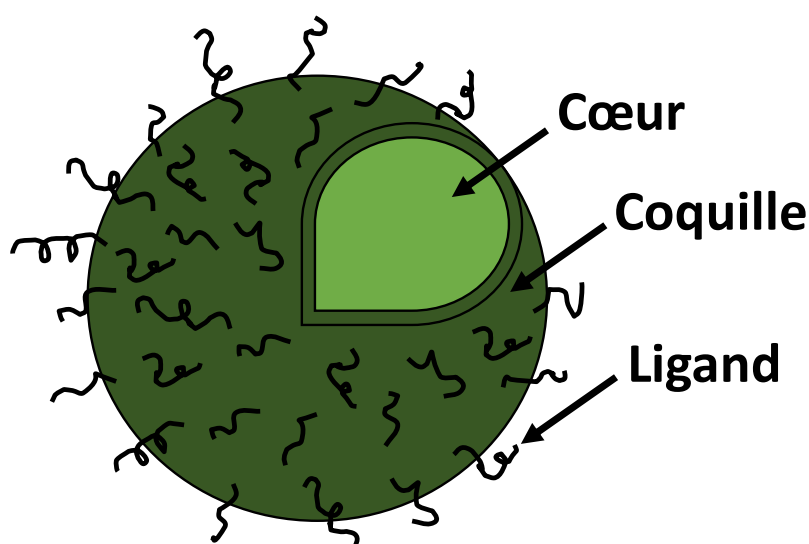


Figure 7 : Schéma de la structure d'un quantum dot.

### 3.2.2. La physique des QDs

Les propriétés exceptionnelles des QDs proviennent de leur petite taille (généralement inférieure à dix nanomètres) qui se traduit par des éléments semi-conducteurs possédant une bande interdite modulable et des niveaux d'énergie discrets pour les électrons (Figure 8). Il s'agit du phénomène de confinement quantique. Les termes de bande de valence et bande de conduction tendent alors respectivement vers les orbitales moléculaires la plus haute occupée (HOMO) et la plus basse vacante (LUMO). Le principe est le même que pour les semi-conducteurs classiques. Lorsqu'une énergie suffisante (supérieure à celle de la bande interdite) excite le composé, un exciton est créé (paire électron-trou). L'électron qui a été arraché de la



bande de valence (pleine) vers la bande de conduction (vide) tend ensuite à retourner vers son état fondamental en émettant un photon, c'est la fluorescence. Dans le cas des QDs, le rayon de Bohr de l'exciton (moitié de la distance moyenne entre le trou et l'électron) devient comparable, voire plus grand que le rayon du QD. L'énergie de la bande interdite varie alors en fonction de la taille de ce dernier, ce qui induit un décalage des spectres et l'observation de différentes couleurs. Les QDs peuvent absorber toutes les énergies supérieures à la bande interdite mais ne peuvent émettre les photons qu'à une longueur d'onde spécifique, celle qui correspond à l'énergie de la bande interdite. Cela leur confère un spectre d'absorption large et un spectre d'émission étroit [25], [26].

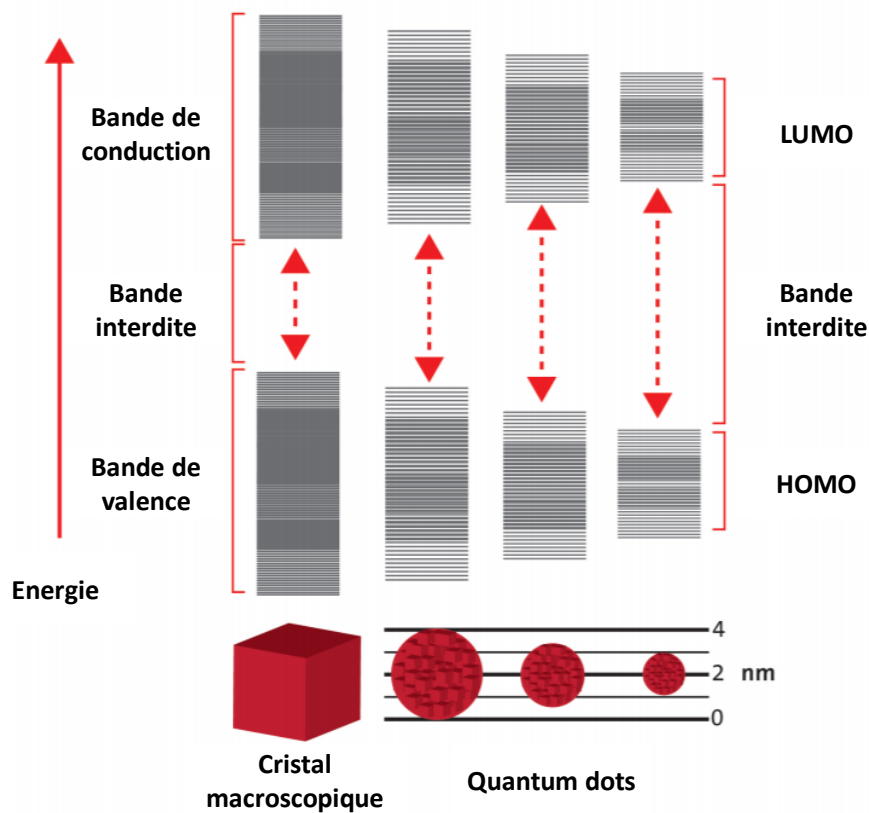


Figure 8 : Schéma adapté de l'évolution de la bande interdite en fonction de la taille du cristal pour les matériaux semi-conducteurs [27].

### 3.2.3. La caractérisation des QDs

L'analyse des propriétés optiques des QDs comprend classiquement la mesure d'absorbance et de photoluminescence. L'aspect des spectres obtenus renseigne sur la qualité des QDs. En effet, plus le pic d'émission de fluorescence est fin et symétrique, plus la qualité est élevée. La largeur à mi-hauteur de ce pic correspond à la polydispersité des QDs en solution, paramètre crucial à contrôler lors de la synthèse (Figure 9). L'énergie du pic est égale à celle de la bande interdite et l'intensité du pic est fonction de la passivation de la surface des QDs.

Les défauts de surfaces peuvent également élargir le pic [25], [28]. Un spectre d'absorbance est aussi réalisé par spectroscopie UV-visible. Cette mesure permet de calculer le diamètre des QDs, ainsi que leur concentration en solution. Le maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) proche du seuil est appelé premier pic excitonique. Il s'agit d'un épaulement bien distinct sur le spectre (Figure 9). Là encore, la largeur de ce pic varie en fonction de la polydispersité de l'échantillon [28]. Entre le pic excitonique et le pic de photoluminescence, il y a un léger décalage, appelé Stokes shift. Un retour à la ligne de base est également important dans les deux types de spectres pour pouvoir les exploiter correctement ; le cas contraire indique la formation d'agrégats de QDs, induisant la diffusion de la lumière. D'autres caractérisations permettent de compléter ces données. Par exemple, des mesures de DLS (*dynamic light scattering*) permettent d'évaluer la taille et la distribution de tailles des QDs en solution colloïdale. D'autre part, l'analyse structurale des QDs grâce à la diffraction des rayons X et à la microscopie électronique à transmission éventuellement couplée à la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MET-EDX), ou encore l'analyse chimique de ces derniers par la spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS et XANES) des QDs, renseignent sur leur morphologie, leur structure et leur composition chimique.

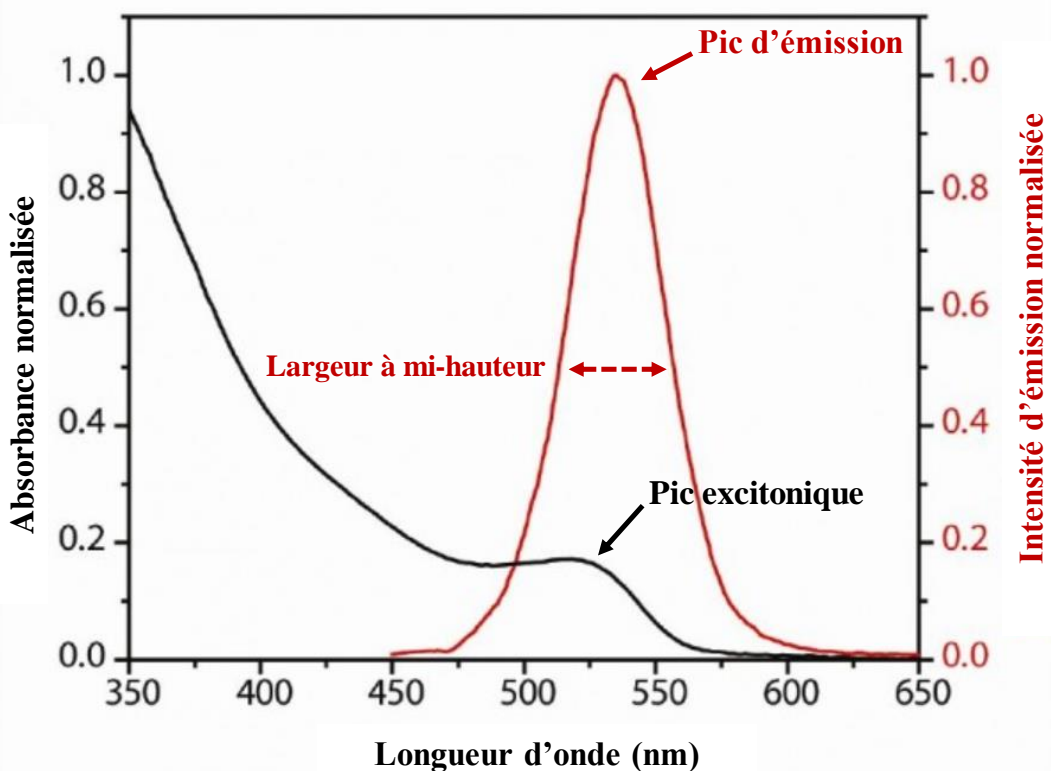


Figure 9 : Schéma adapté de l'absorption et de l'émission des QDs de CdSe-ZnS [29].

### 3.2.4. Applications des QDs

Les QDs sont très utilisés en optoélectronique dans la conception de diodes électroluminescentes (LED) pour améliorer la qualité des couleurs dans les écrans (tablettes, smartphones, ...). Cette dernière application, à savoir la conversion de la couleur bleue émise par des LEDs InGaN en vert et rouge par des QDs dans le rétroéclairage blanc, utilisée dans des écrans LCD, est actuellement intégrée dans certains téléviseurs (Samsung) pour améliorer le rendu et la vivacité des couleurs. Leur grande capacité à absorber la lumière peut également permettre d'augmenter l'efficacité des panneaux photovoltaïques, domaine dans lequel ils sont très étudiés [26]. Par ailleurs, ils sont aussi utilisés comme marqueurs fluorescents en biologie. Ils ont l'avantage d'être plus stables que les fluorophores organiques qui sont très sensibles au photoblanchiment. Leur spectre d'émission étant étroit, ils évitent également le recouvrement spectral dans le cas d'une utilisation simultanée de plusieurs sondes, ce qui est un autre avantage [28].

### 3.3. Le développement des nouvelles générations de quantum dots

La majeure partie des QDs commercialisés jusqu'à ces dernières années était composée de cadmium (Cd), en particulier le sélénure de cadmium (CdSe) car il possède de très bonnes propriétés optiques. Cependant, du fait de nombreuses preuves scientifiques de la dangerosité du Cd, son utilisation est devenue de plus en plus controversée. Le CIRC l'a classé dans la catégorie des éléments cancérigènes certains en 1993. Il a ensuite été sévèrement réglementé (règlement (CE) n° 552/2009 de la Commission du 22 juin 2009, règlement (UE) n° 494/2011 de la Commission du 22 mai 2011 et règlement (UE) n° 835/2012 de la Commission du 18 septembre 2012 modifiant l'annexe XVII du règlement (CE) n° 1907/2006) ce qui a nettement réduit son usage avec une interdiction totale dans les produits de consommation comme les colorations et peintures, les bijoux et les polymères. Néanmoins, s'agissant d'un élément essentiel dans de nombreux procédés industriels, des dérogations ont été obtenues pour certains produits, notamment pour l'aéronautique, l'aérospatiale, le nucléaire et les composants électroniques (dont les semi-conducteurs). La directive RoSH pour *Restriction of Hazardous Substances in electrical and electronic equipments* adoptée en 2011 puis modifiée en 2017, limite l'utilisation de substances dangereuses à 0,1 % (massique) dans les équipements électriques et électroniques, à l'exception du cadmium pour lequel la limite est fixée à 0,01 % [30].

Ces réglementations ont poussé les industriels et les laboratoires de recherche à trouver des solutions alternatives pour réduire la quantité de cadmium dans les QDs. Un des axes de recherche est de recouvrir le cœur contenant du cadmium par une coquille composée de zinc et soufre (ZnS). Ce procédé, en plus d'améliorer les propriétés optiques du QD, permet de ralentir la dissolution du cœur au cours du temps. Un autre axe est de substituer le Cd par un élément moins toxique mais qui confère tout de même aux QDs de bonnes propriétés optiques. Parmi ces alternatives, l'indium est un bon candidat. Ce dernier est très étudié, en particulier sous forme de phosphure d'indium (InP) qui confère aux QDs une émission modulable en fonction de leur taille allant du visible au proche infrarouge, similaire aux QDs de CdSe (Figure 10).

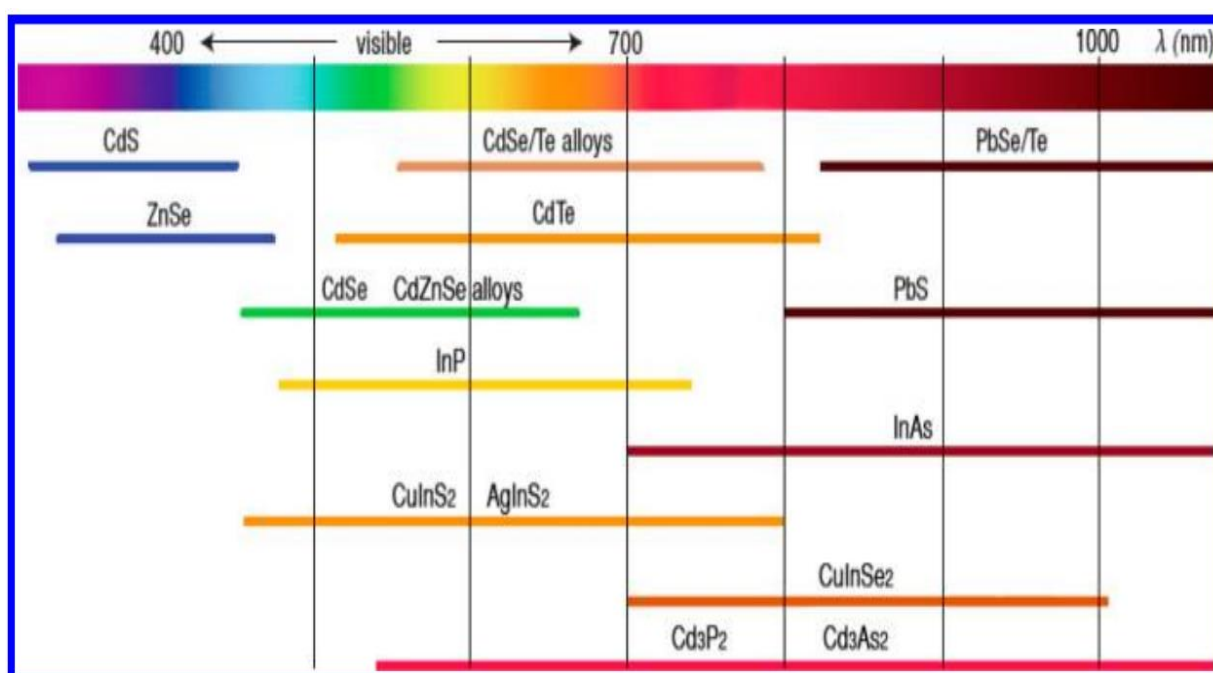


Figure 10 : Gammes d'émission de différents QDs, modulables en fonction de leurs tailles [31].

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Peter Reiss, qui travaille depuis plusieurs années sur la synthèse de QDs à base d'InP ainsi qu'à l'amélioration de leur formulation dans le but de développer des QDs possédant des propriétés optiques toujours plus élevées ainsi qu'une meilleure résistance à l'oxydation, tout en limitant la toxicité de ces composés. Dans le cadre du LabEx SERENADE, les propriétés de ces QDs d'InP ont été améliorées par enrichissement du cœur avec du Zn ou du ZnS ainsi que par ajout d'une coquille synthétisée sous forme d'un gradient de ZnSe/ZnS. Suite à ces synthèses, une diminution de la toxicité des QDs recouverts d'une coquille a été mise en évidence en comparaison avec les cœurs seuls [32]. De meilleures propriétés optiques ont également été observées avec les cœurs InZnP comparés aux InZnPS [32]. De nouvelles générations de QDs ont alors été développées pour améliorer leur résistance face à la

dégradation au cours du vieillissement et diminuer leur toxicité ; ils sont l'objet principal des travaux présentés dans ce manuscrit. Des QDs d'InZnP recouverts d'une double coquille (Zn(Se,S)/ZnS) ont été pensés et développés par l'équipe, en travaillant sur différentes épaisseurs de coquille de ZnS [33]. La coquille intermédiaire contenant du sélénium a comme rôle de se lier plus facilement au cœur (grâce au plus faible désaccord de maille cristalline comparé au ZnS) et permettre la bonne cohésion de la seconde coquille (ZnS) sur le QD [24]. Ces éléments dans les coquilles permettent une meilleure stabilité photochimique des nanocristaux tout en améliorant les propriétés optiques puisqu'ils augmentent l'intensité de photoluminescence. Finalement, pour les applications en biologie, il est nécessaire de transférer les QDs en phase aqueuse, sans perdre les propriétés acquises. Pour cela il y a deux approches principales : l'encapsulation par des polymères amphiphiles ou l'échange de ligands [34].

Une meilleure stabilité physicochimique est recherchée en travaillant sur le ligand de surface pour éviter l'agrégation des QDs, notamment la D-pénicillamine qui semble être un ligand prometteur en termes de stabilité et de résistance face à l'oxydation [35], [36]. Le caractère zwitterionique induit une faible interaction du ligand avec les cellules et biomolécules ainsi qu'une stabilité sur une large gamme de pH, ce qui peut être utile en termes de biocompatibilité [35], [36]. Par rapport à d'autres molécules zwitterioniques, comme par exemple la cystéine, la pénicillamine a une tendance plus faible à former des dimères par oxydation de la fonction thiol.

## **4. Les effets des QDs sur la santé**

### **4.1. Généralités**

Le risque qu'engendre un composé chimique (ou autre) sur la santé est la probabilité de créer des dommages en fonction de l'exposition. Il peut être vu comme la combinaison du danger, qui est une propriété intrinsèque du composé définie par sa toxicité, et de l'exposition à ce composé. L'exposition concerne la population exposée. Quel est le profil des personnes exposées et quel est leur niveau d'exposition (dose, fréquence). Pour connaître le risque encouru pour la santé lors d'expositions aux QDs, il convient donc de connaître également le type de population exposé ainsi que les principales voies d'exposition.

#### **4.1.1. Population exposée**

Les travailleurs forment une première population à risque pouvant être exposée aux QDs. Ils peuvent être en contact avec ces composés lors de leur fabrication, en tant que matière

première, mais aussi lors de leurs assemblages (dans les écrans par exemple). Ils peuvent également être exposés aux QDs ou à leur produits de dégradation en manipulant les produits en fin de vie, lors du traitement en décharge [16], [18].

Les consommateurs représentent une deuxième population à risque. Ils peuvent être exposés lors de l'utilisation des produits. En effet, les produits comme les écrans de tablettes et smartphones, où sont inclus les QDs, sont en permanence manipulés par le consommateur qui peut potentiellement rentrer en contact avec ces derniers si les écrans se fissurent ou se cassent. De plus, les effets du vieillissement de ces composés sous les irradiations du soleil sont méconnus mais peuvent entraîner leur dégradation ainsi que la libération d'éléments toxiques. Cette population inclut également les patients dans le cas de futures applications biomédicales des QDs en imagerie et thérapies ciblées.

Plus généralement, l'ensemble de la population peut être exposée via l'environnement. Le risque est double, puisque l'exposition peut se faire d'une part par le relargage des QDs eux même ou par l'exposition à leurs produits de dégradation, car il a été démontré qu'en vieillissant, les QDs se dissolvent et libèrent des éléments toxiques [32]. Cela laisse penser que, lors du stockage des produits en fin de vie dans les décharges, ces éléments toxiques vont pouvoir être libérés dans l'environnement (écrans cassés, exposés au soleil, vent...). Ils peuvent alors être lixiviés par les eaux de pluies et se retrouver dans l'eau et le sol puis dans la chaîne alimentaire. Une autre source de contamination peut provenir de l'élimination par le corps des QDs injectés en imagerie qui se retrouvent alors dans les eaux usées. Le traitement en station d'épuration n'ayant pas été conçu pour ce type de composés nanométriques, des éléments peuvent passer la barrière des filtres et retourner dans l'eau de consommation ou se retrouver dans le sol via les boues d'épandage [18].

#### **4.1.2. Voies d'exposition et principaux effets**

Les QDs se présentent généralement sous forme de suspensions colloïdales, ils sont synthétisés en phase liquide. Il est donc peu probable de les retrouver dans l'air. De ce fait, la voie d'exposition par inhalation n'est pas la plus pertinente à étudier. Ainsi, quelques études démontrent que les QDs de Cd, par administration intratrachéale chez des souris (CdSe) et par inhalation chez des rats (CdS/Cd(OH)<sub>2</sub>), induisent une réaction inflammatoire locale des poumons avec un recrutement de lymphocytes co-localisés avec les QDs chez les souris [37]. Néanmoins, chez les rats, l'inflammation régresse après trois semaines de récupération [38]. Aucune dégradation des QDs n'est observée chez les souris et aucune preuve formelle de la translocation à travers la barrière pulmonaire n'est mise en évidence [37]. Ces études montrent

une toxicité localisée des QDs au niveau pulmonaire mais ne suggèrent pas d'effets systémiques.

Parmi les autres voies d'exposition, la voie par ingestion est envisageable par un contact main-bouche. Les travailleurs et les consommateurs pourraient être concernés par ce type d'exposition lors de la manipulation des QDs au cours de leur fabrication ou lors du contact avec des écrans brisés. Cependant, cette voie reste accidentelle. Par ailleurs, la population générale pourrait également être exposée par ingestion dans le cas où les QDs seraient transférés via l'environnement dans l'eau de boisson et dans l'alimentation. Pour ce type d'étude, il serait nécessaire de connaître la biodisponibilité des QDs dans l'eau et dans le sol, c'est-à-dire la fraction de QDs qui peut être absorbée par les organismes vivants en fonction de leur spéciation chimique et de leur mobilité dans les différents milieux. Cependant, ces études, extrêmement longues et complexes à réaliser ne sont pas retrouvées dans la littérature. Dans l'hypothèse où les QDs sont ingérés, une étude *in vivo* sur des rats exposés à une prise orale de QDs CdSe/ZnS (21,5 nM) montre que, dans le tractus gastro-intestinal, les QDs se dégradent progressivement sous l'effet des faibles pH, notamment au niveau de l'estomac où le fluide gastrique est particulièrement acide [39]. Cette dégradation est plus ou moins rapide et dépend de la fonctionnalisation par les ligands de surface qui vont être impactés en premier [40]. Les études *in vitro* montrent que les QDs de CdSe/ZnS hydrophobes (sans fonctionnalisation) se dégradent plus rapidement que les CdSe/ZnS recouverts de fonctions hydrophiles [39], [41]. La perte des ligands entraîne alors la dégradation du ZnS, lorsqu'il est soumis aux pH acides, entraînant la libération du cœur des QDs [42]. Une autre étude, *in vivo*, démontre que l'administration orale de 200 pmol de QDs CdSe/ZnS fonctionnalisés avec un ligand polythiol et encapsulés dans une coquille de silice sont en grande partie retrouvés dans les fèces des souris exposées. L'encapsulation des QDs dans des coquilles de silice les rend plus résistants à la dégradation [43].

La principale voie d'exposition directe aux QDs est la voie cutanée. Les consommateurs, qui représentent une très grande partie de la population, sont en contact permanent avec les écrans (tablettes, smartphones...). Lorsque ces derniers sont conçus, les QDs qui les composent sont piégés et recouverts d'une matrice polymère, ce qui limite l'exposition. Cependant, lorsque les écrans se fissurent ou vieillissent, sous l'effet des irradiations solaires par exemple, ils sont susceptibles de libérer les produits de dégradation des QDs, engendrant potentiellement un risque pour la santé. De plus, les travailleurs sont également concernés par ce type d'exposition cutanée. Les QDs sont manipulés lors de la fabrication des écrans ou des agents d'imagerie. Ils

se présentent en suspensions dans des matrices liquides donc le risque de projection sur la peau est supérieur aux autres types d'expositions. Le danger est d'autant plus élevé pour les travailleurs qui s'occupent de la fin de vie des produits car les QDs peuvent être en partie dégradés et être plus toxiques. Une étude a mis en évidence la pénétration des QDs à travers la peau saine porcine [44]. Dans cet article, des peaux de porc sont prélevées et exposées à 62,5 pmol/cm<sup>2</sup> de QDs CdSe/ZnS (de formes et de fonctionnalisations différentes) en diffusion continue pendant 8 h ou 24 h. Les QDs testés dans cette étude sont de forme sphérique ou en forme d'ellipse, fonctionnalisés avec des acides carboxyliques (COO<sup>-</sup>) ou du polyéthylène glycol (PEG) neutre ou encore des PEG amines (PEG-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Il est démontré que la barrière cutanée est perméable à ces QDs qui se retrouvent dans la barrière épidermique après 8 h d'exposition, excepté pour les QDs-COOH en forme d'ellipse, qui ne traversent la barrière qu'après 24 h de diffusion. Les QDs-PEG-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sphériques sont également capables de migrer plus loin que les autres (jusqu'au derme). Le niveau de pénétration des QDs à travers la barrière épidermique dépend donc de leurs tailles/formes/ligands et de la charge en surface. La suite de cette étude évalue la cytotoxicité ainsi que la réponse inflammatoire de ces QDs sur des kératinocytes primaires humains. En particulier, après 24 h d'exposition à 20 nM, les QDs fonctionnalisés par des COOH entraînent une élévation de la cytotoxicité ainsi que la libération de cytokines (IL1 $\beta$ , IL6 et IL8) [45]. La charge de surface modifie donc le potentiel inflammatoire des QDs, ce qui a été démontré par la suite dans de nombreuses études [41], [45]–[49]. Par exemple, dans une étude *in vitro*, l'exposition de kératinocytes (HaCaT) aux QDs de CdSe/ZnS entraîne une diminution de la viabilité cellulaire et une accumulation de ROS. Cet effet est amplifié par l'exposition en parallèle aux rayons UV [50], [51]. Cependant, toutes ces études sont réalisées à partir de peaux saines. Le niveau de pénétration des QDs lorsque la peau est lésée, ainsi que les éventuels effets systémiques sont alors inconnus.

D'autres voies d'exposition particulières peuvent également faire l'objet d'études, comme l'exposition oculaire par projection de QDs (par exemple chez les travailleurs, s'ils ne sont pas correctement protégés). Pour ce type d'exposition, aucune étude n'a été trouvée dans la littérature. Un autre exemple est celui de l'exposition pour les applications en imagerie biomédicale. Les patients sont alors exposés par voie intraveineuse, comme pour les agents de contraste classiques. Des études d'exposition de souris par voie intra-veineuse à 25 mg/kg de QDs InP/ZnS montrent une diminution rapide de l'indium (mesuré par ICP-MS) dans le sang des souris (inférieur à la limite de détection après 24h) et une accumulation dans certains organes comme la rate et le foie (et dans une moindre mesure dans les poumons, les reins et le



cœur), 3 jours après l'exposition. Un retour à la normale, lent et progressif, est ensuite observé dans ces organes (84 jours après l'exposition). Les coupes histologiques observées au microscope à fluorescence confirment l'intégrité et la stabilité des QDs au cours du temps d'élimination [52].

## 4.2. Toxicité des quantum dots

### 4.2.1. Mécanismes de toxicité cellulaire relatifs aux QDs

A cause du développement constant de nouvelles formulations, les données toxicologiques relatives aux nanomatériaux manquent cruellement. Ce manque de connaissances, à l'origine de nombreux débats et inquiétudes ces dernières années, a poussé les industries et laboratoires de recherche à multiplier les études de toxicité. Les principaux mécanismes répertoriés sont représentés dans la Figure 11. Cependant, chaque nanomatériau a son propre mode d'action en fonction de sa taille, sa composition, sa fonctionnalisation...

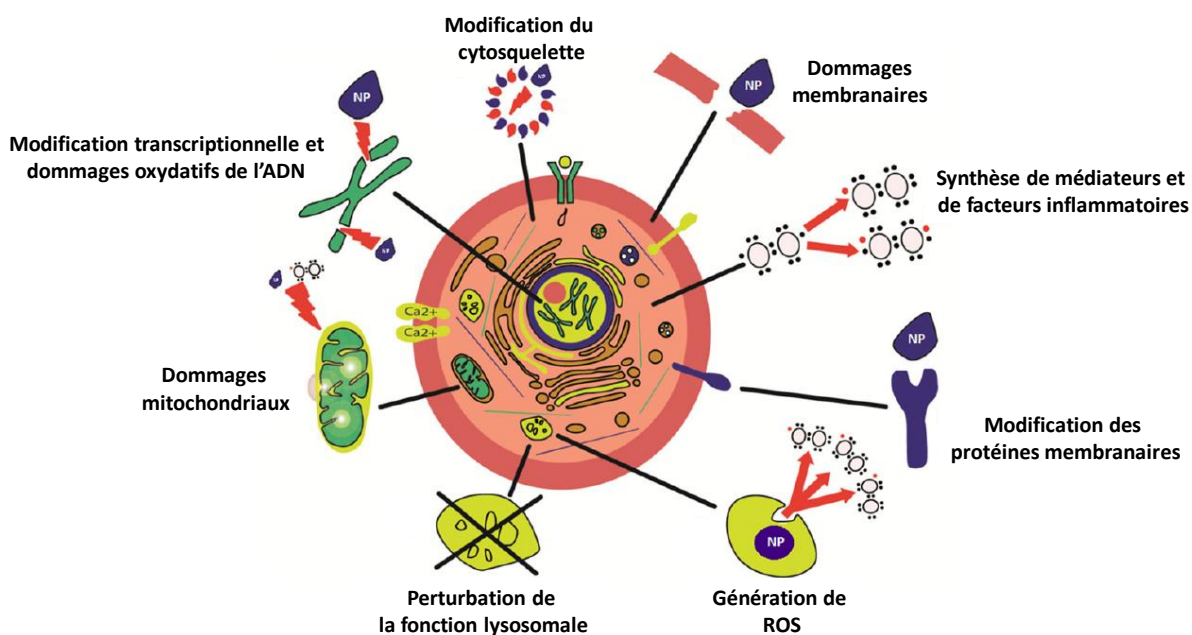


Figure 11 : Schéma adapté des principaux mécanismes de toxicité cellulaire induits par les nanoparticules [53].

En ce qui concerne les QDs de CdSe, il a été démontré que la toxicité provient principalement de leur dissolution, qui est le résultat d'une oxydation des éléments en surface [54]. Dans un premier temps, les QDs perdent leurs ligands de surface qui les maintenaient en suspension. Cela a pour effet l'agrégation (liaisons chimiques fortes et difficilement réversibles entre les particules) et l'agglomération (interactions physiques faibles et facilement réversibles entre les particules) des particules qui ne sont alors plus stables et qui sédimentent [42]. Dans

un second temps, la surface des QDs est attaquée par l'oxygène de l'air et peu à peu dissoute. S'il y a une coquille, elle est dégradée en premier, retardant ainsi la dégradation du cœur qui, dans le cas des QDs à base de Cd, contient les éléments chimiques les plus toxiques. Par ailleurs, il est démontré que l'irradiation de QDs CdSe aux rayons UV amplifie l'oxydation de surface et donc la libération des ions  $\text{Cd}^{2+}$ , ce qui a pour effet d'augmenter la cytotoxicité [54]. Cependant, une réduction de la mortalité cellulaire est observée lorsqu'une coquille de ZnS est présente. D'autres études montrent que l'ajout d'une coquille, dans les nouvelles générations de QDs, réduit davantage la photo-oxydation et augmente leur stabilité ainsi que le rendement quantique (QY) [23].

La toxicité des QDs peut également provenir d'une dégradation intracellulaire. Pour pénétrer dans la cellule, il a été démontré que les QDs CdSe/ZnS recouverts du ligand D-penicillamine utilisent principalement la voie de l'endocytose médiée par la clathrine et la macropinocytose pour pénétrer dans les cellules HeLa [55], [56]. Ils se retrouvent ensuite en grande partie accumulés dans des endosomes et transportés en périphérie de la membrane plasmique pour être éliminés de la cellule via la voie d'exocytose. Une fraction de ces QDs est également localisée dans les lysosomes [56]. Cette seconde voie d'excrétion peut être complexe puisque une étude plus récente a mis en évidence la dégradation des QDs d'InP/ZnS et CdSe/ZnS lorsqu'ils sont soumis à des pH acides, simulant des conditions lysosomales (37 °C, pH 4,5) [57]. Ces derniers deviennent ainsi de véritables réservoirs à ions ( $\text{Cd}^{2+}$  ou  $\text{In}^{3+}$ ), potentiellement toxiques. Par ailleurs, la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'intérieur des cellules peut aussi oxyder les QDs et les dégrader, en particulier dans les cellules phagocytaires tels que les macrophages qui en contiennent beaucoup. Une étude a mis en évidence une perte de fluorescence des QDs (CdSe/CdS/ZnS), traduisant leur dégradation, lorsqu'ils sont mis en présence des espèces  $\text{H}_2\text{O}_2$  et HOCl (acide hypochloreux), qui font partie des ROS impliqués dans les mécanismes oxydatifs intracellulaires [58], [59].

Lorsque les QDs se dissolvent, ils libèrent les éléments chimiques contenus dans leurs cœurs, tels que le Cd, le Te, le Pb ou l'In, sous forme ionique [54]. Pour rentrer dans les cellules, ces ions peuvent détourner des transporteurs membranaires, comme les transporteurs de zinc, ou entrer par endocytose et ensuite être libérés par les endosomes et lysosomes. Ils se retrouvent alors dans le compartiment cytoplasmique où ils sont pris en charge par les différents mécanismes de détoxification cellulaire des métaux, comme les métallothionéines (MT) ou le glutathion (GSH) [24].

Les ions libérés par les QDs, notamment  $\text{Cd}^{2+}$ , agissent sur les mécanismes de génération de ROS et induisent des lésions oxydatives de l'ADN [60]. Il a été reporté que les QDs de CdSe/ZnS sont responsables de l'élévation du stress oxydant à l'intérieur des cellules, ce qui entraîne des lésions de l'ADN, en particulier lorsqu'ils sont photoactivés [60], [61]. En addition à ces résultats, une étude *in vivo* montre que l'exposition de souris aux QDs CdSe/ZnS et CdTe/ZnS par voie intraveineuse induit l'augmentation du niveau de métallothionéines, ainsi que l'expression de nombreux marqueurs de stress et d'inflammation, comme l'hème oxygénase 1, interleukine 6 et TNF-alpha [62]. Cette étude met également en évidence une augmentation du niveau des bases oxydées de l'ADN (8-oxodG).

#### 4.2.2. Toxicité de l'indium non nanométrique

L'utilisation accrue de l'indium dans le monde industriel a fortement augmenté l'exposition professionnelle, entraînant une attention particulière des scientifiques vis-à-vis du risque encouru pour la santé. La première étude à mettre en évidence de potentiels effets néfastes de l'indium sur la santé date de 2003 [63]. Elle rapporte un cas de pneumonie interstitielle chez un homme de 27 ans ayant travaillé trois ans dans l'industrie de l'ITO (pour rappel, oxyde d'indium-étain), avec la présence de particules d'étain et d'indium dans des biopsies de ses poumons. En 2005, un cas de fibrose pulmonaire et d'emphysème est rapporté chez un homme de 30 ans, travaillant aussi dans l'industrie d'ITO. Suite à ces observations, des études de cohortes se sont mises en place et ont confirmé le risque élevé de maladies pulmonaires interstitielles chez les travailleurs dans l'industrie d'ITO [64], [65]. En parallèle, des études montrent que l'effet de l'étain par inhalation induit des pneumoconioses bénignes (stannose) sans fibrose ou perte des fonctions pulmonaires [66], [67]. L'hypothèse émise est que l'effet cancérigène observé chez l'Homme est certainement dû à l'indium, cependant, aucune étude ne le prouve à l'heure actuelle. Des résultats sur l'animal viennent enrichir ces données, en particulier, un rapport sur l'exposition de rats à du phosphore d'indium par inhalation met en évidence une forte inflammation ainsi que des zones de fibrose pulmonaire [68]. Suite à ces résultats, en 2006, l'InP est classé dans la catégorie des éléments cancérigènes probables chez l'Homme (groupe 2A) par le CIRC [69].

Diverses études *in vivo* montrent que l'indium absorbé s'accumule dans certains organes comme les reins, la rate, le foie et les testicules avec une concentration en indium dans le sérum qui dépend de la dose d'exposition [70]–[72]. Cependant, la question des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à l'absorption de l'indium se pose. La littérature est peu exhaustive à ce sujet car ces derniers sont assez mal connus de nos jours. Il a été démontré que

le phosphore d'indium se solubilise dans un environnement mimant le fluide gastrique alors qu'il ne se solubilise pas dans un environnement mimant le fluide alvéolaire [71]. L'InP peut donc se dégrader et libérer des ions  $\text{In}^{3+}$  dans certains milieux biologiques, notamment dans le fluide gastrique, en raison de son faible pH. Cela signifie par ailleurs, qu'à l'intérieur des cellules, dans certains compartiments acides comme les lysosomes, l'InP pourrait éventuellement se solubiliser comme observé avec les QDs d'InP/ZnS soumis à des pH acides simulant des conditions lysosomales (37 °C, pH 4,5) [57]. La solubilisation de l'indium conduit à la libération de cations  $\text{In}^{3+}$ , plus réactifs et plus facilement assimilables par la cellule. Une étude récente a évalué les effets de ces cations sur les fonctions mitochondriales et met en évidence des impacts sur l'état oxydatif des cellules ainsi que sur les fonctions des canaux ioniques [73]. Les effets décrits dans cette étude sont une diminution des transports ioniques due à une inhibition des canaux à protons de la membrane interne mitochondriale et une diminution de la respiration mitochondriale, entraînant des augmentations de la motilité de la membrane, une modification de la pression osmotique, une réduction du potentiel membranaire mitochondrial ainsi qu'une ouverture des pores membranaires avec un gonflement de la matrice mitochondriale. Une autre étude portant sur l'exposition de rats à de l'acétate d'indium par voie intrapéritonéale met aussi en évidence l'apparition d'un stress oxydant (par l'augmentation du nombre de ROS), induisant des anomalies sur les spermatozoïdes de ces animaux [70].

En revanche, une étude montre qu'après l'instillation d'InP chez des rats, 73 % de la dose d'In est excrétée via les fèces. En parallèle, l'exposition par voie orale privilégie également ce type d'excrétion [74]. Cela montre une faible absorption de l'InP par la barrière intestinale. Par ailleurs, il est à noter que les données sur la toxicité cutanée de l'indium sont souvent manquantes.

#### **4.2.3. Toxicité des quantum dots d'InP**

Les QDs d'InP ont été développés comme alternative aux QDs CdSe qui ont démontré une forte toxicité par le passé. Cette hypothèse a été vérifiée dans quelques études, dont une en particulier, combinant la toxicité *in vivo* et *in vitro* des QDs CdSe/ZnS et des InP/ZnS [57]. Ainsi, cette étude met en évidence une perte de l'intégrité membranaire des cellules (pulmonaires et neuronales) à 5 nM de CdSe/ZnS, alors qu'à cette concentration, aucun effet des InP/ZnS n'est visible. Il est également décrit que les CdSe/ZnS entraînent une élévation du stress oxydant intracellulaire (augmentation de l'expression des gènes SOD, CAT, GPx). Une internalisation des deux types de QDs est observée dans le cytoplasme des cellules et en périphérie du noyau. Par ailleurs, l'exposition de drosophiles à ces différents QDs par voie orale

montre également une élévation de l'expression des gènes de stress HSP 70 et de p53, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose dans les hématocytes, avec un effet beaucoup plus important pour les CdSe/ZnS. De plus, une expérience mimant les conditions lysosomales (37 °C, pH 4,5) montre la dissolution des QDs InP/ZnS et CdSe/ZnS en milieu aqueux ainsi que le relargage d'ions  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  (en quantité plus élevée pour  $\text{Cd}^{2+}$ ) [57]. Cette étude montre que l'alternative InP/ZnS est plus sûre. Cependant, les QDs se dégradent dans un environnement acide, ce qui entraîne une libération et une accumulation d'ions In et Zn dans la cellule qui, selon les auteurs, seraient responsables d'une augmentation du niveau de ROS dans les cellules et, plus généralement, de l'apparition d'un stress oxydant. Deux études *in vivo* montrent que les QDs InP/ZnS s'accumulent principalement dans le foie et la rate des animaux rapidement après l'injection par voie intra-veineuse, puis qu'ils sont éliminés progressivement de l'organisme [75], [52]. Aucune toxicité aiguë n'est démontrée sur ces animaux. Une étude recense aussi des malformations sur des embryons de vairon après exposition à des QDs InP/ZnS. La toxicité reste cependant moindre en comparaison aux QDs de CuInS/ZnS [76].

Plus récemment, deux études *in vitro* ont révélé une toxicité de ces QDs InP/ZnS. [77], [78]. Il a ainsi été mis en évidence une faible cytotoxicité après exposition à 0,5-1 mg/mL de QDs durant 24 h et une réponse inflammatoire après exposition à 40  $\mu\text{g/mL}$  de QDs durant 24 h sur des macrophages de souris. Plus précisément, les QDs InP/ZnS sont capables d'activer les macrophages, induisant un stress oxydant et un stress du réticulum endoplasmique, ainsi que la production de cytokines IL6 [78]. Par ailleurs, une étude a montré que la cytotoxicité ainsi que le stress oxydant induits par les QDs d'InP/ZnS dans des cellules pulmonaires variaient en fonction de leur fonctionnalisation de surface et donc de leur charge [79]. Les QDs neutres sont moins toxiques que les QDs chargés positivement ou négativement [49], [79].

En ce qui concerne l'exposition cutanée, les données sur InP/ZnS sont peu nombreuses. Des interactions entre les QDs d'InP/ZnS et la protéine albumine sérique humaine ont été mises en évidence, entraînant des changements conformationnels importants de cette dernière (réduction du nombre d'hélice  $\alpha$ ), pouvant entraîner une modification des fonctions biologiques [80]. Par ailleurs, les coquilles de ZnS permettent d'éviter la libération des ions provenant du cœur. Les travaux préliminaires à cette thèse ont également été menés sur des QDs d'InP dotés de doubles coquilles (Zn(Se,S)/ZnS) [33]. Les résultats ne montrent pas de diminution de la viabilité des kératinocytes primaires humains exposés à des concentrations de QDs comprises entre 6,25 nM et 100 nM. Par ailleurs, nous avons démontré que lorsque des QDs d'InZnP présentant une simple coquille de Zn(Se,S) subissent un vieillissement mimant une exposition

solaire, ils se dégradent et deviennent toxiques [32]. Une forte augmentation de la mortalité est alors observée mais aucune génotoxicité n'est mise en évidence à 50 nM. Une autre étude vient en complément et montre une dégradation des QDs d'InP/ZnS lorsqu'ils sont soumis à des températures élevées (90 °C) en présence d'O<sub>2</sub> et de lumière, alors qu'à température ambiante dans le noir, l'effet n'est pas observé [81]. Les auteurs concluent que la dégradation se fait via la perte des ligands de surface et que cet effet est accéléré par la lumière ainsi que par la chaleur et la présence d'oxygène.

#### 4.2.4. Toxicité des éléments de la coquille

Les coquilles qui recouvrent les QDs sont composées d'autres éléments métalliques ou non-métalliques (inorganiques ou organiques) comme le zinc, le soufre et le sélénium qui peuvent être impliqués dans la toxicité de ces nanocristaux. En effet, les études de dégradation montrent que lorsque les solutions de QDs sont soumises à l'air ambiant, les éléments de surface subissent des transformations. Cela a pour effet de modifier la structure chimique des QDs ainsi que leur toxicité [23], [32], [33], [54], [57].

Tout d'abord, le zinc est un métal physiologique impliqué dans de nombreuses voies métaboliques, et possède un rôle antioxydant à faible dose. Cependant, lorsqu'il se trouve en excès, il peut se révéler nocif [82], [83]. En effet, une étude sur des embryons de poissons exposés à un excès de zinc révèle une augmentation des malformations du cœur (effet chronotrope négatif) et des spermatozoïdes (diminution de la taille et de la motilité) ce qui lui confère un effet néfaste sur la fertilité [82]. Des données montrent qu'un excès de zinc inhibe les enzymes à glutathion (GPx) et augmente la quantité de glutathion réduit (GSSG) dans les cellules. Cela a pour effet d'induire l'accumulation de ROS, et en particulier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans la mitochondrie, il entraîne un dysfonctionnement au niveau de la production d'ATP [83]. Le zinc constitue cependant l'élément principal des coquilles des QDs. Lorsque ces dernières se dégradent, il est peu probable que le zinc (sous forme Zn (II)) s'oxyde, mais les ions Zn<sup>2+</sup> peuvent être libérés et s'associer à d'autres éléments du milieu, notamment à des ions carboxylate, comme observé dans notre précédente étude [32]. Lors de l'oxydation et de la désorption des autres éléments de la coquille, les ions Zn<sup>2+</sup> se solubilisent dans le milieu, ce qui participe à rendre les QDs instables.

Le soufre, contrairement au zinc, est facilement oxydable. Cette réaction peut s'effectuer lentement en présence de dioxygène (O<sub>2</sub>) dans l'air ambiant ou plus rapidement si les QDs sont soumis à une irradiation UV [54]. L'hypothèse émise par les auteurs de l'étude citée précédemment est que le soufre se transforme en ions sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et se solubilise dans

le milieu. Ces ions semblent peu toxiques chez l'Homme d'après un rapport de l'ANSES [84]. Cependant, l'oxydation du soufre entraîne sa désorption de la surface du QDs, ce qui libère les autres éléments, comme le zinc cité précédemment.

Un autre élément, retrouvé dans la coquille de certains QDs précédemment cités, est le sélénium (Se). Même s'il s'agit d'un micro-nutriment essentiel à l'Homme à faible dose, il est toxique à plus forte dose. Concernant les QDs, il a été mis en évidence que le Se, tout comme le soufre, est capable de s'oxyder en présence d'O<sub>2</sub> [54]. Le sélénium (Se(-II)) peut alors se transformer en sélénium élémentaire (Se (0)), en sélénite (Se (IV)) et en sélérate (Se (VI)), qui possèdent chacun une toxicité différente. Ainsi, le sélénite et le sélérate se révèlent toxiques à de plus faibles concentrations que le sélénium élémentaire, avec la capacité de générer un stress oxydant dans les cellules [84], [85]. La toxicité du sélénite semble plus élevée que le sélérate, et une étude sur des levures montrent que les composés comportant des thiols (GSH) sont capables de transformer les ions sélénites en séléniure d'hydrogène (H<sub>2</sub>Se) qui est très toxique [86]. Par ailleurs, l'oxydation du sélénium induit sa libération de la surface du QD et expose ainsi le cœur d'InP qui est, pour rappel, classé cancérigène probable chez l'Homme par le CIRC.

Une étude intéressante comparant la toxicité de QDs cœur/coquille InP/ZnS et ZnSe/ZnS, met en évidence une pénétration cellulaire similaire mais une toxicité plus élevée pour ZnSe/ZnS [87]. Il est à noter que ces deux types de QDs ne diffèrent que par la composition de leur cœur. Les QDs de ZnSe se révèlent plus cytotoxiques (viabilité cellulaire moins élevée), et induisent un stress oxydant ainsi que des dommages mitochondriaux plus importants que les QDs d'InP. La présence de ZnSe dans les QDs augmente donc la toxicité de ces derniers. Il est donc probable que la toxicité soit augmentée par la présence de sélénium.

## **5. La barrière cutanée chez l'Homme**

### **5.1. Les structures et fonctions**

#### **5.1.1. Généralités**

La barrière cutanée, plus communément appelée la peau, est un organe protecteur complexe possédant de nombreuses fonctions. Sa surface d'échange, d'environ 2 m<sup>2</sup> chez l'adulte, est nettement inférieure à celle de l'intestin (30-40 m<sup>2</sup>) et du poumon (80 m<sup>2</sup>). Cependant, la peau représente l'organe le plus étendu du corps et le plus lourd (environ 7 % de la masse corporelle chez l'Homme). Elle constitue une barrière physique qui permet à la fois d'empêcher la pénétration de substances exogènes dans l'organisme (microorganismes,

molécules chimiques, ...) et de réguler la sortie de certaines molécules du corps, par exemple, en limitant les pertes hydriques. Elle joue un vrai rôle de filtre et peut échanger avec l'extérieur pour maintenir l'homéostasie du corps. Par exemple, elle participe à la synthèse de la vitamine D après exposition aux rayons ultraviolets (UV) du soleil. Lorsque des lésions apparaissent (coupures, brûlures, ...), elle met en place des mécanismes de défense et de réparation en interagissant avec les cellules immunitaires, ce qui permet la cicatrisation et évite les infections. Cette barrière est vascularisée et innervée, ce qui lui donne une fonction sensorielle. Cela permet à l'Homme de percevoir son environnement par le toucher et de ressentir la température, les pressions, la douleur, mais aussi de réguler des phénomènes physiologiques comme la température corporelle [88], [89].

La barrière cutanée est constituée de trois couches de tissus, à savoir l'épiderme, le derme et l'hypoderme, dans lesquelles se trouvent des annexes telles que les poils ou cheveux, les glandes sudoripares et les glandes sébacées (Figure 12). Elle est également recouverte d'un microbiote.

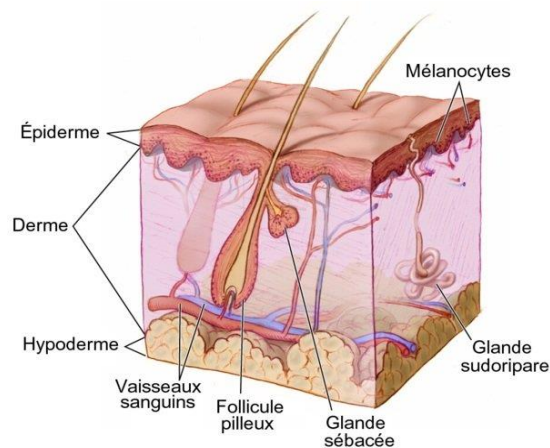


Figure 12 : Schéma structurel de la barrière cutanée [90].

### 5.1.2. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la barrière cutanée. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux pluristratifié en renouvellement constant. Son épaisseur varie en fonction de la zone du corps et peut atteindre environ 1,5 mm dans la paume des mains et la plante des pieds où il est le plus épais. Il est organisé en diverses strates et se compose de différentes cellules décrites ci-dessous (Figure 13).



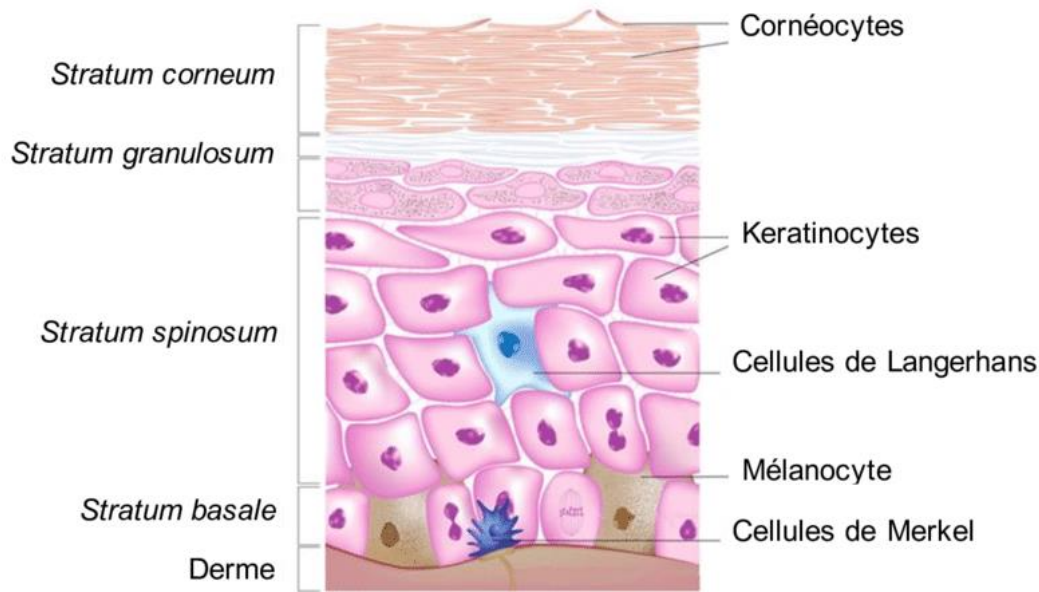


Figure 13 : Schéma structurel de l'épiderme [91].

- Les kératinocytes sont les cellules les plus abondantes de l'épiderme (environ 80 %). Ils se divisent constamment tout en progressant vers la surface. Ils sont présents de la strate basale (*stratum basale*) jusqu'à la strate granuleuse (*stratum granulosum*) où ils subissent un grand nombre de changements morphologiques. Ces changements sont principalement dus à la synthèse de protéines structurelles comme la kératine et la filaggrine qui représentent à elles seules 80 % à 90 % de la masse protéique de l'épiderme. Les kératinocytes se remplissent donc progressivement de protéines et grossissent. Ils passent de cubiques à fusiformes et sont toujours ordonnés en couches. Les protéines synthétisées servent principalement à fabriquer un ciment intercellulaire permettant la cohésion entre les cellules. Les kératinocytes se différencient ensuite en cellules plates anucléées qui ne peuvent plus se diviser : les cornéocytes présents dans la strate cornée (*stratum corneum*) [29], [30]. Cette strate est, en fait, une couche de cellules mortes dont le rôle est de protéger le corps des agressions extérieures. Le pH en surface de celle-ci est acide et peut varier entre 4 et 5,5, ce qui limite le développement d'organismes pathogènes [93]. Les cornéocytes les plus anciens finissent par se détacher de l'épithélium et de nouveaux les remplacent. Il s'agit du phénomène de desquamation, la couche cornée étant totalement renouvelée tous les 15 jours environ [89].

- Les mélanocytes sont plus gros mais beaucoup moins abondants que les kératinocytes (environ un mélanocyte pour trente-six kératinocytes). Ils se situent dans la strate basale et s'intercalent entre les kératinocytes grâce à leurs prolongements appelés dendrites. Ils produisent des granules, appelées mélanosomes, qui renferment un pigment appelé mélanine (Figure 14). C'est ce pigment qui est responsable de la couleur de la peau. Le rôle de ce type

cellulaire est de protéger la peau des irradiations aux ultraviolets (UV). Ainsi, lorsque la peau est exposée aux rayons UV, les mélanocytes sont capables de transmettre leurs mélanosomes aux kératinocytes via leurs dendrites afin de protéger les noyaux de ces derniers d'éventuelles lésions de l'ADN (Figure 14). Ces lésions peuvent être responsables du développement de certains cancers cutanés.

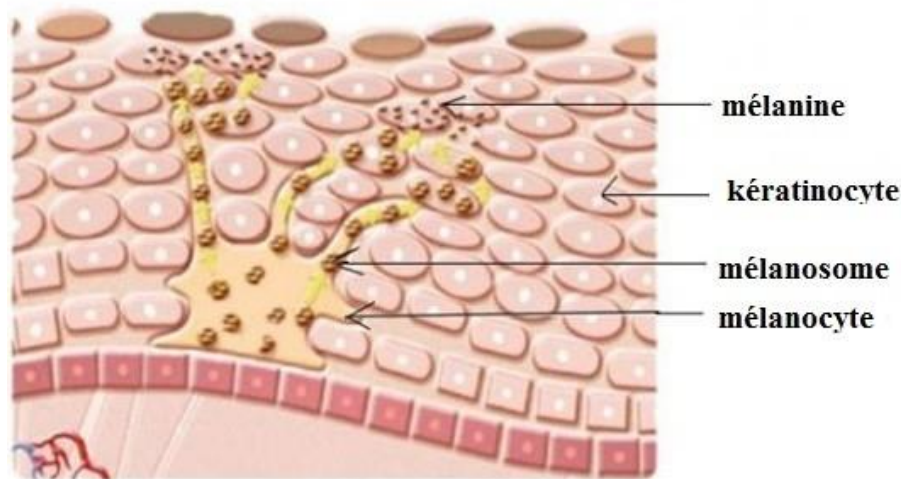


Figure 14 : Schéma d'un mélanocyte [94].

- Les cellules de Langerhans sont des cellules immunitaires dendritiques présentatrices d'antigènes, c'est-à-dire qu'elles récupèrent les allergènes et les présentent aux lymphocytes T. Elles sont présentes dans la strate épineuse (*stratum spinosum*) et représentent 3 à 4 % des cellules de l'épiderme [89]. Ces cellules sont mobiles et peuvent se déplacer dans le derme, par exemple. Elles jouent un rôle immunitaire crucial et sont impliquées dans les réponses inflammatoires aux allergies de contact.

- Les cellules de Merkel sont réparties entre les kératinocytes de la strate basale et sont peu nombreuses (1 % des cellules épidermiques). Elles sont en lien avec les terminaisons nerveuses, à qui elles transmettent l'information d'un stimulus. Elles interviennent donc dans les composantes sensorielles et nerveuses de la barrière cutanée.

### 5.1.3. Le derme

Le derme se compose de tissus conjonctifs plus ou moins denses qui forment un véritable réseau tridimensionnel (Figure 15). Il est localisé sous l'épiderme, est beaucoup plus épais et s'attache à ce dernier via des jonctions dermo-épidermiques. Les cellules qui le composent sont les fibroblastes ainsi que quelques cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, ...). Il est également le principal réservoir d'eau de la peau, ce qui lui permet d'hydrater les couches plus superficielles. C'est un tissu irrigué de capillaires sanguins et de

terminaisons nerveuses (Figure 12). Il permet à la peau d'avoir des propriétés élastiques remarquables. Les fibroblastes sont les cellules majeures du derme. Elles ont une forme en étoile avec des ramifications cytoplasmiques. Elles synthétisent de nombreuses protéines et protéoglycanes nécessaires à la matrice extracellulaire (Figure 15).

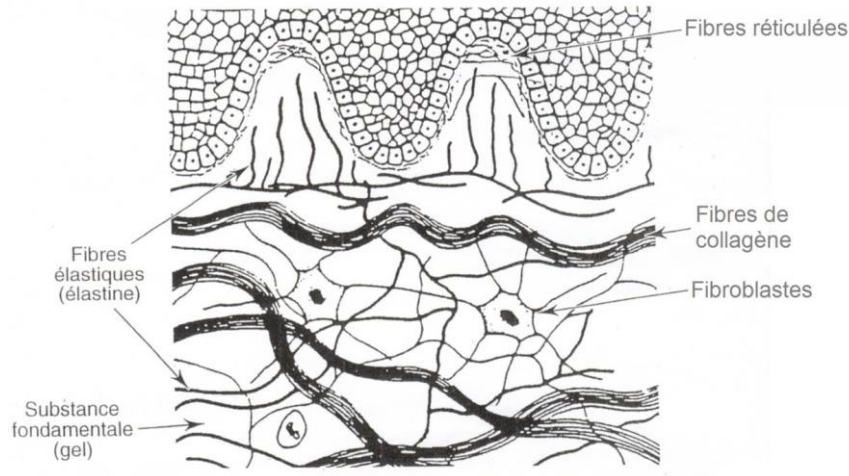


Figure 15 : Schéma structurel du derme [95].

- Le collagène est la protéine la plus abondante. Il en existe plusieurs types différents dans le derme, mais c'est le collagène I qui est transformé en fibres pour donner au tissu sa structure ainsi que sa résistance aux tensions.

- L'élastine est la protéine majeure des fibres élastiques. Elle est synthétisée jusqu'à la puberté puis sa quantité diminue progressivement au cours du vieillissement. Comme son nom l'indique, elle permet à la peau d'être élastique et souple. Lors d'une tension mécanique, la peau peut donc s'étirer puis revenir à son état initial. Le processus de vieillissement qui se traduit par la perte de l'élasticité de la peau et l'apparition de rides est en grande partie dû à la dégradation de l'élastine. D'autres facteurs peuvent augmenter ce phénomène, notamment l'exposition aux UV du soleil.

- La réticuline est la protéine formant les fibres réticulées. Elle est principalement localisée au niveau des jonctions dermo-épidermiques et des annexes.

- Le gel interfibrillaire est le gel où baignent tous les éléments du derme et permet la cohésion entre les cellules. Il est constitué d'eau, de sels, de protéoglycanes (comme l'acide hyaluronique qui permet la rétention de l'eau au sein de la matrice et donc une bonne hydratation), et de glycoprotéines (comme la fibronectine qui permet l'ancrage des fibroblastes dans la matrice).

#### 5.1.4. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche situé en dessous du derme. Il s'agit de la dernière couche de tissu de la peau, localisée juste au-dessus des muscles (Figure 12). Il est constitué en majeure partie de cellules graisseuses : les adipocytes, dont la fonction principale est de stocker les triglycérides et qui jouent le rôle de réserve énergétique (Figure 16). Leur rôle principal est de préserver le corps du froid lors du processus physiologique de thermorégulation [89].

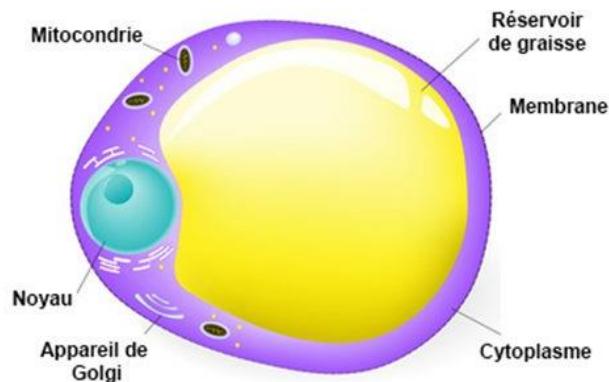


Figure 16 : Schéma d'un adipocyte [96].

#### 5.1.5. Les annexes

Les annexes cutanées sont des structures qui sont implantées dans le derme et qui traversent la barrière cutanée jusqu'à la surface de l'épiderme (Figure 12). Il en existe deux principales :

- Les follicules pilo-sébacés sont des unités constituées des glandes sébacées et des follicules pileux ou poils (Figure 12). La glande sébacée produit le sébum qui lubrifie et acidifie la surface de la peau et le poil. Cela évite le dessèchement de l'épiderme et le développement de microorganismes pathogènes. Les glandes sébacées, ainsi que les produits de dégradation cellulaire de l'épiderme, produisent alors un film hydrolipidique qui protège la peau, maintient un niveau d'hydratation correct et empêche l'entrée de substances exogènes hydrophiles.

- Les glandes sudoripares sont chargées de produire la sueur. Il en existe deux sortes : eccrine et apocrine. La première est principalement impliquée dans le système de refroidissement de l'organisme. La sueur sécrétée, qui est constituée d'eau à 99 % (le reste étant composé de sels comme le potassium ou l'ammoniaque, ...), s'évapore instantanément, induisant une diminution de la température corporelle. Elle permet également de maintenir l'hydratation du film hydrolipidique. Le deuxième type de glande produit une sueur plus

épaisse, riche en cholestérol et acides gras. Elle est utilisée par les micro-organismes de la flore cutanée et peut devenir malodorante [89], [97].

#### **5.1.6. Le microbiote cutané**

Le microbiote cutané consiste en une multitude de bactéries, levures et champignons qui colonisent la peau et constitue la première ligne de défense de l'organisme. Il est principalement localisé sur la première strate de l'épiderme, la strate cornée, mais peut également se retrouver dans le derme en plus petite quantité. Ce microbiote se répartit en deux catégories : la flore résidente, qui se compose de micro-organismes toujours présents dans des proportions fixes, et la flore transitoire. Cette dernière provient d'une contamination extérieure, mais elle est contrôlée par la flore résidente et donc ne prolifère pas. La répartition des différentes espèces qui composent la flore cutanée varie au sein d'un même individu en fonction de la zone du corps, de la quantité de sébum sécrétée (qui est source de nutriments), de l'environnement (la température, présence d'UV, d'eau ou de dioxygène), du pH cutané, du niveau de stress, ... Il existe également des variations entre les individus dus à des facteurs intrinsèques (âge, sexe, ...) ou à des facteurs extrinsèques (mode de vie, localisation géographique, ...). Tous ces facteurs font que la flore cutanée évolue constamment [97].

### **5.2. Les modèles cellulaires *in vitro* de la barrière cutanée**

#### **5.2.1. Généralités**

Ces dernières années, pour des raisons éthiques, de nombreux modèles cellulaires *in vitro* ont été développés pour permettre de mimer une exposition de la peau à des agents exogènes sans avoir à utiliser les tests sur les animaux. Ces modèles humains vont des lignées cellulaires commerciales aux lignées primaires en passant par la réalisation de modèles tridimensionnels plus ou moins fonctionnels de peau. Parmi les modèles de peau tridimensionnels, il existe les modèles *ex vivo* (explants chirurgicaux de donneurs cultivés à l'interface air-liquide) et les modèles multicouches qui peuvent être obtenus de diverses manières (ensemencement classique en superposant différentes lignées cellulaires, impression 3D, ...). Ces modèles peuvent alors posséder de nombreuses propriétés, comme la pigmentation, la vascularisation, voir même la fonction immunitaire [98], [99]. Ils se rapprochent au mieux de l'exposition *in vivo* et permettent de comprendre certaines physiopathologies, comme le recrutement des cellules immunitaires dans les maladies inflammatoires [100]–[102]. Ils sont aujourd'hui très évolués et ne cessent de s'améliorer. Cependant, ce sont des modèles très complexes à étudier pour comprendre les mécanismes impliqués aux niveaux cellulaire et biomoléculaire. Pour étudier l'effet d'un agent exogène sur

les voies de signalisation, il est préférable de se focaliser sur un seul type cellulaire. Dans le cas de l'exposition cutanée, les premières cellules qui vont être en contact avec l'agent sont celles de l'épiderme, et plus précisément, les kératinocytes. Parmi ces derniers, il existe les lignées immortalisées comme, par exemple, les HaCaT. Ce sont des cellules très faciles à cultiver, qui peuvent supporter un grand nombre de passages et qui permettent d'obtenir des résultats reproductibles d'une expérience à l'autre. Cependant, ces cellules sont immortalisées et peuvent donc avoir des réponses différentes des kératinocytes natifs au niveau de l'expression de certains gènes [103]. Il est donc indispensable d'être prudent lors de l'analyse de résultats provenant de ce type de lignée. Pour pallier ce problème, des kératinocytes primaires humains, directement extraits d'explants chirurgicaux peuvent être employés. Ces cellules, n'étant pas immortalisées, sont plus difficiles à cultiver car elles ont un nombre de passages limité après lequel elles ne se divisent plus et perdent leurs caractéristiques, mais elles se rapprochent un peu plus du modèle *in vivo*. Ces cellules sont à l'origine des résultats de ces travaux de thèse et sont décrites plus en détail dans le paragraphe suivant.

### 5.2.2. Le modèle des kératinocytes primaires humains

Les kératinocytes primaires humains sont obtenus à partir d'explants chirurgicaux issus de différents donneurs consentants, principalement lors de circoncisions et de restrictions mammaires ou abdominales [104]–[106].

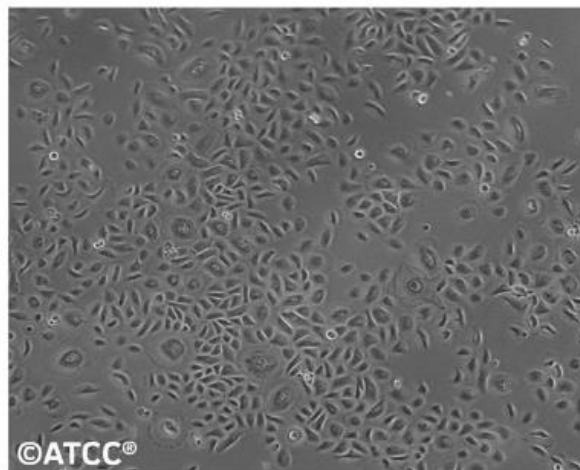


Figure 17 : Kératinocytes primaires humains à forte densité observés en microscopie [107].

Ce sont des cellules adhérentes, plutôt rondes, qui s'associent les unes aux autres pour former des sortes d'îlots (Figure 17). Elles ne supportent qu'un nombre très limité de passages et une grande variabilité existe entre les donneurs. Par exemple, des facteurs comme l'âge, le sexe, le phototype (Tableau 2) peuvent être à l'origine de ces variabilités interindividuelles. Ce sont également des cellules qui nécessitent un niveau de vigilance élevé lors des manipulations.

En effet, les explants peuvent être contaminés par certains virus et même les cellules commercialisées, qui doivent répondre négativement aux tests viraux (VIH, hépatite B et C, ...), ne peuvent, en aucun cas, exclure l'existence d'un potentiel génome latent [107]. Ces cellules sont utilisées pour comprendre les mécanismes biologiques cutanés, notamment en toxicologie, par exemple, pour étudier les effets des cosmétiques ou des nanoparticules en contact avec la peau [108], ou en cancérologie, comme pour étudier l'effet des rayonnements UV et les systèmes de réparations de l'ADN [109].

Tableau 2 : Classification des phototypes selon l'échelle de Fitzpatrick [110].

type de peau	couleur de peau	couleur de cheveux (le plus foncé)	couleur des yeux (les plus communs)	Description
I	Blanc ou très pâle	Blond	Bleu, gris, vert	Brûle toujours, ne bronze jamais
II	Blanc pâle à beige pâle	Chatain à brun foncé	Bleu	Brûle toujours, bronze parfois
III	Beige à brun pâle (olive)	Brun foncé	Brun	Brûle parfois, bronze toujours
IV	Brun pâle à moyen	Noir	Brun foncé	Brûle rarement, bronze toujours
V	Brun moyen à foncé	Noir	Brun noir	Brûle rarement, bronze plus que la moyenne
VI	Brun foncé à noir	Noir	Noir	Brûle jamais

### 5.3. Les grandes fonctions cellulaires étudiées

Dans le cadre de ces travaux de thèse, certaines grandes fonctions cellulaires ont été étudiées, en accord avec la bibliographie effectuée sur les données toxicologiques des QDs (cf. partie 4). Ces dernières sont abordées en détail ci-dessous.

#### 5.3.1. Les mécanismes de défenses immunitaires

Toute perturbation de la barrière cutanée (rayonnement UV, agents irritants, agents pathogènes, ...) entraîne une succession de réponses immunitaires qui sont le résultat d'une communication efficace entre les différentes cellules de la peau (Figure 18). Tout comme les cellules de l'intestin, les kératinocytes constituent la première ligne de défense face aux perturbations et jouent un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire innée (non spécifique mais immédiate) [111]. Ils vont produire des cytokines pro-inflammatoires, telles que des interleukines (IL1 $\beta$ , IL6, IL10 et IL18) et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Cela va permettre l'activation des cellules dendritiques (DCs), que l'antigène soit présent ou non. D'autres signaux de stress peuvent être produits par les kératinocytes, comme des peptides

antimicrobiens (AMP) et de nombreuses chimiokines. Par exemple, la production de IL8 localisée au niveau de l'agression permet la chimiotaxie, c'est-à-dire d'attirer les leucocytes qui vont suivre le gradient de concentration de chimiokines [111], [112]. Certains signaux vont aussi permettre de stimuler les cellules dendritiques plasmatoïdes (pDC), qui vont activer les DCs via la libération de l'interféron  $\alpha$  (INF $\alpha$ ). Les fibroblastes et les cellules T *natural killer* (NKT) vont également intervenir dans la réponse inflammatoire locale grâce à la synthèse de TNF, IL6 et INF $\gamma$ . L'activation des DCs dermiques par ces différentes voies va permettre d'initier la réponse immunitaire adaptative, plus tardive mais spécifique de l'antigène. Cette activation entraîne l'expansion clonale des lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) qui produisent, eux aussi, des cytokines et chimiokines, ce qui stimule à nouveau les cellules épithéliales, dont les kératinocytes. Ce phénomène permet l'amplification de la réponse inflammatoire. Les lymphocytes T peuvent également se déplacer dans l'épiderme, permettant une transmission du signal immunitaire plus localisée, au niveau de la perturbation. Les cellules de Langerhans, quant à elles, sont les macrophages résidants et donc des cellules présentatrices d'antigènes. Elles interviennent directement en captant l'antigène puis en se déplaçant dans les tissus et les ganglions lymphatiques pour le présenter aux lymphocytes. Elles peuvent aussi être activées par les cytokines environnantes produites par les kératinocytes.

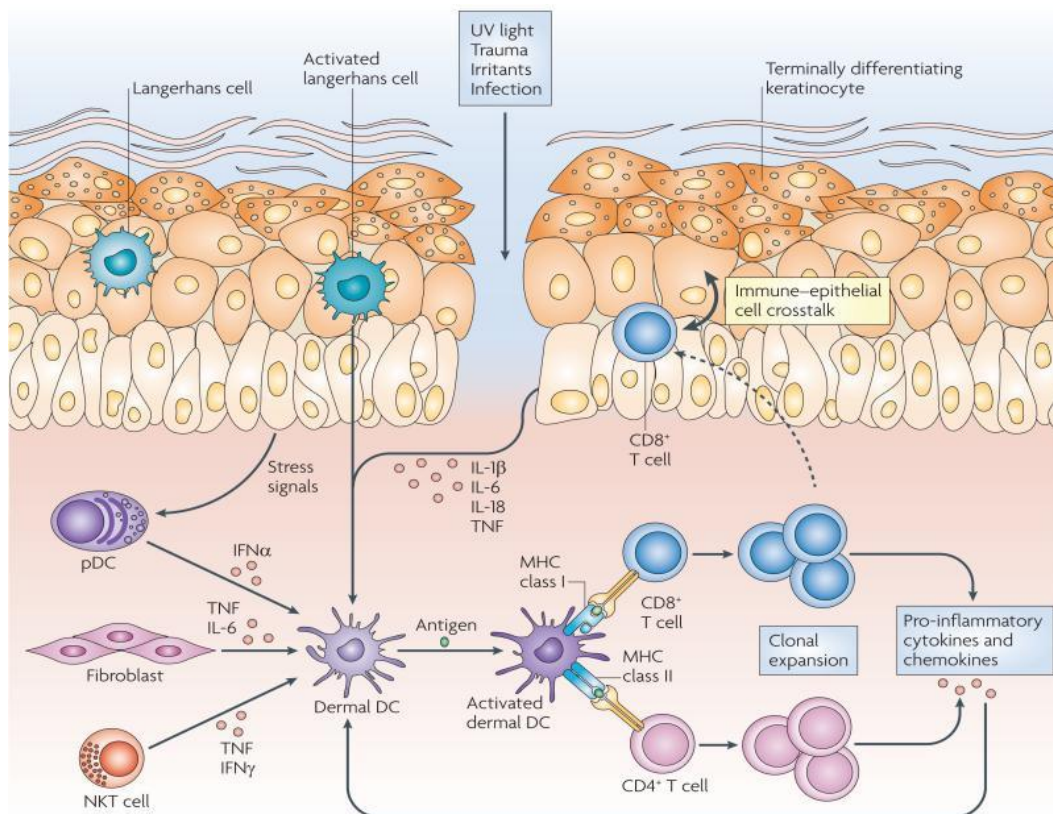


Figure 18 : Schéma du fonctionnement de l'immunité cutanée [111].



### 5.3.2. Les mécanismes de défenses antioxydants

Les cellules subissent constamment des agressions endogènes ou exogènes, ce qui peut avoir pour effet d'augmenter le niveau intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les mécanismes de défenses antioxydants, qui permettent de protéger les biomolécules de ces agressions, se composent de différentes molécules capables de maintenir ou de restaurer le taux basal de ROS (Figure 19). Il existe donc un équilibre entre la formation de ROS et leur dégradation par les systèmes de défense. Parmi eux, il existe :

- Les enzymes antioxydantes : Les principaux systèmes enzymatiques sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathions peroxydases (GPx) et l'hème oxygénase (HO). Ces enzymes protègent les cellules des ROS. Les SODs sont des métalloenzymes, c'est-à-dire qu'elles ont besoin de métaux pour initier une activité catalytique. Elles peuvent être cytoplasmiques ou extracellulaires comme la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), mais aussi mitochondriales comme la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD). La fonction des SODs est de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en dioxygène ( $O_2$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La CAT est une enzyme hémunique présente en grande partie dans les peroxysomes des cellules. Sa fonction est de dismuter, à son tour, le  $H_2O_2$  produit par les SODs en molécules moins dangereuses ( $H_2O$  et  $O_2$ ). Cette fonction est également assurée par un deuxième système enzymatique, les GPx. Ce sont des sélénoprotéines, c'est-à-dire qu'elles possèdent dans chaque sous-unité un atome de sélénium, localisé sur le groupement thiol de la cystéine à la place du soufre. Elles permettent de réduire  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , tout en oxydant le glutathion de forme réduite (GSH). Des glutathion réductases vont ensuite intervenir pour régénérer le GSH. Il existe également une autre enzyme, l'HO dont la fonction est de catalyser la dégradation de l'hème en biliverdine. Parmi ces isoformes, l'hème oxygénase 1 (HO-1) peut être induite par de nombreux facteurs tels que des métaux lourds ou des cytokines inflammatoires [113].

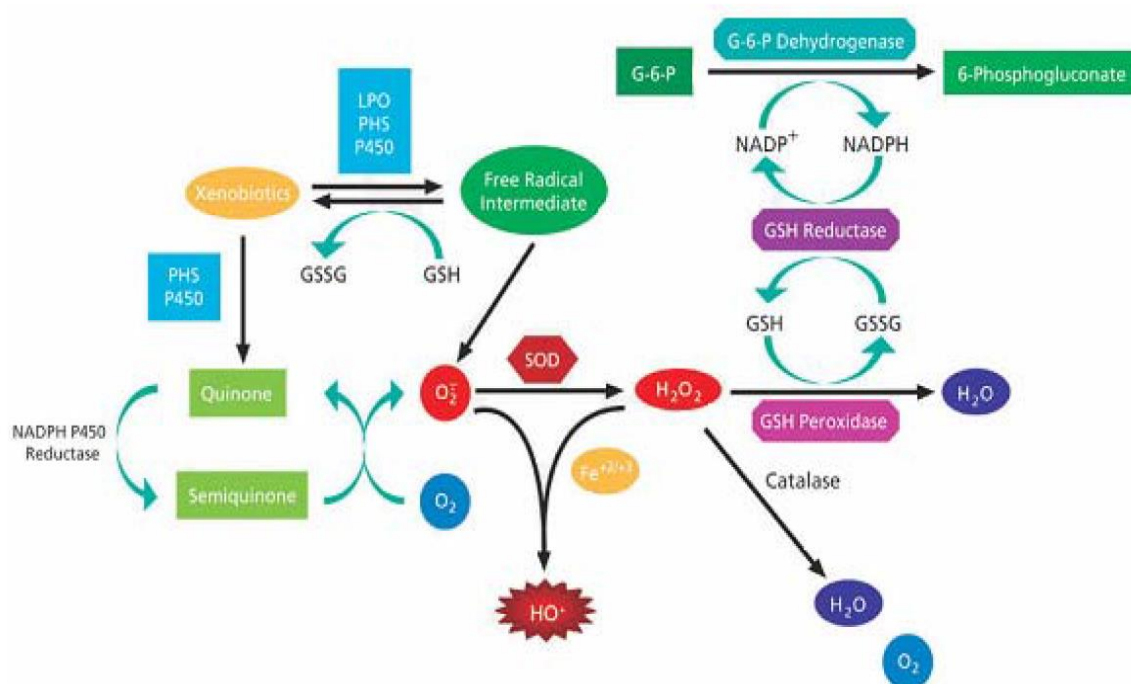


Figure 19 : Schéma des différents mécanismes de défenses antioxydants enzymatiques [83].

- Les molécules antioxydantes non-enzymatiques : Elles peuvent être de nature exogène comme, par exemple, les vitamines et les oligo-éléments apportés par l'alimentation, ou de nature endogène, comme le glutathion ou les métallothionéines (MTs) biosynthétisés. Ces molécules permettent de piéger les ROS en oxydant leurs thiols en ponts disulfures.

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les cellules humaines. Il se trouve sous forme réduite (GSH) ou oxydé (GSSG) et le rapport des deux peut être un bon indicateur du niveau de stress oxydant. Sa synthèse est régulé par le gène GCLM qui code pour l'enzyme glutamate-cystéine ligase (GCL). Il possède de nombreuses fonctions, notamment la détoxification des métaux lourds, et, comme cité précédemment, il sert également de substrat pour les GPx. Lorsque des métaux lourds, comme par exemple le cadmium, sont présents dans la cellule, la synthèse de GSH augmente pour chélater le métal et éviter de potentiels dommages. Cependant, si le niveau de stress est trop élevé, le système, ne pouvant plus réduire le glutathion saturé et le GSSG s'accumule [114].

Les MTs sont riches en soufre, ce qui leur permet de fixer un ou plusieurs ions métalliques (cuivre, zinc et cadmium) dans leurs sites actifs. Cette propriété leur confère un rôle important dans la détoxification des métaux lourds. Une autre fonction des MTs est de piéger les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}^\bullet$ ) de manière très efficace [83], [115]. Les MTs les plus étudiées chez l'Homme sont les isoformes MT-I et MT-II, régulées principalement grâce au facteur de

transcription MTF-1 ainsi que son site de fixation spécifique MRE. MTF-1 chélate les ions  $Zn^{2+}$  qui vont ensuite être transférés au noyau où ce complexe pourra se lier à la séquence cible MRE et, finalement, induire la transcription des MTs (Figure 20).

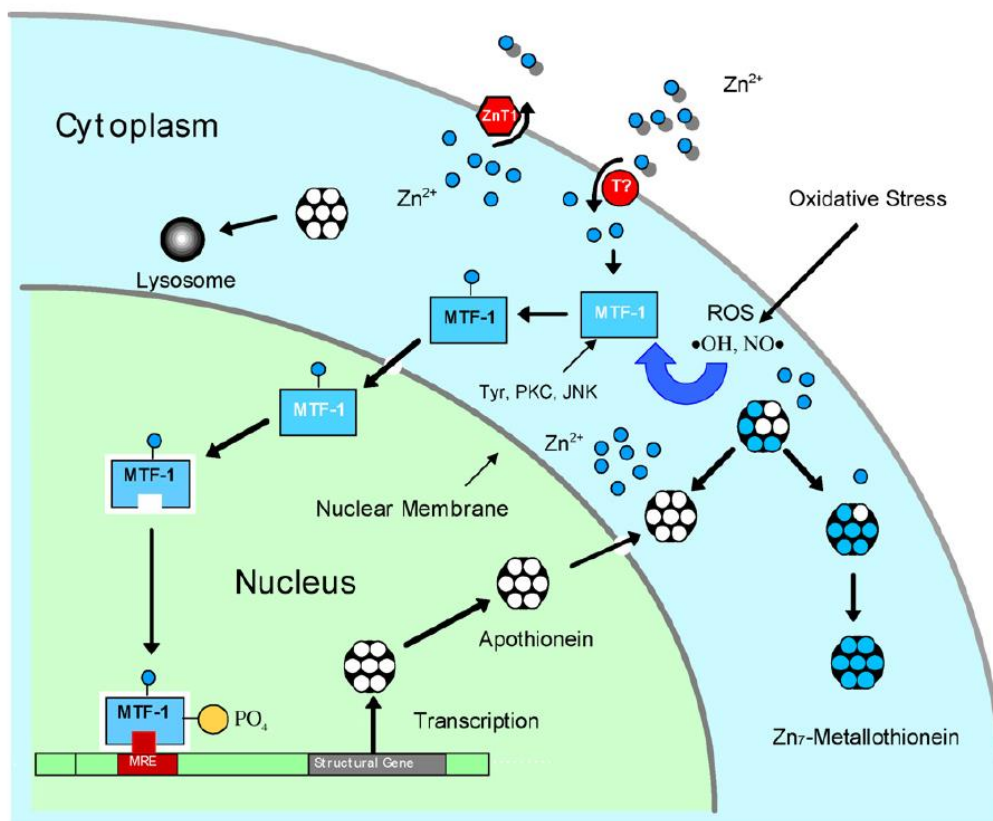


Figure 20 : Régulation des métallothionéines par le zinc et le stress oxydant [116].

### 5.3.3. Les autres mécanismes cellulaires étudiés

- L'homéostasie du zinc : la régulation du zinc par les cellules se fait via différents transporteurs. Il en existe deux catégories, les ZnTs (qui sont codés par les gènes SLC30) et les ZIPs (qui sont codés par les gènes SLC39). Leurs fonctions sont radicalement opposées puisque les ZnTs servent à réduire la quantité de zinc cytoplasmique, alors que les ZIPs servent à augmenter cette dernière [117]–[119]. Ces fonctions sont obtenues par le biais de nombreux transporteurs, localisés dans les différents compartiments cellulaires (Figure 21). Par exemple, ZnT1, qui exporte le zinc du cytosol vers le milieu extracellulaire, permet de détoxifier la cellule lorsque de grandes quantités de zinc s'y sont accumulées. La régulation de l'expression des gènes ZnT1 et ZnT7 se fait en partie par le promoteur MTF-1 qui est aussi le facteur de transcription des MTs. Ces différentes protéines se retrouvent donc en compétition pour la détoxification du zinc cytosolique, les MTs agissent cependant en priorité [117].

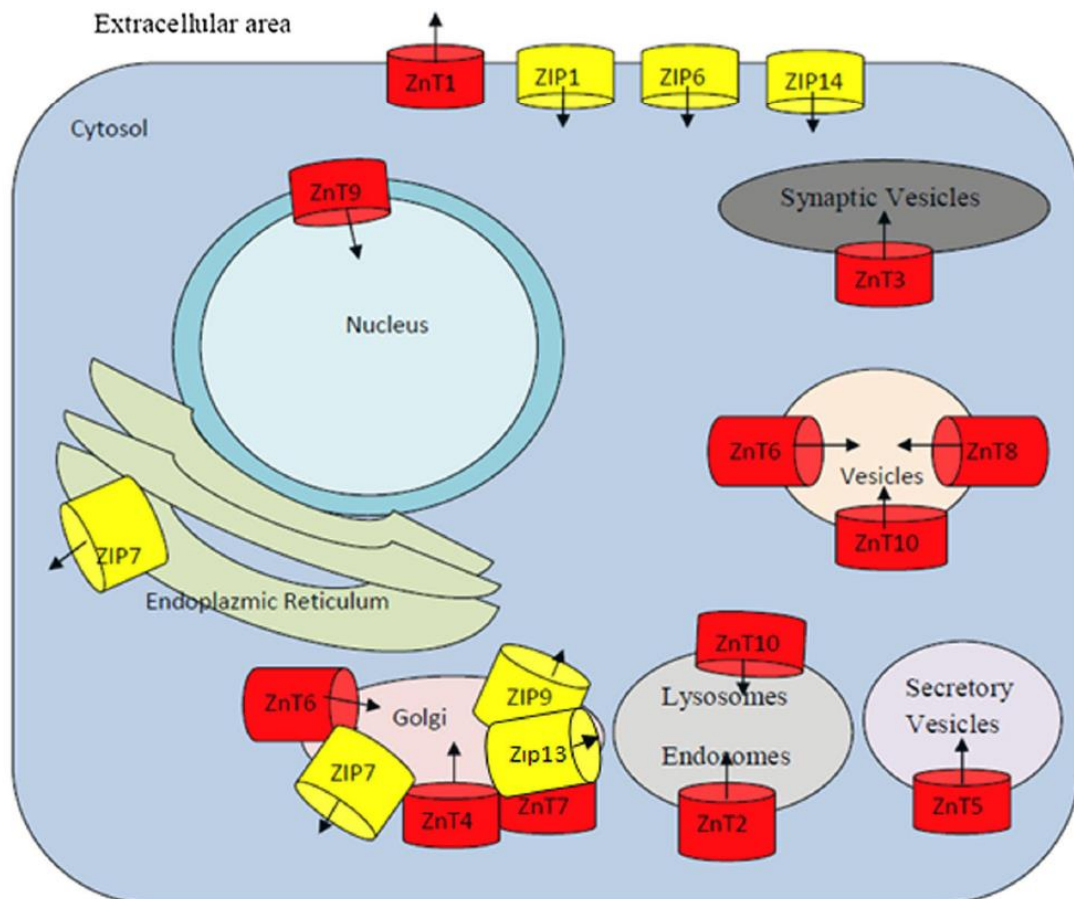


Figure 21 : Schéma de la localisation des différents transporteurs de zinc dans la cellule humaine [119].

- Les protéines de choc thermique (HSP) : les HSPs sont des protéines chaperonnes qui possèdent de nombreuses fonctions. Les HSPA, anciennement appelées HSP70, sont les plus abondantes et les plus conservées entre les espèces. Elles ont pour rôles principaux de maintenir la conformation des protéines et de protéger la cellule face aux divers stress externes qu'elles subissent. Plus précisément, les HSPA6 sont localisées dans le cytosol et le noyau des cellules humaines. Elles sont impliquées dans de nombreuses voies cellulaires comme la protection du protéome face aux stress, le bon repliement des protéines néosynthétisées et la formation ou dissociation de certains complexes protéiques [120], [121].

- L'arrêt du cycle cellulaire par la protéine P21 : cette protéine est principalement régulée par P53 (Figure 22). En effet, en présence de lésion de l'ADN, P53 va activer la transcription de P21 ce qui a pour effet de bloquer le cycle cellulaire en phase G1. La fonction de P21 est d'inhiber les cyclines kinases dépendantes (CDK) qui ont pour rôle d'activer le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S [122]–[124]. L'arrêt du cycle permet à la cellule de mettre en place des systèmes de réparations ou de rentrer en apoptose si les lésions sont trop importantes.

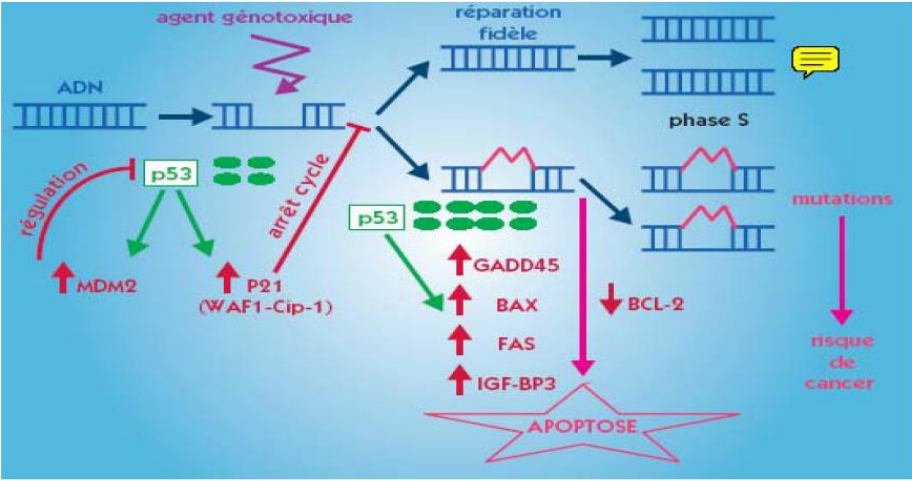


Figure 22 : Mécanismes induits par P21 [83].

---

## Objectif de l'étude

---

Le constat actuel est que la consommation de QDs est en plein essor depuis ces dernières années. Cela est en grande partie dû à l'engouement de la population pour les écrans (tablettes, smartphones, écrans plats...) dans lesquels les QDs sont inclus pour augmenter la qualité des couleurs, ainsi que le développement des nanotechnologies. Cependant, les études sur les effets potentiels de ces nano-objets sur la santé ne sont pas nombreuses et les premières évaluations de risques ont été réalisées après leur mise sur le marché. Les résultats de toxicité obtenus sur les QDs à base de Cd ont démontré une importante toxicité, notamment lorsque ces derniers se dégradent à l'air ambiant et sous irradiation UV. Ces résultats, à l'origine de nombreux débats, ainsi que l'apparition de la directive européenne RoHS qui limite l'utilisation du cadmium dans les équipement électriques et électroniques (cf. partie 3), ont poussé les industries ainsi que les laboratoires à investir dans la recherche d'alternatives moins toxiques. Depuis, de nouvelles générations de QDs accompagnées d'études de toxicité voient le jour. L'objectif de cette thèse est donc d'**évaluer la toxicité de nouvelles générations de QDs**. Ces derniers ont été conçus en collaboration avec l'équipe STEP du laboratoire SyMMES, d'après une approche « *safer by design* », dans le cadre du projet SAQUADO financé par le LabEx SERENADE. Les synthèses ont été faites par Karl David Wegner, post-doctorant travaillant dans l'équipe de Peter Reiss au CEA de Grenoble (IRIG/SyMMES/STEP).

Dans un premier temps, des QDs présentant des cœurs dépourvus de métaux lourds ont été explorés dans le but de s'affranchir de la toxicité du Cd. L'InP a été sélectionné car ses propriétés optiques rendent l'émission des QDs modulable du visible au proche infra-rouge, ce qui en fait une bonne alternative au CdSe. De plus, l'InP a été dopé au Zn pour améliorer davantage ses propriétés optiques. Dans un second temps, un travail sur les coquilles a été effectué pour protéger le cœur de la dégradation, tout en améliorant, une nouvelle fois, ses propriétés optiques. Ainsi, le cœur d'InP a été recouvert d'une ou deux coquilles successives. La première coquille de Zn(Se,S) permet d'assurer une bonne cohésion avec le cœur. La seconde, constituée de ZnS a été conçue de deux manières différentes, soit fine soit plus épaisse, dans le but d'étudier l'influence de l'épaisseur de la coquille sur la toxicité des QDs [33].

Dans cette approche « *safer by design* », il convient donc **d'étudier le devenir de ces QDs tout au long de leur cycle de vie**, notamment en fin de vie, lorsqu'ils se dégradent. L'évaluation de leur toxicité est réalisée en parallèle sur les **QDs natifs** (en suspension

colloïdale) mais également sur les *QDs vieillis en mimant une dégradation environnementale* (précipités après vieillissement accéléré en enceinte climatique).

Cette thèse se décompose donc en trois parties, la première décrivant le processus de dégradation des QDs lors de l'exposition aux UV dans des conditions environnementales, la seconde, plus méthodologique, sur le développement de nouveaux tests de criblages à moyen débit en toxicologie, et la troisième portant sur l'étude toxicologique des QDs décrits dans la première partie en utilisant notamment les méthodes développées dans la deuxième partie.

## **Références :**

- [1] « Nanomatériaux, nanoparticules. Effets sur la santé - Risques - INRS ». <http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/effets-sante.html> (consulté le déc. 20, 2019).
- [2] jtre moulet, « Les nanoparticules », CMI IPA, janv. 09, 2018. <http://cmi-ipa.univ-avignon.fr/2018/01/09/les-nanoparticules/> (consulté le févr. 19, 2020).
- [3] « Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE », p. 3.
- [4] « Mercier - Matériaux nanostructurés industriels.pdf ». Consulté le: déc. 20, 2019. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.mediachimie.org/sites/default/files/nanomateriaux\\_p53.pdf](http://www.mediachimie.org/sites/default/files/nanomateriaux_p53.pdf).
- [5] E. Gaffet, « Nanomaterials : a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development », 2011.
- [6] « R-Nano.fr ». <https://www.r-nano.fr/> (consulté le déc. 20, 2019).
- [7] « 2018-12 - Rapport R-nano 2018.pdf.pdf ». Consulté le: mars 10, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/sites/default/files/2018-12%20-%20Rapport%20R-nano%202018.pdf.pdf>.
- [8] « REACH et les nanomatériaux | REACH INFO ». <https://reach-info.ineris.fr/focus/reach-et-les-nanomat%C3%A9riaux> (consulté le janv. 07, 2020).
- [9] « RÈGLEMENT (UE) 2018 1881 DE LA COMMISSION .pdf ». Consulté le: févr. 20, 2020. [En ligne]. Disponible sur: [https://reach-info.ineris.fr/sites/reach-info.gesreg.fr/files/pdf/reg2018\\_1881\\_reach.pdf?\\_ga=2.146698864.555092356.1582202519-344762542.1582202519](https://reach-info.ineris.fr/sites/reach-info.gesreg.fr/files/pdf/reg2018_1881_reach.pdf?_ga=2.146698864.555092356.1582202519-344762542.1582202519).
- [10] « World Health Organization et Department of Public Health - 2017 - WHO guidelines on protecting workers from potentia.pdf ». Consulté le: janv. 14, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259671/9789241550048-eng.pdf?sequence=1>.
- [11] « Maîtrise des risques potentiels liés aux nanomatériaux pour préventeurs NanoCERT préventeur, en vue de la certification de compétence des préventeurs | Ineris formation ». <https://www.ineris-formation.fr/fr/formations/management-risques/nanotechnologie/maitrise-risques-potentiels-lies-nanomateriaux> (consulté le janv. 14, 2020).
- [12] « 1272-2008-clp.pdf ». Consulté le: janv. 15, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://documents.lne.fr/publications/reglements/1272-2008-clp.pdf>.
- [13] « Veillénanos, une veille citoyenne sur les nanos : EthiquetageNano ». <http://veillénanos.fr/wakka.php?wiki=EthiquetageNano> (consulté le janv. 15, 2020).
- [14] « Arrêté du 17 avril 2019 portant suspension de la mise sur le marché des denrées contenant l'additif E 171 (dioxyde de titane - TiO<sub>2</sub>) | Legifrance ». <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2019/4/17/ECOC1911549A/jo/texte> (consulté le janv. 16, 2020).
- [15] « Règlement (UE) 2018 du Parlement européen et du C.pdf ». Consulté le: janv. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0848&from=EN>.
- [16] C. Auplat, « Safer by design et nanotechnologies », p. 15, 2019.
- [17] « NANOSMILE - L'approche "safer by design" ». <http://www.nanosmile.org/index.php/fr/cycle-de-vie/l-approche-safer-by-design> (consulté le janv. 08, 2020).
- [18] L. M. Gwenaëlle, « Département Hygiène Sécurité Environnement », p. 37.



- [19] « Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces | Elsevier Enhanced Reader ».  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2095177918305458?token=7FE689238C2F9B8368AF17566C6A85A966A3EBBA893E95AF041E22E5D3656D57761ECB8D23D50E9F03C5F449B2288E7B> (consulté le févr. 18, 2020).
- [20] « Nanomatériaux. Prévention des risques dans les laboratoires », p. 58.
- [21] P. Blazy et E.-A. Jdid, « Métallurgie de l'indium », p. 17, 2009.
- [22] Y. Traore, « Perspective nouvelle pour la récupération de l'indium issu des e-déchets par électrodéposition dans les liquides ioniques à température ambiante », p. 260.
- [23] P. Reiss, M. Protière, et L. Li, « Core/Shell Semiconductor Nanocrystals », *Small*, vol. 5, no 2, p. 154-168, janv. 2009, doi: 10.1002/smll.200800841.
- [24] P. Reiss, M. Carrière, C. Lincheneau, L. Vaure, et S. Tamang, « Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials », *Chem. Rev.*, vol. 116, no 18, p. 10731-10819, sept. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00116.
- [25] A. Y. Ammar, « Synthèse, caractérisations et fonctionnalisation de nanocristaux semi-conducteurs luminescents », p. 197.
- [26] P. Reiss et F. Chandezon, « Nanocristaux semi-conducteurs fluorescents. Des nanoparticules aux applications multiples », p. 22, 2015.
- [27] P. W. Brazis, « QUANTUM DOTS AND THEIR POTENTIAL IMPACT ON LIGHTING AND DISPLAY APPLICATIONS », p. 17.
- [28] F.-A. Kauffer, « Synthèse, stabilité et toxicité de quantum dots à coeur CdSe », p. 288.
- [29] « CdSe ZnS Quantum Dots less Price Worldwide Delivery - Nanoshel », Nanoshel a Nanotechnology Company. <https://www.nanoshel.com/product/cdse-zns-quantum-dots> (consulté le mars 18, 2020).
- [30] « REGLEMENTATIONS - Directive RoHS », Eco-3e, oct. 18, 2011.  
<http://eco3e.eu/reglementations/rohs/> (consulté le mars 19, 2020).
- [31] C. Philippot et P. Reiss, « Chapter 3 - Synthesis of Inorganic Nanocrystals for Biological Fluorescence Imaging », in *Frontiers of Nanoscience*, vol. 4, J. M. de la Fuente et V. Grazu, Éd. Elsevier, 2012, p. 81-114.
- [32] A. Tarantini et al., « Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation », *NanoImpact*, vol. 14, p. 100168, févr. 2019, doi: 10.1016/j.impact.2019.100168.
- [33] K. D. Wegner et al., « Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity », *Front. Chem.*, vol. 7, p. 466, juin 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00466.
- [34] K. D. Wegner et N. Hildebrandt, « Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no 14, p. 4792-4834, 2015, doi: 10.1039/C4CS00532E.
- [35] S. Tamang, G. Beaune, I. Texier, et P. Reiss, « Aqueous Phase Transfer of InP/ZnS Nanocrystals Conserving Fluorescence and High Colloidal Stability », *ACS Nano*, vol. 5, no 12, p. 9392-9402, déc. 2011, doi: 10.1021/nn203598c.
- [36] V. V. Breus, C. D. Heyes, K. Tron, et G. U. Nienhaus, « Zwitterionic Biocompatible Quantum Dots for Wide pH Stability and Weak Nonspecific Binding to Cells », *ACS Nano*, vol. 3, no 9, p. 2573-2580, sept. 2009, doi: 10.1021/nn900600w.
- [37] Y.-K. Hsieh et al., « Using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize the biointeractions of inhaled CdSe quantum dots in the mouse lungs », *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 28, no 9, p. 1396-1401, août 2013, doi: 10.1039/C3JA50063B.

- [38] L. Ma-Hock et al., « Short term inhalation toxicity of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> core shell quantum dots in male Wistar rats », *Toxicology Letters*, vol. 208, no 2, p. 115-124, janv. 2012, doi: 10.1016/j.toxlet.2011.10.011.
- [39] V. Karabanovas, E. Zakarevicius, A. Sukackaite, G. Streckyte, et R. Rotomskis, « Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)/ZnS quantum dots in the digestive tract of rats », *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 7, no 6, p. 725, 2008, doi: 10.1039/b707920f.
- [40] J. Liu et al., « Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 57, p. 222-231, déc. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.07.044.
- [41] M. Bottrill et M. Green, « Some aspects of quantum dot toxicity », *Chem. Commun.*, vol. 47, no 25, p. 7039, 2011, doi: 10.1039/c1cc10692a.
- [42] P. N. Wicinski, K. M. Metz, A. N. Mangham, K. H. Jacobson, R. J. Hamers, et J. A. Pedersen, « Gastrointestinal biodurability of engineered nanoparticles: Development of an in vitro assay », *Nanotoxicology*, vol. 3, no 3, p. 202-214, janv. 2009, doi: 10.1080/17435390902859556.
- [43] Y. F. Loginova, S. V. Dezhurov, V. V. Zherdeva, N. I. Kazachkina, M. S. Wakstein, et A. P. Savitsky, « Biodistribution and stability of CdSe core quantum dots in mouse digestive tract following per os administration: Advantages of double polymer/silica coated nanocrystals », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 419, no 1, p. 54-59, mars 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.123.
- [44] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, et N. A. Monteiro-Riviere, « Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties », *Toxicol. Sci.*, vol. 91, no 1, p. 159-165, mai 2006, doi: 10.1093/toxsci/kfj122.
- [45] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, et N. A. Monteiro-Riviere, « Surface Coatings Determine Cytotoxicity and Irritation Potential of Quantum Dot Nanoparticles in Epidermal Keratinocytes », *J Invest Dermatol*, vol. 127, no 1, p. 143-153, janv. 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700508.
- [46] L. W. Zhang, W. W. Yu, V. L. Colvin, et N. A. Monteiro-Riviere, « Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 228, no 2, p. 200-211, avr. 2008, doi: 10.1016/j.taap.2007.12.022.
- [47] L. Li et al., « In vivo Comparison of the Biodistribution and Toxicity of InP/ZnS Quantum Dots with Different Surface Modifications », *IJN*, vol. Volume 15, p. 1951-1965, mars 2020, doi: 10.2147/IJN.S241332.
- [48] S. H. Jeong et al., « Assessment of penetration of quantum dots through in vitro and in vivo human skin using the human skin equivalent model and the tape stripping method », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 394, no 3, p. 612-615, avr. 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.032.
- [49] G. Lin et al., « Biodistribution and acute toxicity of cadmium-free quantum dots with different surface functional groups in mice following intratracheal inhalation », *Nanotheranostics*, vol. 4, no 3, p. 173-183, 2020, doi: 10.7150/ntno.42786.
- [50] L. J. Mortensen, S. Ravichandran, et L. A. DeLouise, « The impact of UVB exposure and differentiation state of primary keratinocytes on their interaction with quantum dots », *Nanotoxicology*, vol. 7, no 7, p. 1244-1254, nov. 2012, doi: 10.3109/17435390.2012.733437.
- [51] L. J. Mortensen, R. Faulknor, S. Ravichandran, H. Zheng, et L. A. DeLouise, « UVB Dependence of Quantum Dot Reactive Oxygen Species Generation in Common Skin Cell Models », *j biomed nanotechnol*, vol. 11, no 9, p. 1644-1652, sept. 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.2093.

- [52] G. Lin et al., « In vivo toxicity assessment of non-cadmium quantum dots in BALB/c mice », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 11, no 2, p. 341-350, févr. 2015, doi: 10.1016/j.nano.2014.10.002.
- [53] A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov, M. Berestovoy, A. Karaulov, et I. Nabiev, « Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties », *Nanoscale Res Lett*, vol. 13, no 1, p. 44, déc. 2018, doi: 10.1186/s11671-018-2457-x.
- [54] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, et S. N. Bhatia, « Probing the Cytotoxicity Of Semiconductor Quantum Dots », *Nano Lett*, vol. 4, no 1, p. 11-18, janv. 2004, doi: 10.1021/nl0347334.
- [55] X. Jiang, C. Röcker, M. Hafner, S. Brandholt, R. M. Dörlich, et G. U. Nienhaus, « Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells », *ACS Nano*, vol. 4, no 11, p. 6787-6797, nov. 2010, doi: 10.1021/nn101277w.
- [56] N. Oh et J.-H. Park, « Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells », *Int J Nanomedicine*, vol. 9, no Suppl 1, p. 51-63, mai 2014, doi: 10.2147/IJN.S26592.
- [57] V. Brunetti et al., « InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment », *Nanoscale*, vol. 5, no 1, p. 307-317, 2013, doi: 10.1039/C2NR33024E.
- [58] M. C. Mancini, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, et S. Nie, « Oxidative Quenching and Degradation of Polymer-Encapsulated Quantum Dots: New Insights into the Long-Term Fate and Toxicity of Nanocrystals in Vivo », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no 33, p. 10836-10837, août 2008, doi: 10.1021/ja8040477.
- [59] A. M. Mohs, H. Duan, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, et S. Nie, « Proton-Resistant Quantum Dots: Stability in Gastrointestinal Fluids and Implications for Oral Delivery of Nanoparticle Agents », *Nano Res*, vol. 2, no 6, p. 500-508, juin 2009, doi: 10.1007/s12274-009-9046-3.
- [60] A. Anas, H. Akita, H. Harashima, T. Itoh, M. Ishikawa, et V. Biju, « Photosensitized Breakage and Damage of DNA by CdSe-ZnS Quantum Dots », *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no 32, p. 10005-10011, août 2008, doi: 10.1021/jp8018606.
- [61] B. I. Ipe, M. Lehnig, et C. M. Niemeyer, « On the Generation of Free Radical Species from Quantum Dots », *Small*, vol. 1, no 7, p. 706-709, 2005, doi: 10.1002/sml.200500105.
- [62] C.-H. Lin et al., « Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hepatotoxicity in mice », *Nanotoxicology*, vol. 5, no 4, p. 650-663, déc. 2011, doi: 10.3109/17435390.2010.539712.
- [63] T. Homma, T. Ueno, K. Sekizawa, A. Tanaka, et M. Hirata, « Interstitial Pneumonia Developed in a Worker Dealing with Particles Containing Indium-tin Oxide », *Journal of Occupational Health*, vol. 45, no 3, p. 137-139, 2003, doi: 10.1539/joh.45.137.
- [64] A. Tanaka et al., « Review of pulmonary toxicity of indium compounds to animals and humans », *Thin Solid Films*, vol. 518, no 11, p. 2934-2936, mars 2010, doi: 10.1016/j.tsf.2009.10.123.
- [65] T. Chonan, O. Taguchi, et K. Omae, « Interstitial pulmonary disorders in indium-processing workers », *European Respiratory Journal*, vol. 29, no 2, p. 317-324, févr. 2007, doi: 10.1183/09031936.00020306.
- [66] S. Choi, Y.-L. Won, D. Kim, G.-Y. Yi, J.-S. Park, et E.-A. Kim, « Subclinical interstitial lung damage in workers exposed to indium compounds », *Ann of Occup and Environ Med*, vol. 25, no 1, p. 24, oct. 2013, doi: 10.1186/2052-4374-25-24.
- [67] P. Howe, P. Watts, WHO, et W. H. Organization, *Tin and Inorganic Tin Compounds*. World Health Organization, 2005.

- [68] « Abstract for TR-499 ». [https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/400s/tr499/index.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpgolinks&utm\\_term=tr499abs](https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/400s/tr499/index.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpgolinks&utm_term=tr499abs) (consulté le mars 25, 2020).
- [69] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, et IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Éd., Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide. Lyon, France : Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press, 2006.
- [70] K.-H. Lee, H.-L. Chen, C.-M. Leung, H.-P. Chen, et P.-C. Hsu, « Indium acetate toxicity in male reproductive system in rats », *Environmental Toxicology*, vol. 31, no 1, p. 68-76, 2016, doi: 10.1002/tox.22022.
- [71] I. Kabe et al., « In Vitro Solubility and In Vivo Toxicity of Indium Phosphide », *Jrnl of Occup Health*, vol. 38, no 1, p. 6-12, janv. 1996, doi: 10.1539/joh.38.6.
- [72] M. V. Hulle, K. D. Cremer, R. Vanholder, et R. Cornelis, « In vivo distribution and fractionation of indium in rats after subcutaneous and oral administration of [<sup>114m</sup>In]InAs », *J. Environ. Monit.*, vol. 7, no 4, p. 365-370, mars 2005, doi: 10.1039/B408675A.
- [73] L. Yuan, J. Zhang, Y. Liu, J. Zhao, F. Jiang, et Y. Liu, « Indium (III) induces isolated mitochondrial permeability transition by inhibiting proton influx and triggering oxidative stress », *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 177, p. 17-26, déc. 2017, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.08.012.
- [74] W. Zheng, S. M. Winter, M. J. Kattnig, D. E. Carter, et I. G. Sipes, « Tissue distribution and elimination of indium in male Fischer 344 rats following oral and intratracheal administration of indium phosphide », *J Toxicol Environ Health*, vol. 43, no 4, p. 483-494, déc. 1994, doi: 10.1080/15287399409531936.
- [75] E. Yaghini, H. Turner, A. Pilling, I. Naasani, et A. J. MacRobert, « In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 14, no 8, p. 2644-2655, nov. 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.07.009.
- [76] Y. Chen et al., « InP/ZnS QDs exposure induces developmental toxicity in rare minnow ( *Gobiocypris rarus* ) embryos », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 60, p. 28-36, juin 2018, doi: 10.1016/j.etap.2018.04.005.
- [77] D. Ayupova, G. Dobhal, G. Laufersky, T. Nann, et R. V. Goreham, « An In Vitro Investigation of Cytotoxic Effects of InP/Zns Quantum Dots with Different Surface Chemistries », *Nanomaterials (Basel)*, vol. 9, no 2, janv. 2019, doi: 10.3390/nano9020135.
- [78] S. Chen, Y. Chen, Y. Chen, et Z. Yao, « InP/ZnS Quantum Dots Cause Inflammatory Response in Macrophages Through Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative stress », *IJN*, vol. Volume 14, p. 9577-9586, déc. 2019, doi: 10.2147/IJN.S218748.
- [79] T. Chen et al., « Cytotoxicity of InP/ZnS Quantum Dots With Different Surface Functional Groups Toward Two Lung-Derived Cell Lines », *Front. Pharmacol.*, vol. 9, p. 763, juill. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00763.
- [80] S. Huang et al., « Systematical investigation of in vitro interaction of InP/ZnS quantum dots with human serum albumin by multispectroscopic approach », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 148, p. 165-172, déc. 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.060.
- [81] R. P. Brown, M. J. Gallagher, D. H. Fairbrother, et Z. Rosenzweig, « Synthesis and Degradation of Cadmium-Free InP and InPZn/ZnS Quantum Dots in Solution »,

- Langmuir, vol. 34, no 46, p. 13924-13934, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02402.
- [82] B. Zhu, L. Liu, D.-L. Li, F. Ling, et G.-X. Wang, « Developmental toxicity in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos exposed to Cu, Zn and Cd », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 104, p. 269-277, juin 2014, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.018.
- [83] Y. Nzengue, « Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53 », p. 300.
- [84] « EAUX-Fi-SulfateAvril05.pdf ». Consulté le: mars 30, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX-Fi-SulfateAvril05.pdf>.
- [85] S. Ećimović et al., « Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei* », *Chemosphere*, vol. 212, p. 307-318, déc. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.095.
- [86] A. Tarze et al., « Extracellular Production of Hydrogen Selenide Accounts for Thiol-assisted Toxicity of Selenite against *Saccharomyces cerevisiae* », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no 12, p. 8759-8767, mars 2007, doi: 10.1074/jbc.M610078200.
- [87] S. J. Soenen et al., « Cytotoxicity of Cadmium-Free Quantum Dots and Their Use in Cell Bioimaging », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no 6, p. 1050-1059, juin 2014, doi: 10.1021/tx5000975.
- [88] « Données actuelles sur la barrière cutanée et implications dans la dermatite atopique canine | Elsevier Enhanced Reader ». <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0758188212000696?token=420416B7EFD57AA8F825870B5AE34B88EB928B1EA3F099854EA353D9D019C98C46ED959D4BCB9E998089F467241E39EF> (consulté le févr. 21, 2020).
- [89] A. Georgel, « Pénétration transcutanée des substances actives: application en dermocosmétologie », p. 190.
- [90] « Anatomie fonctionnelle de la peau », [microbiologiemedicale.fr](https://microbiologiemedicale.fr). <https://microbiologiemedicale.fr/peau-anatomie/> (consulté le févr. 21, 2020).
- [91] « Figure 5 : Schéma des quatre populations cellulaires composant... », ResearchGate. [https://www.researchgate.net/figure/Schema-des-quatre-populations-cellulaires-composant-lepiderme-viable\\_fig2\\_329207995](https://www.researchgate.net/figure/Schema-des-quatre-populations-cellulaires-composant-lepiderme-viable_fig2_329207995) (consulté le févr. 21, 2020).
- [92] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, et R. Wolf, « Structure and function of the epidermis related to barrier properties », *Clinics in Dermatology*, vol. 30, no 3, p. 257-262, mai 2012, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- [93] R. R. Wickett et M. O. Visscher, « Structure and function of the epidermal barrier », *American Journal of Infection Control*, vol. 34, no 10, Supplement, p. S98-S110, déc. 2006, doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.295.
- [94] jdelacro, « Comment la mélanine est transportée vers les kératinocytes, c'est-à-dire vers les cellules épidermiques ? », *EPILATION LASER*, févr. 20, 2014. <https://epilaser.wordpress.com/2014/02/20/comment-la-melanine-est-transportee-vers-les-keratinocytes-cest-a-dire-vers-les-cellules-epidermiques/> (consulté le févr. 24, 2020).
- [95] « Affiche article ScientIC ». [http://www.scientic.ca/affiche\\_Article.asp?IdArticle=676&dest=selection](http://www.scientic.ca/affiche_Article.asp?IdArticle=676&dest=selection) (consulté le févr. 25, 2020).
- [96] « Adipocytes : définition ». <https://www.docteurlic.com/encyclopedie/adipocytes.aspx> (consulté le févr. 25, 2020).
- [97] M. P.-M. Robert, « Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques », *Pharmacie Galénique*, p. 79.

- [98] F. Rademacher, M. Simanski, R. Gläser, et J. Harder, « Skin microbiota and human 3D skin models », *Experimental Dermatology*, vol. 27, no 5, p. 489-494, 2018, doi: 10.1111/exd.13517.
- [99] M. W. Carlson, A. Alt-Holland, C. Egles, et J. A. Garlick, « Three-Dimensional Tissue Models of Normal and Diseased Skin », *Curr Protoc Cell Biol*, vol. CHAPTER, p. Unit-19.9, déc. 2008, doi: 10.1002/0471143030.cb1909s41.
- [100] E. H. van den Bogaard et al., « Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no 3, p. 719-727, mars 2014, doi: 10.1038/jid.2013.417.
- [101] M. Kamsteeg et al., « Type 2 Helper T-Cell Cytokines Induce Morphologic and Molecular Characteristics of Atopic Dermatitis in Human Skin Equivalent », *Am J Pathol*, vol. 178, no 5, p. 2091-2099, mai 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.037.
- [102] L. Raaby et al., « Langerhans cell markers CD1a and CD207 are the most rapidly responding genes in lesional psoriatic skin following adalimumab treatment », *Experimental Dermatology*, vol. 26, no 9, p. 804-810, 2017, doi: 10.1111/exd.13304.
- [103] M.-D. Seo, T. J. Kang, C. H. Lee, A.-Y. Lee, et M. Noh, « HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines », *Biomol Ther (Seoul)*, vol. 20, no 2, p. 171-176, mars 2012, doi: 10.4062/biomolther.2012.20.2.171.
- [104] C. Johansen, « Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin », *J Vis Exp*, no 130, déc. 2017, doi: 10.3791/56863.
- [105] M. G. Rohani, B. K. Pilcher, P. Chen, et W. C. Parks, « Cdc42 Inhibits ERK-mediated Collagenase-1 (MMP-1) Expression in Collagen-Activated Human Keratinocytes », *J Invest Dermatol*, vol. 134, no 5, p. 1230-1237, mai 2014, doi: 10.1038/jid.2013.499.
- [106] J. Meephansan, H. Tsuda, M. Komine, S. Tominaga, et M. Ohtsuki, « Regulation of IL-33 Expression by IFN- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Normal Human Epidermal Keratinocytes », *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no 11, p. 2593-2600, nov. 2012, doi: 10.1038/jid.2012.185.
- [107] « Primary Gingival Keratinocytes ATCC ® PCS-200-014TM Homo sapi ». [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-200-014.aspx?geo\\_country=fr#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-200-014.aspx?geo_country=fr#characteristics) (consulté le févr. 27, 2020).
- [108] A. Galandáková et al., « Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes », *Hum Exp Toxicol*, vol. 35, no 9, p. 946-957, sept. 2016, doi: 10.1177/0960327115611969.
- [109] N. Dalmau, N. Andrieu-Abadie, R. Tauler, et C. Bedia, « Phenotypic and lipidomic characterization of primary human epidermal keratinocytes exposed to simulated solar UV radiation », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 92, no 1, p. 97-105, oct. 2018, doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.07.002.
- [110] L. petit Pharmacien, « phototype », *Le petit Pharmacien*. <https://lepetitpharmacien.wordpress.com/tag/phototype/> (consulté le févr. 28, 2020).
- [111] F. O. Nestle, P. Di Meglio, J.-Z. Qin, et B. J. Nickoloff, « Skin immune sentinels in health and disease », *Nat Rev Immunol*, vol. 9, no 10, p. 679-691, oct. 2009, doi: 10.1038/nri2622.
- [112] « CXCL8 - Interleukin-8 precursor - Homo sapiens (Human) - CXCL8 gene & protein ». <https://www.uniprot.org/uniprot/P10145> (consulté le mars 05, 2020).
- [113] A. M. Choi et J. Alam, « Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. », *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 15, no 1, p. 9-19, juill. 1996, doi: 10.1165/ajrcmb.15.1.8679227.

- [114] N. Pathak et S. Khandelwal, « Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress », *Toxicol. Lett.*, vol. 165, no 2, p. 121-132, août 2006, doi: 10.1016/j.toxlet.2006.02.004.
- [115] « 2012TOU30010.pdf ». Consulté le: mars 04, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr/1562/1/2012TOU30010.pdf>.
- [116] R. K. Stankovic, R. S. Chung, et M. Penkowa, « Metallothioneins I and II: Neuroprotective significance during CNS pathology », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no 3, p. 484-489, janv. 2007, doi: 10.1016/j.biocel.2006.09.010.
- [117] R. D. Palmiter et L. Huang, « Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers », *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, vol. 447, no 5, p. 744-751, févr. 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1070-7.
- [118] J. P. Liuzzi et R. J. Cousins, « Mammalian Zinc Transporters », *Annual Review of Nutrition*, vol. 24, no 1, p. 151-172, 2004, doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132402.
- [119] A. K. Baltaci et K. Yuce, « Zinc Transporter Proteins », *Neurochem Res*, vol. 43, no 3, p. 517-530, mars 2018, doi: 10.1007/s11064-017-2454-y.
- [120] D. Lanneau, « Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique », p. 192, 2010.
- [121] « HSPA6 - Heat shock 70 kDa protein 6 - Homo sapiens (Human) - HSPA6 gene & protein ». <https://www.uniprot.org/uniprot/P17066> (consulté le mars 05, 2020).
- [122] A. J. Levine, « p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division », *Cell*, vol. 88, no 3, p. 323-331, févr. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.
- [123] L. J. Ko et C. Prives, « p53: puzzle and paradigm », *Genes Dev.*, vol. 10, no 9, p. 1054-1072, mai 1996, doi: 10.1101/gad.10.9.1054.
- [124] N. D. Lakin et S. P. Jackson, « Regulation of p53 in response to DNA damage », *Oncogene*, vol. 18, no 53, p. 7644-7655, déc. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1203015.

**Chapitre 2 :**  
*Matériel et Méthodes*





## 1. Les quantum dots d'InZnP

### 1.1. Synthèse

Les QDs étudiés ont été synthétisés au CEA de Grenoble par Karl David Wegner dans l'équipe de Peter Reiss (IRIG/SyMMES/STEP). Ces synthèses ne font pas partie du travail de thèse, c'est pourquoi ce paragraphe ne les décrira pas en détail. Cependant, elles ont fait l'objet d'une publication où le protocole de synthèse est décrit [1]. Succinctement, il s'agit d'une synthèse, en milieu organique, d'un cœur de phosphure d'indium enrichi en zinc (InZnP) sur lequel une ou deux coquilles sont successivement déposées. La première, identique dans les trois types de QDs étudiés, est composée de zinc, de sélénium et de soufre (Zn(Se,S)). Plus précisément, les éléments de cette dernière s'organisent sous forme d'un gradient où le zinc et le sélénium, qui se lient plus facilement au cœur, sont progressivement substitués au cours de la synthèse par du zinc et du soufre. Ainsi, les QDs constitués d'un cœur InZnP recouvert d'une coquille Zn(Se,S) sont dénommés « Gradient shell ». Dans les deux autres types de QDs, cette coquille gradient est recouverte par une seconde coquille constituée de zinc et de soufre (ZnS). Ce qui différencie ces derniers est l'épaisseur de leur coquille de ZnS qui peut être soit fine et dans ce cas les QDs sont dénommés « Thin shell », soit épaisse et les QDs sont dénommés « Thick shell ». Tous les QDs sont purifiés par précipitation dans un mélange méthanol/chloroforme et acétone puis redispersés dans du chloroforme avant d'être stockés dans de l'hexane à température ambiante dans le noir (Figure 23). Dans ces conditions, ils sont stables 2-3 ans mais leur stabilité dépend du nombre d'ouverture des flacons puisqu'ils s'oxydent progressivement à l'air ambiant.

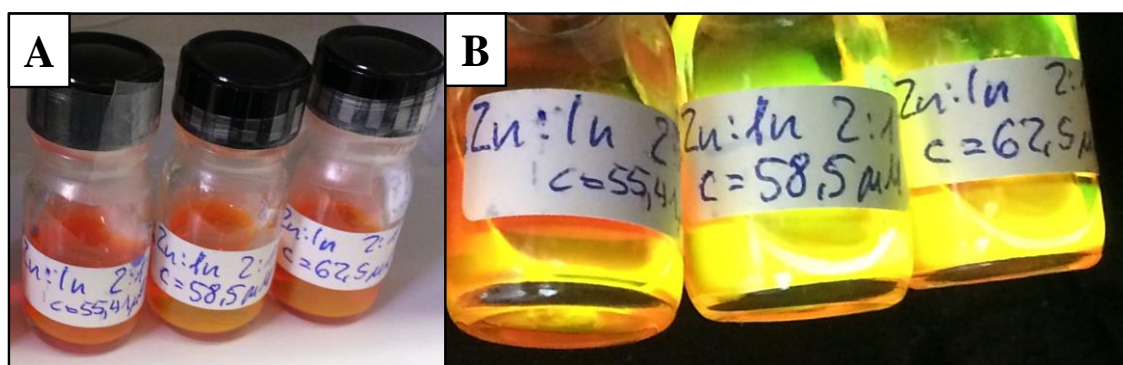


Figure 23 : Photos des solutions stocks des QDs synthétisés en phase organique sous éclairage classique (A) et sous éclairage UV (B).

## 1.2. Transfert en phase aqueuse

Pour pouvoir utiliser les quantum dots avec des milieux biologiques, il faut les transférer dans un solvant hydrophile et non toxique. Le type de transfert qui a été choisi est le transfert en phase aqueuse par échange de ligand en utilisant la D-penicillamine (D-pen). Pour cela, l'expérience est réalisée sous atmosphère inerte, en préparant tout d'abord 1 mL de solution à 0,2 M de D-pen (environ 30 mg) dans de l'eau purifiée (système Milli-Q) dégazée à l'argon (Ar) pendant 5 min. Après avoir dégazé à nouveau pendant 1 min la solution de D-pen, 200  $\mu$ L de TCEP (Chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine, solution à 0,5 M) sont ajoutés pour faciliter le transfert et éviter la formation de ponts disulfures. La solution est alors dégazée 1 min puis le pH est ajusté à 9 par ajout d'hydroxyde de tétraméthylammonium (en solution à 25 % dans du méthanol). Après un bref dégazage, 600  $\mu$ L de cette solution sont ajoutés à 1 mL de QDs dilués dans du chloroforme (de manière à obtenir une concentration finale de QDs d'environ 3-5  $\mu$ M), puis ces solutions sont à nouveau dégazées pendant 1 min. Un mélange biphasique est ainsi obtenu avec les QDs dilués dans le chloroforme qui se trouvent dans la phase inférieure et la solution aqueuse de D-pen dans la phase supérieure (Figure 24A). Le transfert des QDs vers la phase aqueuse (D-pen) est réalisée via une agitation magnétique forte pendant 2 heures à température ambiante. Une fois transférés, les QDs sont centrifugés pendant 1 min à  $4300 \times g$  pour bien séparer les deux phases. La phase aqueuse (sur le dessus) contenant désormais les QDs (Figure 24B) est récupérée et purifiée pour éliminer l'excès de ligand. Cette purification est réalisée en chromatographie par exclusion stérique sur des colonnes de silice de 5 mL (colonnes NAP 10<sup>TM</sup> préparées avec Sephadex<sup>TM</sup> G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Ces dernières sont équilibrées, puis les QDs sont élués par gravité avec du tampon phosphate salin (PBS 1X). Les solutions sont ensuite stockées à 4 °C à l'abri de la lumière et sont stables durant 4 à 6 mois en fonction de la fréquence d'ouverture des flacons.

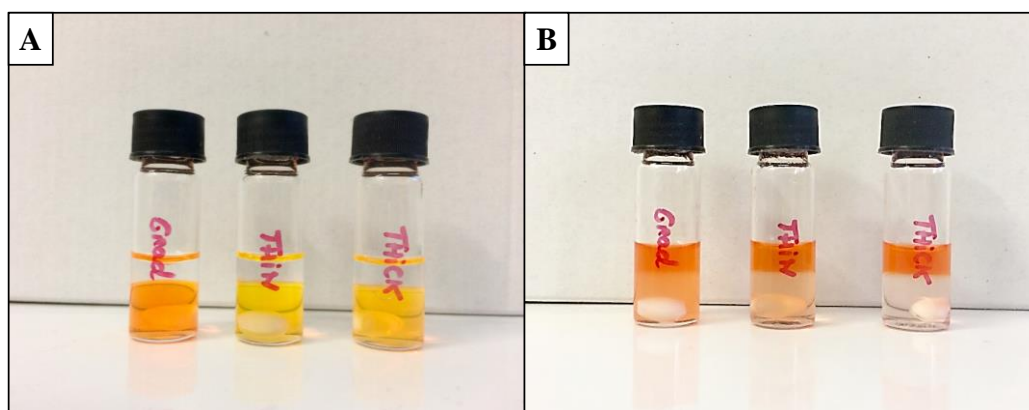


Figure 24 : Photos des QDs avant et après transfert en phase aqueuse. Au cours de l'agitation, ils sont transférés de la phase organique en bas (A) vers la phase aqueuse en haut (B).

## 2. Vieillissement et caractérisation physico-chimique des QDs

### 2.1. Vieillissement accéléré en enceinte climatique

Pour tester la résistance des QDs à la photodégradation, un vieillissement accéléré est réalisé dans une enceinte climatique, au CEA de Grenoble, sur la plateforme Hybriden rattachée à l'équipe IRIG/SyMMES/STEP. L'enceinte utilisée est le modèle Q-SUN Xe-1 (de chez Q-LAB), équipé d'une lampe à arc au xénon lui permettant de reproduire le spectre complet du soleil, et plus précisément, l'équivalent d'une irradiation continue sous un soleil en plein été à midi. Pour cela, les QDs sont dilués avec du PBS, dans un volume final de 2 mL, de manière à obtenir une concentration de 1  $\mu$ M. Chaque solution de QDs est déposée dans une cuve en quartz avec fermeture par bouchon à vis (cuve de 10 mm  $\times$  10 mm avec un trajet optique de 10 mm de chez Hellma). Ces dernières sont ensuite déposées sur un agitateur magnétique compatible avec l'enceinte et soumises à l'irradiation solaire pendant 24 heures (Figure 25). Les paramètres de l'enceinte de vieillissement ont été choisis en accord avec les normes ISO 4892-1 (2016) et 4892-2 (2013) dédiées au vieillissement accéléré de plastiques. Ces normes décrivent les méthodes d'exposition à des sources lumineuses de laboratoire en général, et plus spécialement pour les lampes à arc au xénon. Ainsi, pour mimer un ensoleillement continu, la température est fixée à 40 °C et l'irradiation mesurée à 420 nm est de 1,44 W/m<sup>2</sup>, en absence d'humidité. Dans cette expérience, nous souhaitons comparer la résistance des trois types de QDs au vieillissement en conditions environnementales. Des cinétiques de vieillissement sont donc réalisées, en exposant les cuves contenant les QDs dans ces conditions de vieillissement pendant 15 min, 30 min, 45 min, 1 h etc jusqu'à 24 h. A chaque temps de vieillissement, des mesures photophysiques permettent d'évaluer l'intégrité des QDs, et des échantillons sont prélevés pour l'analyse future par microscopie électronique et par spectroscopie d'absorption des rayons X.

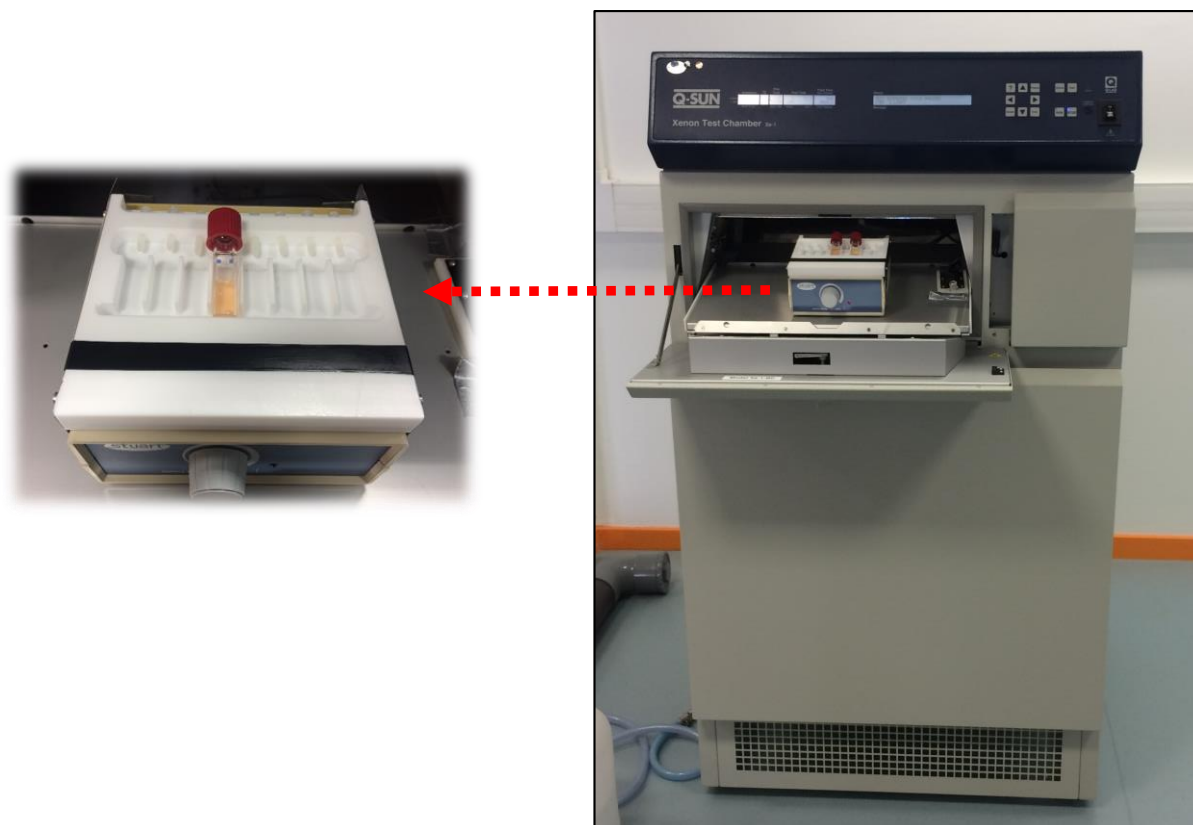


Figure 25 : Photo de l'enceinte climatique Q-SUN Xe-1 ainsi que du système d'agitation pour irradier les échantillons.

## 2.2. Caractéristiques des QDs après synthèse

Les QDs ont été caractérisés par Karl David Wegner après leurs synthèses et font l'objet d'une publication présentée dans l'Annexe 1 [1]. Ainsi, la caractérisation photophysique par les mesures d'absorbance et de photoluminescence avant transfert en phase aqueuse a été réalisée en suivant les méthodes présentées dans la sous-partie suivante. Les pics excitoniques des QDs avant l'échange de ligand se situent à 522 nm pour les Gradient shell, 518 nm pour les Thin shell et à 522 nm pour les Thick shell. Ils possèdent également des maxima de fluorescence respectifs à 564 nm, 556 nm et 555 nm (Figure 26). Les concentrations des solutions stocks de QDs en suspension dans l'hexane (avant transfert), sont de 55,41  $\mu\text{M}$  pour les Gradient shell, de 58,5  $\mu\text{M}$  pour les Thin shell et 62,5  $\mu\text{M}$  pour les Thick shell.

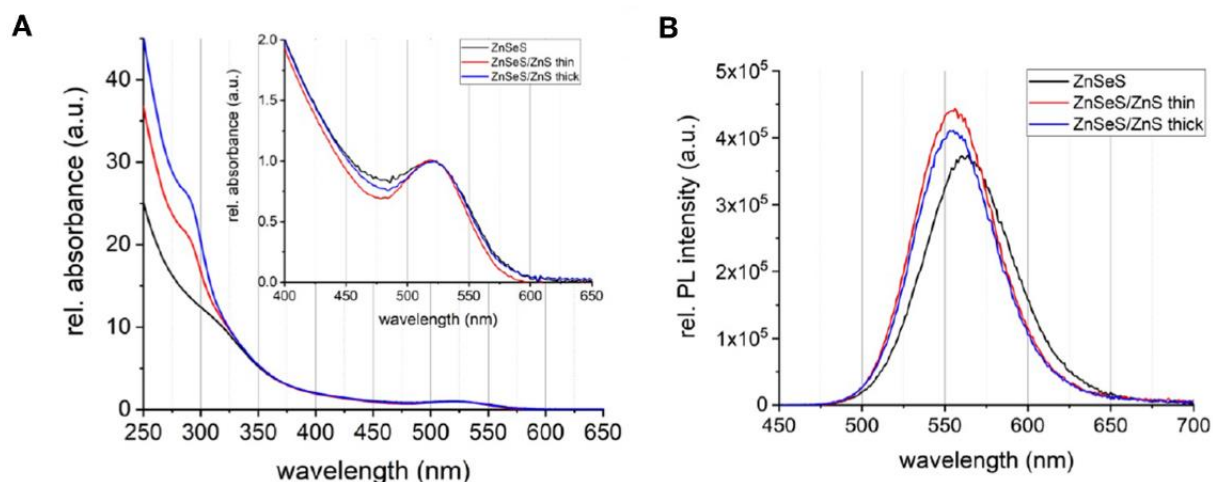


Figure 26 : Caractérisation photophysique des QDs avant fonctionnalisation. Spectres d'absorption en A et d'émission en B pour les différents QDs (ZnSeS = Gradient shell, ZnSeS/ZnS thin = Thin shell et ZnSeS/ZnS thick = Thick shell). Résultats extraits de la publication [1].

Les caractérisations chimiques et structurales de ces QDs avant fonctionnalisation ont été réalisées par spectroscopie photoélectronique X (XPS) ainsi que par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie associée à la microscopie électronique en transmission (MET-EDX). Les résultats de l'analyse EDX (Figure 27), montrent la composition atomique des trois types de QDs. Ainsi, ils possèdent tous les trois la même proportion d'In et de P ce qui démontre la similarité des cœurs. Cependant, la quantité de sélénium qui devrait être identique, puisque les trois types de QDs possèdent la même première coquille autour du cœur, est quelque peu inférieure pour les Gradient shell. Cela peut être expliqué par le fait que dans les Gradient shell, le Se se trouve proche de la surface du nanocristal, puisqu'il est recouvert d'une couche très fine de ZnS, et peut donc être facilement échangé par du soufre en surface. L'augmentation croissante du nombre d'atomes de zinc et de soufre (en proportions équivalentes) par l'augmentation du nombre de coquilles sur les QDs est également démontrée dans ces résultats. Dans les Gradient shell, il y a environ 2 fois plus d'atomes de Zn et de S que d'In et de P. Dans les Thin shell il y en a environ 4,5 fois plus, et dans les Thick shell environ 8,5 fois plus. La différence majeure entre les trois types de QDs est bien la variation de la quantité de zinc et de soufre qui est augmentée par l'ajout d'une coquille supplémentaire et par l'épaisseur de cette dernière (Figure 27).

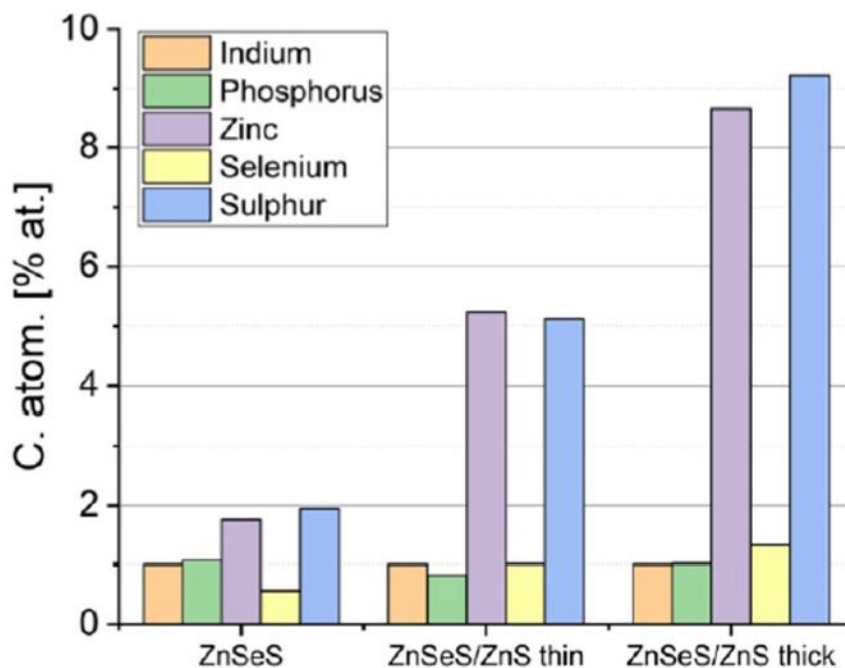


Figure 27 : Caractérisation chimique des QDs via des mesures EDX. Ces résultats représentent la composition atomique des QDs, normalisée sur l'indium (ZnSeS = Gradient shell, ZnSeS/ZnS thin = Thin shell et ZnSeS/ZnS thick = Thick shell). Résultats extraits de la publication [1].

En ce qui concerne la taille des QDs, la mesure du diamètre hydrodynamique par la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ainsi que par microscopie électronique en transmission (MET) ont montré que les QDs transférés en solution aqueuse mesurent environ 4 à 6 nm, selon l'épaisseur de la coquille (avec un cœur d'environ 2,67 nm), et ne forment pas d'agrégats ni d'agglomérats (Figure 28).

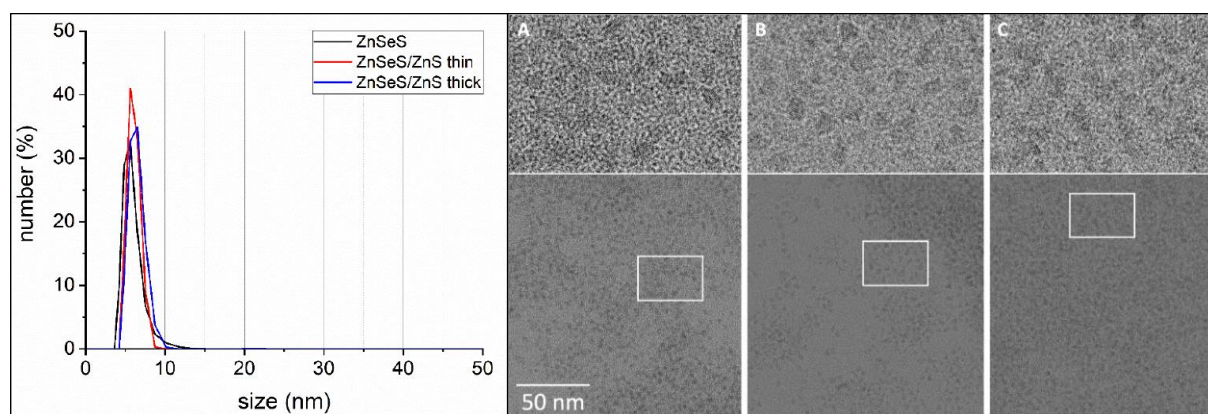


Figure 28 : Détermination de la taille des QDs ainsi que leur état d'agrégation et d'agglomération dans le PBS. À gauche la mesure de DLS (ZnSeS = Gradient shell, ZnSeS/ZnS thin = Thin shell et ZnSeS/ZnS thick = Thick shell) et à droite l'imagerie TEM (Gradient shell en A, Thin shell en B et Thick shell en C). Résultats extraits de la publication [1].

### 2.3. Mesures d'absorbance en spectroscopie UV-visible (UV-vis) et de photoluminescence (PL)

Ces mesures sont systématiques après chaque transfert en phase aqueuse pour calculer la concentration des QDs en solution et vérifier leur intégrité. Elles sont également réalisées au cours du vieillissement en enceinte climatique pour pouvoir suivre l'évolution des propriétés photophysiques, qui reflètent l'intégrité, ou au contraire la dégradation des QDs.

En ce qui concerne le calcul de la concentration après les transferts, des mesures d'absorbance UV-vis sont effectuées sur un spectrophotomètre Hewlett Packard 8452A. L'absorbance est mesurée sur une gamme située entre 200 nm et 800 nm. Les spectres sont normalisés en soustrayant les valeurs du « blanc » mesuré sur une cuve remplie d'eau, puisque les QDs transférés sont dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau pour cette mesure. L'épaulement ainsi que le pic excitonique de ces spectres sont situés entre 500 nm et 550 nm. La concentration est ensuite calculée selon la loi de Beer-Lambert à savoir :  $A = \epsilon.l.c$ , avec « A » correspondant à l'absorbance (a.u.), «  $\epsilon$  » au coefficient d'extinction molaire (constante), « l » au trajet optique (cm) et « c » à la concentration de la substance (mol/L).

Pour vérifier l'intégrité des QDs transférés, des mesures de PL sont effectuées sur un spectrophotomètre Fluorolog FL3-22 (Horiba-Jobin Yvon). Les échantillons sont excités à 380 nm et leur émission est mesurée entre 400 et 740 nm. Le pic d'émission des QDs est situé entre 550 nm et 600 nm. La dégradation de ces derniers entraîne une diminution, voir une disparition des pics excitoniques en absorbance et d'émissions en photoluminescence.

Pour les mesures concernant la cinétique de vieillissement, d'autres spectromètres sont utilisés, sur la plateforme BIOMADE (*BIOhybrid MAterial Design Engineering*) gérée par l'équipe IRIG/SyMMES/CREAB au CEA de Grenoble, sur lesquels les mêmes paramètres sont mesurés. Les mesures d'absorbance UV-vis sont alors effectuées sur un spectrophotomètre Agilent Cary 100. Les mesures de fluorescence sont, quant à elles, réalisées sur un spectrofluorimètre NanoDrop™ 3300. Pour chaque temps de vieillissement, les cuves sont retirées de l'enceinte climatique et placées directement dans le spectrophotomètre UV-vis sous agitation, puis un spectre d'absorption est enregistré. Après ces mesures, les cuves sont ouvertes rapidement et 2  $\mu$ L de chaque solution sont prélevés et déposés sur le spectrofluorimètre NanoDrop™ 3300 pour enregistrer un spectre de fluorescence. Les cuves sont ensuite photographiées puis remises dans l'enceinte de vieillissement pour la suite du vieillissement. Une cuve contrôle contenant seulement du PBS est également vieillie dans l'enceinte climatique



et sert de « blanc » pour les mesures. Celles-ci sont effectuées à T = 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 1 h 30, 2 h, 4 h, 6 h, et 24 h.

## 2.4. Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

Cette technique repose sur l'utilisation de l'énergie des rayons X produits par des synchrotrons et permet des caractérisations chimiques et physiques au niveau atomique. Des électrons en mouvement constant dans l'anneau à une vitesse proche de celle de la lumière sont déviés par un champ magnétique, induisant l'émission d'un faisceau de photons à spectre large dit polychromatique. Lors d'expériences, ce faisceau est envoyé vers une ligne de mesure, puis ses caractéristiques sont modifiées (largeur, divergence) à l'aide de miroirs ainsi que de fentes et la gamme d'énergie souhaitée est sélectionnée grâce à un monochromateur. Une fois calibré pour un élément, le faisceau vient frapper l'échantillon générant un rayonnement incident qui varie en fonction de la composition de l'échantillon. Ces variations sont alors enregistrées par un détecteur puis retranscrites informatiquement sous forme de différents spectres qui peuvent renseigner sur la coordination et l'état d'oxydation de l'élément ciblé, les atomes environnants ainsi que les distances interatomiques. Pour ces travaux, les analyses sont réalisées sur la ligne de lumière FAME (BM30B) à l'ESRF pour *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, France), avec l'aide de Olivier Proux, ainsi que sur la ligne de lumière SAMBA au synchrotron SOLEIL pour *Optimized Light Source of Intermediate Energy to LURE*, (Saclay, France), avec l'aide de Gautier Landrot.

La ligne FAME (BM30B) est équipée d'un monochromateur avec deux cristaux en silicium (220), permettant de sélectionner une gamme d'énergie autour du seuil de l'élément ciblé, associé à des miroirs et des fentes micrométriques pour focaliser le faisceau d'énergie (Figure 29). Un cryostat à hélium permet d'étudier des échantillons congelés, limitant ainsi les dommages induits par l'irradiation. Enfin, un détecteur à fluorescence solide hautement résolu en énergie, de type Canberra Germanium 30 éléments, est utilisé, permettant l'analyse d'échantillons dilués. Le temps d'acquisition des données est d'environ 45 min par spectre [2], [3]. La ligne SAMBA possède globalement les mêmes paramètres que FAME, à l'exception du détecteur (Canberra, Germanium 35 éléments) et du temps d'acquisition beaucoup plus court, d'environ 5 min par spectre [4].

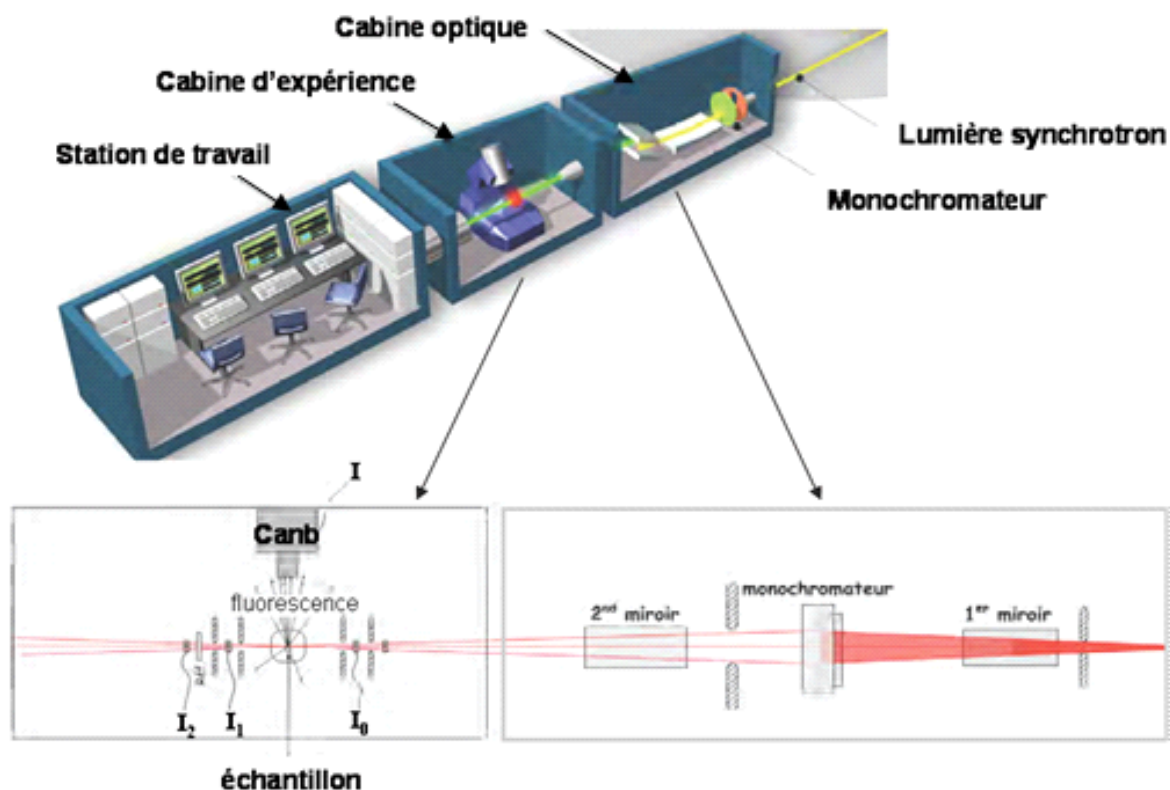


Figure 29 : Schéma du fonctionnement des lignes FAME et SAMBA. Schéma extrait de la thèse [5].

Pour la préparation des échantillons, les solutions de QDs sont prélevées aux différents temps de vieillissement. Le vieillissement en enceinte climatique entraîne la précipitation des QDs, comme il sera décrit dans le chapitre 3. Les QDs sont brièvement centrifugés et concentrés en retirant la majeure partie du surnageant (seuls 200  $\mu\text{L}$  sur les 2 mL de départ sont conservés). Les QDs non vieillis sont quant à eux prélevés juste après transfert, leur concentration est donc d'environ 3-5  $\mu\text{M}$ , en solution dans du PBS. Pour l'analyse, environ 100  $\mu\text{L}$  de chaque QD, dilué avec 20 % de glycérol, sont déposés sur le porte-échantillon dédié qui est directement plongé dans l'azote liquide pour être congelé.

La spéciation de l'In, du Zn et du Se est ensuite analysée par XAS, aux seuils K de ces trois éléments (respectivement 27940 eV, 9659 eV et 12658 eV). Les analyses sont effectuées en mode fluorescence car les échantillons sont peu concentrés. Les références, quant à elles, sont plus concentrées et sont analysées en mode transmission. Pour préserver au maximum les échantillons, les mesures sont effectuées entre 15-20 K. Environ 5 scans par échantillons sur FAME et 10 à 40 sur SAMBA sont nécessaires pour exploiter correctement les données. Ces valeurs dépendent du seuil utilisé et de la concentration des échantillons.

Le traitement des données est effectué en collaboration avec Géraldine Sarret (CNRS/UGA/ISTerre). Les spectres obtenus sont sommés pour n'obtenir qu'un spectre par

échantillon, puis normalisés grâce au logiciel ATHENA [6]. La partie XANES des spectres obtenus est comparée avec celles des spectres des références par la méthode de combinaison linéaire (LCF ou *linear combination fitting*) pour connaître le degré d'oxydation et la proportion de chaque espèce dans l'échantillon. La partie EXAFS est, quant à elle, analysée avec le logiciel ARTEMIS qui permet de déduire l'environnement de l'élément ciblé (atomes voisins et leurs distances) [6]. Ces données sont traitées par simulation des couches atomiques ou *shell fitting*.

## **2.5. Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) associée à une analyse par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)**

La structure des QDs vieilliss a été caractérisée grâce à la technique STEM-EDX. Les échantillons sont préparés en déposant une goutte de solution de QDs, après échange de ligand ou après vieillissement, sur une grille de MET en cuivre recouverte d'un film de carbone (lacey). Après 5 min, les grilles sont rincées trois fois de suite avec une goutte d'eau purifiée (système Milli-Q), puis elles sont séchées à l'air libre quelques heures dans une boîte sur la paillasse et conservées dans l'obscurité. Avant l'analyse, les échantillons sont recouverts d'une fine couche de carbone, ce qui améliore leur conductivité et les rend plus stables sous faisceau, puis ils sont imagés par STEM à l'aide d'un détecteur annulaire à fond noir à angle élevé (HAADF). En parallèle, une analyse par EDX permet de renseigner la composition chimique des régions d'intérêts. Le microscope utilisé est un FEI/Tecnai OSIRIS fonctionnant à 200 kV. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Pierre-Henri Jouneau sur la plateforme de nanocaractérisation (PFNC) du CEA de Grenoble (IRIG/MEM/LEMMA).

## **3. Modèles cellulaires**

### **3.1. Les kératinocytes primaires humains mammaires (HKPM)**

#### Isolement des HKPM de l'épiderme

Les cellules utilisées sont isolées à partir d'explants chirurgicaux de peaux provenant de restrictions mammaires de donneuses saines, grâce à une collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble. Ces prélèvements ainsi que les expériences effectuées sont en accord avec les directives et réglementations en vigueur, notamment les articles L1245-2 et L1211-2 sur le consentement obligatoire des donateurs et l'utilisation des déchets chirurgicaux à des fins scientifiques (Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la

bioéthique). Pour limiter la variabilité interindividuelle, les biopsies sont sélectionnées en fonction de l'âge et du phototype des donneurs. Le profil des donneurs sélectionnés correspond dans le cas de cette thèse à des femmes jeunes (entre 15 et 30 ans), car leurs cellules se divisent plus vite et possèdent peu de dommages liés au vieillissement de la peau. Les phototypes I et II sur l'échelle de Fitzpatrick sont sélectionnés, les peaux claires étant plus fines et donc potentiellement plus sensibles aux agents toxiques.

La méthode d'isolement des HKPM s'inspire de protocoles recensés dans la littérature [7], [8]. Ainsi, la biopsie de peau est récupérée et traitée dans les heures qui suivent l'opération si celle-ci a lieu le matin. Lorsque l'opération a lieu en fin de journée, la peau est conservée à 4 °C et traitée le lendemain matin. Elle est tout d'abord désinfectée par immersion dans du PBS contenant 0,4 % de Bétadine pendant 15 min à température ambiante, puis transférée dans du PBS contenant 10 % d'antibiotiques (pénicilline à 5 000 U/ml et streptomycine à 5 000 µg/mL, Thermo Fisher Scientific). L'excès de graisse est enlevé à l'aide d'un scalpel puis la peau est découpée en petits morceaux et placée dans une solution de dispase à 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) pendant 3 h à 37 °C ou sur la nuit à 4 °C. Après cette incubation, l'épiderme se détache facilement du derme. Il est donc récolté à l'aide de pinces puis déposé dans un tube rempli de 15 mL de trypsine-EDTA (0,5 g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA, Thermo Fisher Scientific). Ce tube est placé au bain marie à 37 °C et vortexé toutes les 2 min pendant 6 min afin de dissocier les différents éléments de l'épiderme. Les cellules sont alors filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 µm puis l'action de la trypsine est stoppée par ajout de PBS contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Afin de retirer la trypsine, le tube est centrifugé pendant 10 min à 470 × g. Le surnageant est retiré puis le culot cellulaire est remis en suspension dans un milieu sélectif, le K-SFM pour *keratinocytes serum free medium*, supplémenté de 0,9 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) et de 25 µg/mL d'extrait hypophysaire bovin (BPE) (kit 17005075, Thermo Fisher Scientific). Par ailleurs, le milieu de culture est également supplémenté avec 50 µg/mL de Primocin (50 mg/mL, InvivoGen). Il s'agit d'un agent antimicrobien spécifique aux culture primaires, actif contre les bactéries, les champignons et les mycoplasmes. Le milieu K-SFM supplémenté, comme décrit ci-dessus, sera également appelé « milieu complet » dans la suite du manuscrit. Les cellules sont transférées dans des flasques de 175 cm<sup>2</sup> (Falcon) à une densité d'environ 5 x 10<sup>6</sup> cellules dans 30 mL de milieu. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Leur milieu est changé tous les 2-3 jours jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence d'environ 70-80 % (la vitesse de prolifération dépend du donneur).

### Congélation et décongélation des HKPM

Lorsque les HKPM arrivent à confluence, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées à l'aide de PBS. Les cellules sont ensuite décollées des flasques par ajout de 4 mL de trypsine-EDTA par flasque, et placées dans l'incubateur pendant 10 min. La trypsine est ensuite inactivée par 6 mL de PBS contenant 10 % de SVF puis les cellules sont comptées. Après centrifugation pendant 7 min à  $470 \times g$ , les culots sont repris dans le milieu de congélation (SVF contenant 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO)) à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules par mL. Ils sont ensuite congelés dans des cryotubes (1 mL/tube) et placés dans des boîtes de congélation pour cryoconservation pendant 24 h à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  avant d'être stockés directement dans l'azote liquide. Pour la décongélation, les tubes sont plongés quelques minutes dans le bain marie à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  puis dilués dans du K-SFM complet. Après centrifugation (7 min à  $470 \times g$ ), le milieu de congélation est retiré et les cellules sont mises en suspension dans du K-SFM complet puisensemencées à  $2 \times 10^6$  de cellules par flasques de  $75 \text{ cm}^2$  dans un volume total de 15 mL/flasque.

### Culture des HKPM

Les cellules sont cultivées dans des flasques de  $75 \text{ cm}^2$  (Falcon) avec du milieu K-SFM complet. Le milieu est changé trois fois par semaine (tous les 2-3 jours). Lorsqu'elles atteignent 70-80 % de confluence, elles subissent un passage. Comme pour la congélation, elles sont décollées du support à l'aide de 2 mL de trypsine-EDTA par flasque puis placées dans l'incubateur pendant 7 à 10 min. Après ajout de 8 mL de PBS contenant 10 % de SVF pour inactiver la trypsine, elles sont centrifugées (7 min à  $470 \times g$ ), puis reprises dans du K-SFM complet. Ensuite elles sont comptées à l'aide d'un compteur automatique après marquage au bleu de trypan pour vérifier leur viabilité, puis réensemencées à  $1,5 \times 10^6$  cellules par flasque. Le temps entre deux passages varie en fonction des donneurs et les cellules ne sont utilisées que lors des trois premiers passages.

Pour les différentes expériences, les HKPM sontensemencés à environ 60 000 cellules/ $\text{cm}^2$  (plus ou moins selon la vitesse de division cellulaire des donneurs) dans les supports appropriés tels que les flasques de  $75 \text{ cm}^2$  et des plaques multi-puits (12 ou 96 puits, Falcon) ainsi que des lames en verre dotées de 4 chambres de culture (LAB-TEK). Seules les expériences de criblage à haut contenu par microscopie automatisée (HCS ou HCA) qui nécessitent un faible ensemencement cellulaire, sontensemencées à environ 30 000 cellules/ $\text{cm}^2$  dans des plaques 96 puits noires à fond plat, fin et transparent (Falcon 353219).

### Test des mycoplasmes

La méthode de détection des mycoplasmes utilisée est la coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) [9]. Elle est effectuée sur les HKPM de chaque donneur après décongélation. Pour cela, les cellules sontensemencées à faible densité (30 000 cellules/cm<sup>2</sup>) dans une boîte de Petri de 11,7 cm<sup>2</sup> où ont été déposées au préalable deux lamelles de microscopie en verre. Les cellules sont ensuite fixées deux jours plus tard pendant 20 min dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du PBS, rincées avec du PBS puis colorées à l'aide de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) à 1 µg/mL (dans du PBS), pendant 15 min. Après de nouveaux rinçages au PBS, les lamelles sont retirées de la boîte et montées sur des lames de microscopie standard à l'aide d'une goutte de milieu de montage (Mowiol, Sigma-Aldrich). L'observation est ensuite réalisée sur un microscope à épifluorescence (Axio Imager A1, Zeiss). Les HKPM utilisés pour ces travaux n'ont pas présenté de contamination.

### **3.2. Les modalités d'expositions des HKPM aux QDs**

Après transfert en solution aqueuse par échange de ligand, les QDs sont en solution dans du PBS à une concentration de l'ordre de quelques µM. Pour l'exposition des HKPM, les QDs sont dilués dans le milieu K-SFM complet, à des concentrations finales allant de 3,125 nM à 100 nM, puis déposés sur les cellules, qui sont exposées généralement pendant 24 h (Figure 30).

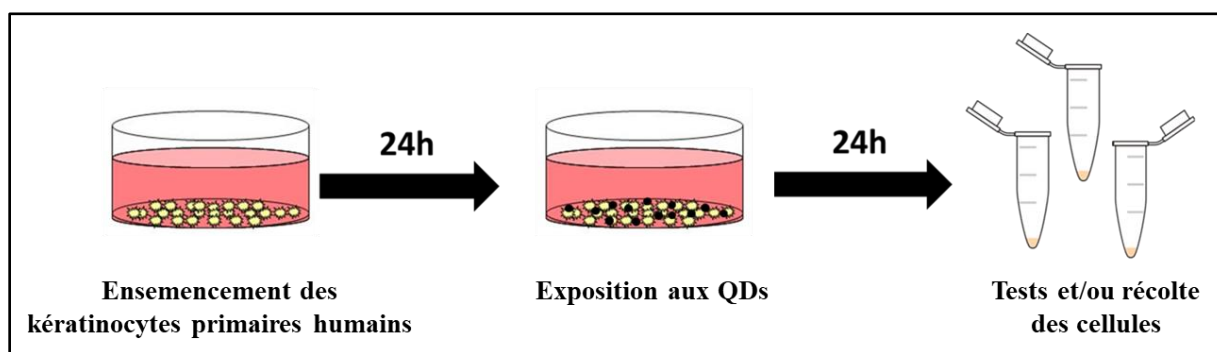


Figure 30 : Protocole d'exposition des HKPM aux QDs.

### **3.3. L'observation des HKPM en MET-EDX**

Des cellules exposées aux QDs (vieillis et non vieillis) ainsi que des cellules non traitées ont été observées en MET pour mettre en évidence l'accumulation et la répartition intracellulaire des QDs. Ces expériences ont été réalisées sur la plateforme MET de l'Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble) en collaboration avec Benoit Gallet et Christine

Moriscot. Les cellules (HKPM 144) sontensemencées dans des chambres de culture sur lame en verre (LAB-TEK 4 chambres) à une densité de 120 000 cellules par chambre puis exposées aux QDs 24 h plus tard. Après 24 h d'exposition aux différents QDs, les cellules sont rincées avec du tampon PHEM 0,1 M à pH 7 composé de PIPES 30 mM, HEPES 12,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM et EGTA 1 mM. Elles sont ensuite fixées pendant 30 min à température ambiante avec 4 % de PFA et 0,4 % de glutaraldéhyde préparé dans du PHEM 0,2 M auquel a été ajouté du milieu de culture (v/v). La fixation se poursuit pendant 30 min supplémentaires à température ambiante dans 2 % de PFA et 0,2 % de glutaraldéhyde dans 0,1 M de PHEM. Les cellules sont ensuite rincées trois fois dans 0,1 M de PHEM et sont post-fixées dans 1 % de tétroxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>) et 1,5 % de ferrocyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) dans du tampon PHEM 0,1 M pendant 1 h à température ambiante. Ces étapes sont suivies de 3 rinçages à l'eau, puis d'une coloration des échantillons avec 0,5 % d'acétate d'uranyle dans 30 % d'éthanol pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules fixées et colorées sont ensuite déshydratées dans un gradient d'éthanol puis imprégnées de résine EPON<sup>TM</sup>. Des coupes ultrafines sont alors réalisées (80 nm) à l'aide de l'ultra-microtome Leica UC7 et collectées sur grilles de cuivre recouvertes de Formvar carbone. Les coupes sont observées, par Christine Moriscot, sur un MET (Tecnai G2 Spirit BioTwin (FEI) équipé d'une caméra CCD ORIUS SC1000 (Gatan)), fonctionnant à 120 kV. L'analyse EDX de ces coupes est réalisée en collaboration avec Pierre-Henry Jouneau sur le microscope précédemment décrit dans ce chapitre (cf. partie 2.5).

## **4. Caractérisation des effets toxiques des QDs sur les HKPM**

### **4.1. Evaluation de la cytotoxicité**

#### **4.1.1. Mesure de l'activité métabolique : test WST-1**

Le test WST-1 est choisi car les tests réalisés montrent que ce réactif n'interfère pas avec les QDs. Les résultats seront présentés dans le chapitre 5. Il s'agit d'un test colorimétrique qui permet d'évaluer la viabilité cellulaire. Son principe repose sur le sel de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), que les déshydrogénases cellulaires réduisent en formazan avec pour conséquence un changement de couleur. Plus précisément, cette réaction fait intervenir la succinate déshydrogénase, spécifique de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui est active dans les cellules dont le métabolisme est intact. Une mesure d'absorbance à 450 nm permet alors de quantifier le formazan dont la

concentration est proportionnelle à l'activité mitochondriale et, par extension, à la viabilité cellulaire.

Ainsi, après avoir ensemencé des plaques 96 puits, les cellules sont exposées aux différentes suspensions de QDs pendant 24 h. Le contrôle positif utilisé est une solution de nanoparticules de polystyrène dont la surface est fonctionnalisée par des amines (PSNH<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) à 100 µg/mL, dont la cytotoxicité est avérée [10]. A la suite de cette exposition, les QDs sont retirés et les cellules sont rincées avec du PBS, puis 100 µL de WST-1 (Roche), au 1/10<sup>ème</sup> dans du milieu de culture non supplémenté, sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 37 °C pendant 1 h 30, puis l'absorbance est mesurée à 450 nm et 650 nm avec un spectrofluorimètre (Spectramax M2, Molecular Device). Pour l'analyse, l'absorbance à 650 nm, reflétant le bruit de fond de la mesure, est soustraite à celle à 450 nm.

Les expériences sont réalisées au moins trois fois indépendamment avec des cellules de donneurs différents (une expérience par donneur) et, pour chacune de ces expériences, cinq réplicats par condition sont réalisés. Pour évaluer l'interférence optique des QDs avec le test, après exposition au WST-1, les plaques sont centrifugées pendant 5 min à 50 × g, puis le surnageant est transféré dans une nouvelle plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée et comparée à celle obtenue sans l'étape de centrifugation. Si les absorbances sont comparables, alors les QDs n'interfèrent pas dans la lecture. En revanche, si les QDs interfèrent, les absorbances mesurées dans les deux conditions seront différentes. Dans un deuxième temps, pour vérifier qu'il n'y ait pas d'interférence chimique entre le réactif et les QDs, un autre test est réalisé en mélangeant la solution de WST-1 avec les plus fortes concentrations en QDs dans des puits sans cellule. Si la solution ne se colore pas, c'est qu'il n'y a pas d'interférence entre les composés. En revanche, si la solution se colore en l'absence de cellules, cela signifie que les solutions de QDs réagissent avec le WST-1.

#### **4.1.2. Mesure de l'intégrité membranaire : test LDH**

De la même manière que pour le WST-1, le test d'activité de la LDH (Lactate déshydrogénase) est sélectionné car il ne présente pas d'interférence avec les QDs (cf. chapitre 5). Il s'agit également d'un test colorimétrique qui permet d'évaluer la viabilité cellulaire par le biais de la mesure de l'intégrité membranaire, qui est un autre paramètre affecté lorsque la viabilité cellulaire diminue. L'emploi de ces deux tests complémentaires permet d'assurer la robustesse des conclusions. La LDH est une oxydoréductase intracellulaire qui catalyse



l'oxydation du lactate en pyruvate en réagissant avec  $\text{NAD}^+$  et inversement, qui réduit le pyruvate en lactate grâce à  $\text{NADH}$ . Lorsque la membrane des cellules est lésée, elle devient perméable et libère les LDH dans le milieu environnant. Le principe de ce test est de quantifier les LDH libérées dans le milieu après exposition à des agents toxiques. Pour cela, du  $\text{NAD}^+$  (dans le kit Sigma-Aldrich il s'agit du « co-facteur ») est ajouté et converti en  $\text{NADH}$  à l'aide d'agents de transferts d'électrons (dans le kit Sigma-Aldrich, il s'agit du « tampon »). Le  $\text{NADH}$  formé catalyse alors l'oxydation des sels de tétrazolium présents dans le mélange réactionnel (dans le kit Sigma-Aldrich, il s'agit du « substrat ») en formazan, ce qui permet d'obtenir une solution qui absorbe à 490 nm.

Pour cela, après avoirensemencées et exposées les cellules de la même façon que pour le test WST-1 (avec le même contrôle positif), 50  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés de chaque puits et transférés dans une nouvelle plaque 96 puits. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'un mélange de réactifs composé, à volume équivalent, de substrat, de co-facteur et de tampon (LDH assay kit, Sigma-Aldrich) est ajouté à chaque surnageant. Les plaques sont incubées pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière, puis la réaction est stoppée par ajout de 10  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ , 1 M) par puits. L'absorbance est mesurée à 490 nm et 690 nm sur le Spectramax M2 utilisé également pour le WST-1, puis l'absorbance à 690 nm est soustraite à celle à 490 nm. Ces expériences sont également réalisées au moins trois fois indépendamment avec des cellules de donneurs différents et, pour chacune de ces expériences, cinq réplicats par condition sont réalisés. L'ajout du mélange réactionnel dans des puits remplis de QDs dilués dans du milieu de culture aux plus fortes concentrations permet de vérifier que les QDs n'interfèrent pas dans la réaction chimique du test LDH. En effet, comme décrit précédemment pour le WST-1, l'absence de coloration dans ces contrôles traduit une absence d'interférence entre les réactifs et les QDs.

#### **4.1.3. Comptage des noyaux : marquage Hoechst 33342**

Un des objectifs de ce travail a été de mettre en place des méthodes de criblage à haut débit des effets toxiques des QDs. Dans ce cadre, nous avons souhaité développer un test évaluant la cytotoxicité des QDs qui puisse être couplé au test de génotoxicité par comptage automatique des foci de 53BP1 (cf. partie 4.2.2), c'est-à-dire, qui puisse être réalisé en parallèle à ce test, sur la même plaque de cellules. Or, la coloration des noyaux des cellules par marquage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) au Hoechst 33342 est réalisée pour le test 53BP1. Il permet également d'évaluer le nombre de noyaux cellulaires encore présents après exposition aux QDs, et, en le comparant au nombre de noyaux dans les puits de cellules non exposées, il

permet donc d'avoir une mesure de la cytotoxicité des QDs. Lors de l'immunomarquage 53BP1 (cf. partie 4.2.2), les cellules sont marquées avec du Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) à 0,3 µg/mL pendant 20 min, puis rincées au PBS et stockées dans du PBS contenant 50 % de glycérol. Le nombre de noyaux présents dans chaque puits est alors décompté grâce au microscope automatique de la plateforme de criblage à haut contenu (CellInsight CX5, Thermo Fisher Scientific). Les spectres d'excitation et d'émission ( $E_{x_{max}} = 340$  nm et  $E_{m_{max}} = 460$  nm) du Hoechst 33342 ne se recouvrent pas avec ceux des QDs ( $E_{x_{max}} = 380$  nm et  $E_{m_{max}} = 550$  nm), les interférences de mesures sont donc peu probables. En effet, aucune interférence n'a été observée avec le microscope automatisé. Ces expériences ont été réalisées deux fois indépendamment sur des kératinocytes de donneurs différents, avec 5 réplicats par condition pour chaque expérience.

## 4.2. Evaluation de la génotoxicité

### 4.2.1. Quantification des lésions de l'ADN : test des comètes

Le test des comètes, dans sa version alcaline, permet de détecter la présence de cassures simple et double-brin de l'ADN ainsi que les sites alkali-labiles. La version modifiée par incubation avec l'enzyme formamidopyrimidine ADN glycolase (Fpg) permet de révéler d'autres types de lésions de l'ADN qui sont sensibles à cette enzyme, dont la plus fréquente est la 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxodG). Grâce à l'obtention d'un financement par le réseau européen COST sur le projet hCOMET (CA15132), une collaboration avec le Dr. Amaya Azqueta Oscoz a été mise en place (Université de Navarre à Pampelune, en Espagne). Cette collaboration a permis un déplacement de deux semaines pour l'apprentissage de la méthode des comètes à moyen débit (2 et 12 gels/lame) [11], [12] alors que précédemment au laboratoire, la méthode classique (1 gel par lame) était utilisée.

#### Préparation des échantillons :

Les cellules sontensemencées pendant 24 h dans des plaques 12 puits puis exposées aux suspensions de QDs. Des expositions sont également effectuées avec du méthanesulfonate de méthyle (MMS) à 100 µM pendant 24 h, qui représente un des contrôles positifs de l'expérience. Les cellules sont ensuite récoltées puis congelées à -80 °C dans 200 µL de tampon de congélation (4,28 g sucrose, 588 mg citrate de sodium et 2,5 mL DMSO, pH 7,6 ajusté à l'aide d'acide citrique 0,1 M), à environ 1 million de cellules par mL.

### Préparation des lames :

La veille de l'expérience, des lames sont recouvertes d'une fine couche d'agarose préparé à 1 % (m/vol) dans du PBS puis séchées quelques heures à l'air libre et stockées. Pour la préparation des gels, de l'agarose à faible température de fusion est utilisé (low melting point agarose, Sigma Aldrich, qui est liquide à 37 °C et qui polymérise à température ambiante). Le jour de l'expérience, les cellules sont décongelées et diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans des solutions d'agarose à 1 % (m/vol) dans du PBS maintenues à 37 °C au bain marie. Deux gels de 70 µL sont déposés sur les lames précédemment décrites puis recouverts de lamelles (20 x 20 mm) et incubés sur un lit de glace pendant 10 min. Chaque lame correspond à une condition avec deux réplicats techniques pour les cellules d'un même donneur. Pour le témoin positif, les lamelles d'une des lames présentant des cellules non traitées (cette condition est réalisée en double) sont ôtées et 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 µM dilué dans du PBS sont déposés sur chacun des deux gels de la lame gel. Après 10 min d'incubation, ces gels sont rincés au PBS trois fois puis toutes les lamelles sont retirées. La suite du protocole est effectuée à l'obscurité. Dans la version 12 gels par lame, le protocole est identique à l'exception près que les cellules sont 4 fois plus diluées dans les gels et que le dépôt sur les lames correspond à des gouttes de 5 µL.

### Lyse, incubation Fpg et électrophorèse :

Les lames sont lysées pendant 1 h à température ambiante, dans un tampon alcalin (2,5 M de NaCl, 100 mM d'EDTA, 10 mM de Trizma base, pH 10) auquel est ajouté 10 % de DMSO et 1 % de Triton. Elles sont ensuite rincées trois fois dans du PBS puis incubées pendant 45 min à 37 °C, soit avec 0,05 U/µL d'enzyme Fpg diluée dans son tampon (M0240S, BioLabs), soit avec le tampon seul. Dans la version 12 gels par lame, l'incubation Fpg se fait à l'aide de supports à cavités spécifiques (30 µL de Fpg par cavité, à la même concentration que décrite précédemment). La réaction est stoppée en déposant à nouveau les lames sur la glace. Les lames sont alors placées dans une cuve d'électrophorèse verticale et recouvertes de tampon de migration à 4 °C (NaOH à 0,3 M et EDTA à 1 mM). Cette cuve d'électrophorèse haut débit permet de faire migrer 50 lames à la verticale, en une fois, grâce à deux supports pouvant contenir 25 lames qui se glissent directement dans les cuves de lyse, de rinçage et d'électrophorèse. Ce système permet donc de limiter les manipulations des lames (ce qui évite la perte de gels) et de consommer moins de tampons. Après 40 min de stabilisation dans le tampon de migration, la migration est effectuée pendant 30 min à 1,2 V/cm. A la fin de la migration, les lames sont rincées deux fois dans du PBS pendant 10 min.

### Analyse :

Pour l'analyse, l'ADN est marqué avec du GelRed (41003, Biotium) dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> dans du PBS. Si des cassures de l'ADN sont présentes, elles se traduisent par une relaxation de l'ADN qui migrent plus vite dans le gel, c'est ce qui forme la queue de la comète (Figure 31). L'analyse consiste à enregistrer 50 images de comètes par gel et à collecter le taux médian d'ADN dans la queue à l'aide d'un microscope à fluorescence relié au logiciel Comet IV (Perceptive Instruments, Suffolk, UK). L'expérience est réalisée trois fois indépendamment sur des kératinocytes de différents donneurs, selon les lignes de conduite reconnues par la communauté [11].

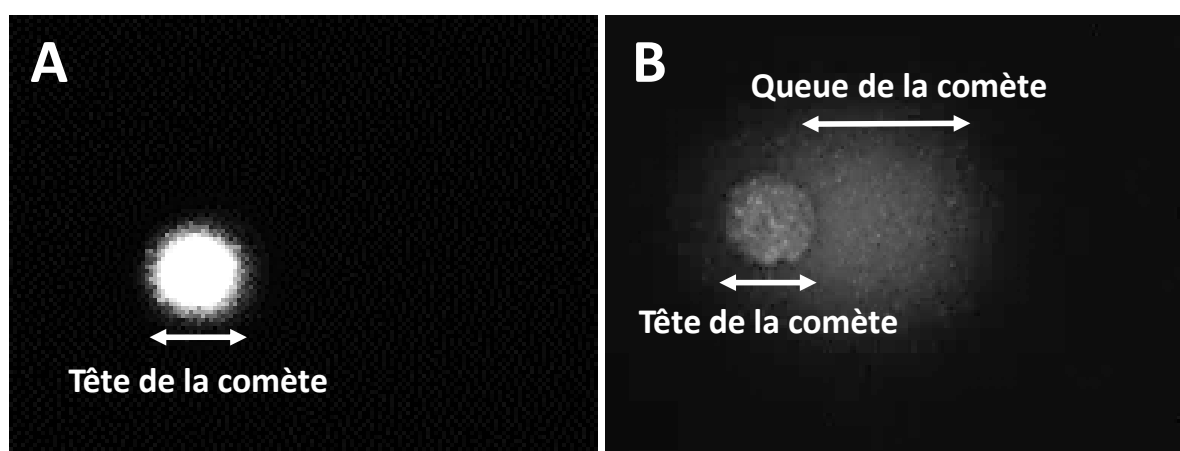


Figure 31 : Observations de comètes en microscopie à fluorescence. ADN intègre de cellules non traitées dites « contrôles » (A) ainsi que de l'ADN lésé de cellules traitées 24 h au MMS à 100  $\mu$ M (B).

#### **4.2.2. Quantification des lésions double-brin de l'ADN : immunomarquage 53BP1 en HCS**

Le test 53BP1 permet de marquer spécifiquement les cassures double-brin de l'ADN. Lors de l'apparition d'une cassure, un complexe de réparation spécifique de cette lésion se forme au site de la cassure, dans le noyau des cellules. Ce complexe est initié par la phosphorylation de l'histone  $\gamma$ H2AX, ce qui entraîne une cascade de signalisation comme l'ubiquitination de la chromatine et induit le recrutement de nombreux médiateurs et protéines. La protéine 53BP1, pour *p53-binding protein 1*, est alors recrutée en bout de signalisation par le complexe de réparation et s'accumule sur la chromatine, autour du site de cassure, jouant un rôle important dans le mécanisme de réparation NHEJ, pour *non-homologous end-joining* [13]. Son immunomarquage permet donc de révéler la présence de cassures double-brin de l'ADN, que l'on peut alors dénombrer en comptant les spots de fluorescence observés au microscope, appelés « foci » (Figure 32).

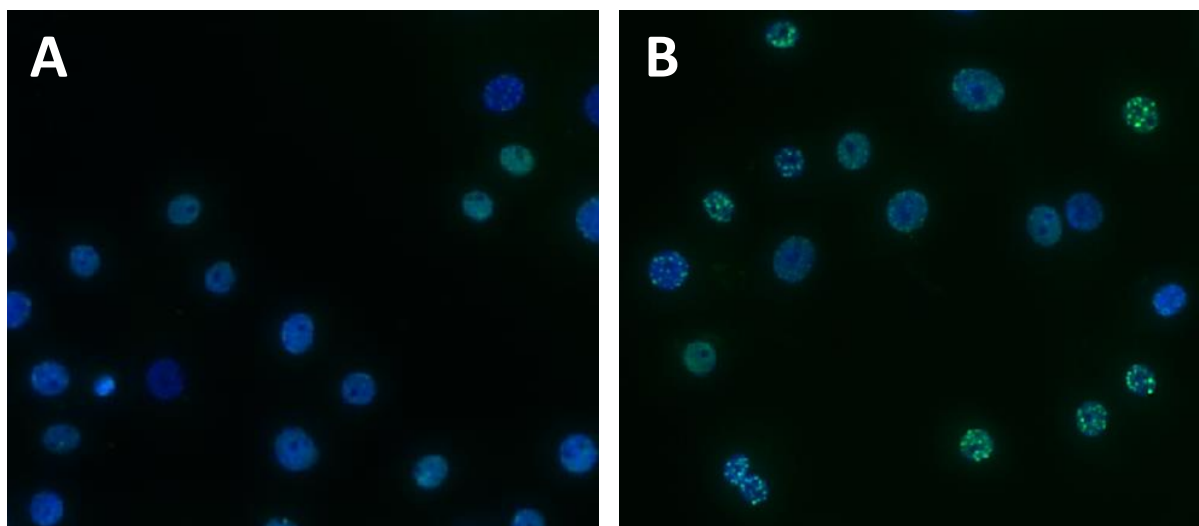


Figure 32 : Observation des foci de 53BP1 en microscopie automatisée à fluorescence. L'ADN a été marqué au Hoechst 33342 (bleu) et les foci de 53BP1 ont été immunomarqués avec IgG Atto 488 (vert). Clichés de cellules non traitées (A) et traitées 24 h avec 100  $\mu$ M d'étoposide (B).

Après ensemencement dans des plaques 96 puits noires à fond transparent (353219 Falcon), les cellules sont exposées à 100  $\mu$ L des différentes solutions de QDs ou à 100  $\mu$ M d'étoposide, qui est le contrôle positif de cette expérience. Ensuite, elles sont fixées par ajout de 100  $\mu$ L de PFA à 8 % dans du PBS. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées (trois fois) avec du PBS et perméabilisées pendant 15 min avec une solution de PBS contenant 0,2 % de Triton X-100 et 3 % d'albumine de sérum bovin (BSA). Après une nouvelle série de lavages, les sites aspécifiques sont bloqués par incubation des cellules pendant 15 min avec de la BSA diluée à 3 % dans du PBS. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 1 h avec l'anticorps primaire polyclonal anti-TP53BP1 humain, produit chez le lapin (PAB12506, Abnova) dilué dans du PBS avec 0,02 % d'azoture de sodium et 3 % de BSA. Puis elles sont à nouveau lavées et incubées pendant 1 h à l'obscurité avec un anticorps secondaire fluorescent qui n'interfère pas avec les QDs, un IgG Atto 633 anti-lapin ( $E_{x_{max}} = 629$  nm et  $E_{m_{max}} = 657$  nm) produit chez la chèvre (41176, Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS avec 3 % de BSA. L'immunomarquage est suivi d'une coloration de l'ADN avec du Hoechst 33342 comme décrit précédemment (cf. partie 4.1.3). Dans les cellules ainsi préparées et stockées dans du PBS contenant 50 % de glycérol, le nombre de noyaux cellulaires et de foci de 53BP1 par noyau sont comptés avec la plateforme de criblage CellInsight CX5 (Figure 33). Cette plateforme est composée d'un microscope à fluorescence automatisé, capable de lire de nombreux supports rapidement (lames et plaques multipuits pouvant aller jusqu'à 1 536 puits) et de combiner plusieurs marqueurs fluorescents au cours d'une même lecture. Les images de mesures sont alors enregistrées et l'analyse quantitative des résultats est effectuée par le logiciel HCS Studio 2.0. Ces expériences

sont réalisées deux fois indépendamment, sur des kératinocytes de donneurs différents, avec 5 réplicats par condition.



Figure 33 : Plateforme de screening à haut débit CellInsight CX5 (<https://www.biocompare.com/12104-Equipment/10618047-CellInsight-CX5-High-Content-Screening-HCS-Platform/>).

### **4.3. Quantification des espèces réactives de l'oxygène : H<sub>2</sub>DCFDA et DHR-123**

La présence de ROS intracellulaire est quantifiée par des mesures de fluorescence en utilisant les réactifs diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' (H<sub>2</sub>DCFDA) et dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Thermo Fisher Scientific). Ainsi, le H<sub>2</sub>DCFDA est converti dans le cytosol en molécule fluorescente (dichlorofluorescéine 2',7' (DCF)), après le clivage des fonctions esters par les estérases intracellulaires suivi de l'oxydation des sites formés par les ROS, principalement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Son analogue, la DHR-123, est quant à elle oxydée dans le cytosol en rhodamine 123 fluorescente (R-123) puis stockée dans la mitochondrie (Figure 34). Dans les deux cas, la fluorescence augmente lors de l'accumulation de ROS donc plus elle est élevée, plus la quantité de ROS générés est importante.

Après 24 h d'ensemencement cellulaire dans des plaques 96 puits noires, le milieu de culture est retiré et remplacé par 100 µL de H<sub>2</sub>DCFDA à 25 µM ou de DHR 123 à 1 µM (dilués dans du PBS), puis les plaques sont placées dans l'incubateur à 37 °C pendant 40 min. Cette étape permet à la sonde de s'accumuler dans la cellule. Ensuite, les réactifs sont enlevés et les puits rincés deux fois au PBS, puis les cellules sont exposées aux solutions de QDs (100 µL par puits). L'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP) à 100 µM et le bromate de potassium (KBrO<sub>3</sub>) à 1 mM sont utilisés comme témoins positifs. Une cinétique de mesure de la fluorescence est effectuée au spectrofluorimètre (Spectramax M2, Molecular Device), directement après

exposition aux QDs et après 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 24 h d'exposition. La longueur d'onde d'excitation est de 480 nm et l'émission est mesurée à 530 nm. La fluorescence obtenue est ainsi normalisée par rapport aux puits contrôles (non exposés aux QDs). Chaque expérience a été répétée deux fois indépendamment pour chaque QDs (5 réplicats par condition) sur des kératinocytes provenant de différents donneurs. Pour vérifier qu'il n'y ait pas d'interférence, des solutions de QDs de différentes concentrations sont incubées en parallèle dans des plaques noires dépourvues de cellules, avec ou sans réactifs en suivant le protocole décrit ci-dessus.

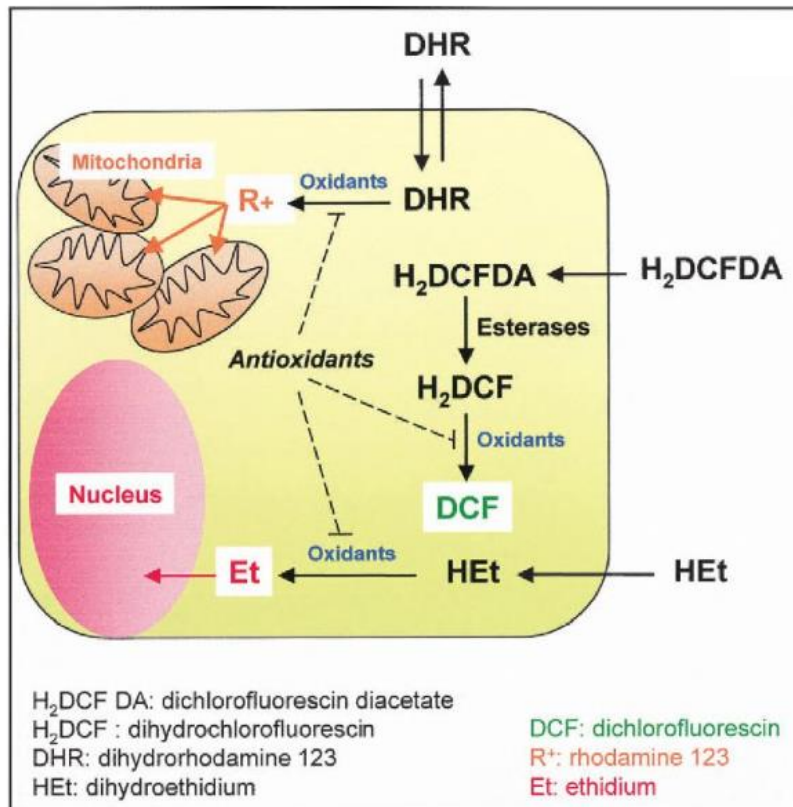


Figure 34 : Conversion des réactifs H<sub>2</sub>DCFDA et 123 DHR par la cellule en composés fluorescents [14].

## 4.4. Evaluation du protéome

### 4.4.1. Observation globale : L'analyse protéomique

La protéomique consiste en l'étude qualitative, quantitative et fonctionnelle des protéines d'une cellule, à un instant donné et dans une condition donnée. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Thierry Rabilloud (IRIG/CBM/PROMD). La technique utilisée est la technique ascendante ou *Bottom-up*, qui permet d'identifier et de quantifier des milliers de protéines en seulement quelques heures grâce aux méthodes de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse. Cette approche a la particularité de caractériser les protéines par le biais d'entités plus petites, à savoir leurs peptides (500 Da à 3 kDa) qui sont obtenus après

digestion enzymatique (trypsine). Ces derniers sont ensuite séparés par chromatographie liquide (LC), ionisés et analysés par spectrométrie de masse (MS) classique ce qui permet d'obtenir leur masse ou en tandem (MS/MS), ce qui permet d'obtenir la séquence peptidique. Ces mesures sont alors comparées à des valeurs théoriques, référencées dans des bases de données, ce qui permet l'identification des peptides puis, par analogie, l'identification des protéines correspondantes.

Après ensemencement dans des plaques 12 puits et exposition pendant 24 h aux QDs, les kératinocytes sont récoltés dans des tubes Eppendorf de 2 mL. Pour cette expérience, nous avons préparé quatre répliquats d'échantillons pour chaque condition. Les protéines cellulaires sont extraites par lyse des cellules pendant 1 heure à température ambiante dans une solution contenant, en concentrations finales, 7 M urée, 2 M thiourée, 4 % CHAPS (cholamidopropyltriméthylammoniumpropane sulfonate), 15 mM spermine base, 15 mM spermine tétrahydrochlorure et 5 mM tris(carboxyéthyl) phosphine. Le lysat est clarifié par centrifugation (15 000 x g, 15 minutes), le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est mesurée par la méthode de Bradford [15]. Les échantillons sont ensuite inclus par copolymérisation dans des plots de polyacrylamide [16], ce qui permet de réaliser ensuite les étapes de lavage, de digestion par la trypsine, et d'extraction des peptides qui sont ensuite analysés par LC-MS/MS. Cette partie du travail a été réalisée par la plateforme de protéomique de l'université de Strasbourg, qui nous a ensuite fourni la liste des protéines présentes dans chaque échantillon, ainsi que leur abondance.

Des listes de protéines présentes dans les différents échantillons sont obtenues après analyse. Tout d'abord, des calculs de distances sont effectués pour déterminer la similarité ou, au contraire, la différence entre deux échantillons biologiques. Pour ces calculs, la distance de Gower est choisie car elle est normalisée et n'apporte pas plus de poids aux protéines abondantes. Ces résultats sont ensuite représentés graphiquement grâce à des programmes de *clustering*, comme PAST, ce qui permet de classer et de visualiser les échantillons en fonction de leur distance [17]. Ces premiers résultats permettent de formuler des hypothèses quant à l'effet des QDs et de leur vieillissement sur le pool de protéines cellulaires.

Dans un deuxième temps, en fonction des hypothèses formulées et des différences observées, les protéines mises en jeu ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles elles interviennent sont identifiées. Pour cela, les conditions sont comparées deux à deux via une analyse statistique, en fonction des hypothèses choisies. Pour connaître les différences statistiquement significatives entre la condition A et la condition B, des tests de Student sont



réalisés sur Excel. Cette étape permet de ne garder que les protéines dont la présence est statistiquement différente d'une condition à l'autre. Les protéines contenues dans ces nouvelles listes sont ensuite regroupées par ontologies (termes) grâce à la plateforme d'analyse en ligne DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), qui est basée sur les stratégies de Gene Ontology (<https://david.ncifcrf.gov/>) [18], [19]. Pour limiter le risque d'erreur, les voies ayant un FDR (*false discovery rate*) inférieur à 10 % sont conservées puis les protéines regroupées dans chacune de ces voies sont analysées à l'aide de la base de données UNIPROT pour connaître leur fonction dans les voies métaboliques. Il reste ensuite à valider les hypothèses découlant de cette analyse par des tests ciblés.

#### **4.4.2. Quantification du niveau d'expression de certains gènes : RT-qPCR**

La RT-qPCR permet de réaliser une réaction en chaîne par polymérase (PCR) à partir d'un échantillon d'acide ribonucléique messager (ARNm) qui est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une transcriptase inverse. L'ADNc est alors amplifié par une polymérase et quantifié. Cela permet d'observer l'effet de l'exposition des HKPM aux QDs sur le niveau d'expression de gènes préalablement sélectionnés. Ainsi, les niveaux d'expression de SOD1, SOD2, GPX1, CAT, HO1, GCLM et P21 sont étudiés pour vérifier le niveau de stress oxydant dans les cellules. MT1, MT2, MTF1, ZnT1, ZnT7, ZIP1 et HSPA6 sont observés pour vérifier l'homéostasie du zinc dans les cellules. Enfin, des marqueurs de l'inflammation sont recherchés, en particulier les expressions de IL8, IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$ .

##### Extraction d'ARN :

Après ensemencement dans des plaques 12 puits puis exposition aux QDs, les cellules sont lavées, récoltées, lysées et l'ARN est extrait en utilisant le kit d'extraction GenElute<sup>TM</sup> mammalian total RNA miniprep (Sigma-Aldrich), selon les instructions du fabricant. Des mesures sur le spectrofluorimètre NanoDrop<sup>TM</sup> 3300 permettent de déterminer les concentrations en ARN obtenues après extraction grâce à une lecture de l'absorbance à 260 nm. La pureté de l'ARN est également contrôlée grâce à différents rapports d'absorbance. Les rapports 260/280 nm témoignant d'une non contamination par des protéines sont compris entre 1,7 et 2,1, et les rapports 260/230 nm témoignant d'une non contamination par des sels et des solvants sont compris entre 1,8 et 2,2. Les échantillons d'ARN sont congelés et stockés à -80 °C.

### Rétrotranscription de l'ARN en ADNc :

L'ADNc est obtenu grâce à une rétrotranscription de l'ARNm par la SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Pour cela, 0,5 µg d'ARN sont incubés à 70 °C pendant 5 min, en présence de 100 ng/µL de Random Primers (Promega) et d'un mélange de dNTPs à 10 mM (Sigma-Aldrich). Ensuite, les échantillons sont déposés 1 min sur de la glace puis sont ajoutés 2 µL de DDT à 0,1 M, 4 µL de tampon 5X-first Strand Buffer (250 mM de Tris HCl à pH 8,3 ainsi que 375 mM de KCl et 15 mM de MgCl<sub>2</sub>) et 1 µL d'inhibiteurs de ribonucléases à 45 U/µL (Sigma-Aldrich). Enfin, 1 µL d'ADN polymérase ARN dépendante (SuperScript III RT à 200 U) est ajouté puis l'échantillon est homogénéisé et incubé à 50 °C pendant 1 h. L'enzyme est alors inactivée à 70 °C pendant 15 min. Les échantillons d'ADNc obtenus sont dilués (20 ng/µL) et stockés à -20 °C.

### PCR quantitative :

Conformément aux instructions du fabricant ainsi qu'aux recommandations MIQE [20], une PCR quantitative avec le système de détection PCR en temps réel CFX96, couplé à un thermocycleur C1000 (Bio-Rad), est effectuée à l'aide du fluorophore SYBR Green SuperMix (Bio-Rad). Les séquences d'amorces utilisées sont détaillées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3). CycloA, GADPH et S18 sont utilisés comme gènes de référence. L'efficacité des amorces est testée au préalable et est égale à  $2 \pm 0,3$ . Pour chaque puits, 5 µL d'ADNc à 4 ng/µL (ou une gamme de concentrations pour évaluer l'efficacité des amorces) sont mélangés à un mix d'amorces et de fluorophore (10 µL de SYBR Green, 1 µL d'eau *nuclease-free*, 2 µL d'amorces sens à 2 µM et 2 µL d'amorces antisens à 2 µM). Les plaques sont centrifugées 3 min à  $98 \times g$  avant d'être placées dans l'appareil de PCR. Le profil thermique effectué est de 5 min d'activation à 95 °C suivi de 40 cycles d'amplification (15 sec à 95 °C puis 20 sec à 55 °C et 40 sec à 72 °C) avec insertion d'une étape de courbe de fusion (1 min à 95 °C puis 30 sec à 55 °C et 30 sec à 95 °C). Cette dernière permet de vérifier la spécificité d'amplification par la présence d'un pic unique supérieur au seuil de fusion. Pour chaque gène testé, l'expérience est composée de trois réplicats biologiques ainsi que deux réplicats techniques qui proviennent de cellules d'un même donneur. Des contrôles sans ADNc sont également présents sur chaque plaque pour vérifier l'absence de contamination hors ADNc, ainsi que l'absence d'auto-appariement des amorces. Pour l'analyse des résultats, les valeurs d'expression relative sont calculées à l'aide du logiciel REST2009 selon l'équation :  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  [21]. La méthode des  $\Delta\Delta Cq$  correspond à la différence entre le  $\Delta Cq$  d'une condition et le  $\Delta Cq$  du contrôle (cellules non

traitées). Le  $\Delta Cq$  correspond quant à lui à la différence entre le  $Cq$  (ou valeur seuil) du gène d'intérêt et le  $Cq$  du gène de référence.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

	<b>Amorce sens (5'&gt;3')</b>	<b>Amorce antisens (5'&gt;3')</b>
<b>Gènes de référence</b>		
<b>CycloA</b>	TTCATCTGCACTGCCAAGAC	TCGAGTTGTCCACAGTCAG
<b>S18</b>	AACGTCTGCCCTATCAACTTT	TGGATGTGGTAGCCGTTTTCT
<b>GADPH</b>	GAGTCAACGGATTTGGTTCGT	TTGATTTTGGAGGGGATCTCG
<b>Stress oxydant</b>		
<b>SOD1</b>	AGGGCATCATCAATTTTCGAG	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC
<b>SOD2</b>	TCCACTGCAAGGAACAACAG	TCTTGCTGGGATCATTAGGG
<b>GPX1</b>	CCAGTCGGTGTATGCCTTCT	CTCTTCGTTCTTGGCGTTCT
<b>CAT</b>	AGCTTAGCGTTCATCCGTGT	TCCAATCATCCGTCAAAACA
<b>HO-1</b>	TTCTCCGATGGGTCTTACT	GGCATAAAGCCCTACAGCAACT
<b>P21</b>	GCGCTGGGCAGCCAGGAGCCT	CTGACTTCGGCAGCTGCTCAC
<b>Homéostasie du zinc</b>		
<b>MT1</b>	GCTTCTCCTTGCCCTGAA	TGACGTCCCTTTGCAGAT
<b>MT2</b>	TGCATTTGCACTCTTTGCAT	TCTTCAGCTCGCCATGGAT
<b>ZnT1</b>	CGCAGCCATGGGGTGTGGG	CATCGCCAGCGACGAGGTCA
<b>ZnT2</b>	AACTTTGGCTGGCAGAGAGC	TGGTGAAGGGTCAACCCCAT
<b>ZnT7</b>	GTGCCTGAACCTCTCTTTCG	CGGAAATCAGCCTAAGCAG
<b>ZIP1</b>	GCCAGGAGCTAACCATGAAG	ATGGCCAGGATGAACTCTTG
<b>MTF1</b>	CGAAGGAGAAGCCATTTGAG	ATTTGCTGCAGCCTTCAGAT
<b>HSPA6</b>	AGGAGGTGGAGAGGATGGTT	TGTCCTCTTCGGGAATCTTG
<b>Inflammation</b>		
<b>GCLM</b>	AGTCCTTGGAGTTGCACAGC	ACACAGCAGGACGCAAGATT
<b>IL1<math>\beta</math></b>	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGAT
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	GAGCAGTGAAAGCATGATCC	CGAGAAGATGATCTGACTGCC
<b>IL6</b>	TCTCCACAAGCGCCTTCG	CTCAGGGCTGAGATGCCG
<b>IL8</b>	GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA	CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC
<b>IL10</b>	CATCGATTTCTCCCTGTGAA	TCTTGGAGCTTATTAAGGCATTC

## 5. Statistiques

L'interface RStudio, appartenant au logiciel R 3.3.2, a été utilisée pour l'analyse statistique des expériences. Le faible nombre d'échantillons dans la plupart des tests en biologie rendent les tests paramétriques non pertinents. En effet, l'hypothèse de normalité et d'hétéroscédasticité des échantillons par les tests de Shapiro et de Bartlett n'étant pas vérifiée, les tests paramétriques ne doivent pas être utilisés. La significativité statistique des résultats a donc été évaluée avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui compare non pas les médianes mais le rang des valeurs. Ce test est ensuite associé à des comparaisons par paires en utilisant le test de Wilcoxon avec la méthode d'ajustement de Benjamini-Hochberg. Ces tests

bilatéraux sont réalisés en fixant le seuil  $\alpha$  (risque maximale de se tromper) à 5 %. Les résultats sont donc considérés comme statistiquement significatifs si la p-valeur est inférieure à 0,05.

## **Références :**

- [1] K. D. Wegner et al., « Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity », *Front. Chem.*, vol. 7, p. 466, juin 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00466.
- [2] O. Proux et al., « FAME: a new beamline for x-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests », *Phys. Scr.*, vol. 2005, no T115, p. 970, 2005, doi: 10.1238/Physica.Topical.115a00970.
- [3] O. Proux et al., « Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances », *J Synchrotron Rad*, vol. 13, no 1, p. 59-68, janv. 2006, doi: 10.1107/S0909049505037441.
- [4] V. Briois et al., « SAMBA: The 4–40 keV X-ray absorption spectroscopy beamline at SOLEIL », in *UVX 2010 - 10e Colloque sur les Sources Cohérentes et Incohérentes UV, VUV et X ; Applications et Développements Récents*, 2011, p. 41-47, doi: 10.1051/uvx/2011006.
- [5] S. Huguet, « Etude du devenir du cadmium dans un sédiment de curage fortement contaminé et des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis halleri* », *phdthesis*, Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2009.
- [6] B. Ravel et M. Newville, « ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT », *J Synchrotron Radiat*, vol. 12, no Pt 4, p. 537-541, juill. 2005, doi: 10.1107/S0909049505012719.
- [7] C. Johansen, « Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin », *J Vis Exp*, no 130, déc. 2017, doi: 10.3791/56863.
- [8] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, et T. Douki, « Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no 37, p. 13765-13770, sept. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604213103.
- [9] H. Jung et al., « Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells », *Chang Gung Med J*, vol. 26, no 4, p. 250-258, avr. 2003.
- [10] S. Anguissola, D. Garry, A. Salvati, P. J. O'Brien, et K. A. Dawson, « High Content Analysis Provides Mechanistic Insights on the Pathways of Toxicity Induced by Amine-Modified Polystyrene Nanoparticles », *PLoS One*, vol. 9, no 9, sept. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108025.
- [11] A. Azqueta et al., « Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 843, p. 24-32, juill. 2019, doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.04.007.
- [12] D. Muruzabal, S. Langie, B. Pourrut, et A. Azqueta, « The enzyme-modified comet assay: Enzyme incubation step in 2 vs 12-gels/slide systems », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 845, nov. 2018, doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.005.
- [13] S. Panier et S. J. Boulton, « Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, no 1, p. 7-18, janv. 2014, doi: 10.1038/nrm3719.
- [14] C. K. Sen et L. Packer, *Redox Cell Biology and Genetics*, Part A. Elsevier, 2002.
- [15] M. M. Bradford, « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding », *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no 1, p. 248-254, mai 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [16] L. Muller et al., « Extended investigation of tube-gel sample preparation: a versatile and simple choice for high throughput quantitative proteomics », *Sci Rep*, vol. 8, mai 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26600-4.

- [17] O. Hammer, D. A. T. Harper, et P. D. Ryan, « PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis », *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, no 1, p. 9.
- [18] D. W. Huang, B. T. Sherman, et R. A. Lempicki, « Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources », *Nat Protoc*, vol. 4, no 1, p. 44-57, 2009, doi: 10.1038/nprot.2008.211.
- [19] H. da W, S. Bt, et L. Ra, « Bioinformatics Enrichment Tools: Paths Toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists », *Nucleic acids research*, janv. 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19033363/?dopt=Abstract> (consulté le juin 17, 2020).
- [20] S. A. Bustin et al., « The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments », *Clinical Chemistry*, vol. 55, no 4, p. 611-622, avr. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- [21] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, et L. Dempfle, « Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR », *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no 9, p. e36, mai 2002.



### **Chapitre 3 :**

*Evolution physico-chimique  
des quantum dots au cours  
d'un vieillissement accéléré  
reproduisant les conditions  
environnementales*





La synthèse de QDs plus sûrs pour la santé et l'environnement est une source de préoccupation depuis ces dernières années, notamment avec le développement d'études sur la fin de vie et le recyclage des produits. Il est donc important de connaître la formulation et l'environnement structural des éléments constituant les QDs, ainsi que leurs transformations au cours de leur cycle de vie. Pour cela, une caractérisation des QDs au cours d'un vieillissement mimant les conditions environnementales est primordiale pour pouvoir comprendre les différents mécanismes qui peuvent être mis en jeu par les cellules pour lutter contre une exposition à ces derniers. Une caractérisation physico-chimique a ainsi été réalisée sur les QDs d'InZnP, soumis à un vieillissement solaire accéléré en enceinte climatique. Les résultats sont présentés dans un premier article scientifique.

## **1. Introduction**

Les trois types de QDs étudiés dans ces travaux, pour rappel des QDs d'InZnP/Zn(Se,S) tels qu'ils sont ou recouverts d'une coquille supplémentaire de ZnS (fine ou épaisse), ont été soumis à un vieillissement accéléré dans une enceinte climatique pendant des temps allant de 15 minutes à 24 heures. Des mesures sont effectuées régulièrement, à différents temps de vieillissement, de manière à suivre l'évolution des transformations chimiques des QDs soumis à un rayonnement continu, simulant le spectre solaire et à une température de 40 °C, comme décrit dans le chapitre 2. Des photos des échantillons sont prises aux différents temps de vieillissement pour contrôler l'aspect visuel des QDs. Macroscopiquement, on observe que dans un premier temps les QDs précipitent. Après avoir précipité, les QDs subissent de nombreux changements de couleur durant le vieillissement, ce qui confirme qu'ils subissent des transformations chimiques. Pour en savoir davantage, une caractérisation physique est réalisée grâce à des mesures d'absorbance en UV-visible et de photoluminescence à ces différents temps de vieillissement. Puis, une caractérisation structurale et chimique est effectuée par des analyses en spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) ainsi que par la microscopie électronique en transmission couplée à la spectrométrie à dispersion d'énergie (MET-EDX). Ces méthodes sont également présentées dans le chapitre 2.

## 2. Article 1 :

### **Physicochemical transformation of InP quantum dots during artificial weathering under simulated sunlight and identification of secondary products.**

Fanny Dussert<sup>a</sup>, Géraldine Sarret<sup>b</sup>, Karl David Wegner<sup>c</sup>, Olivier Proux<sup>d</sup>, Gautier Landrot<sup>e</sup>, Pierre Henry Jouneau<sup>f</sup>, Peter Reiss<sup>c</sup>, Marie Carrière<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ.Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-SyMMES, CIBEST, 38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR , ISTerre, 38000 Grenoble, France

<sup>c</sup> Univ.Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-SyMMES, STEP, 38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> BM30B/FAME beamline, ESRF, 38043 Grenoble, France

<sup>e</sup> Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, 91190 Saint Aubin, France

<sup>f</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-MEM, LEMMA, 38000 Grenoble, France

\*Corresponding author: Dr. Marie Carrière, [marie.carriere@cea.fr](mailto:marie.carriere@cea.fr), CEA-Grenoble IRIG-SyMMES/CIBEST, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France. Phone: 04 38 78 03 28. Fax: 04 38 78 50 90

## Abstract

Indium phosphide (InP) based quantum dots (QDs), which are one of the most promising alternatives to cadmium-based QDs, are capped with three different types of shells to improve their stability and optical properties. The first (Gradient shell) is composed of a single shell of zinc, selenium and sulfur (Zn(Se,S)). The second one (Thin shell) contains the same gradient shell, but on top of it a second, thin shell of ZnS. Finally, the third one (Thick shell) is identical to the previous one, but with a thicker ZnS shell. All three core/shell structures are transferred to the aqueous phase surface ligand exchange with by D-penicillamine, while maintaining their fluorescence properties. The photostability of the different systems is assessed after accelerated aging in a climatic chamber, under continuous irradiation with simulated sunlight. The aging process induces the precipitation and the degradation of the QDs resulting in a loss of photoluminescence. However, the growth of a double shell and the increase of the ZnS shell

thickness improve the QDs resistance against photodegradation over time. X-ray absorption spectroscopy (XAS) and scanning transmission electron microscopy coupled to energy-dispersive X-ray analysis (STEM-EDX) analysis reveal the nature of the transformation products of the aged QDs.

Keywords: Quantum dots, Environmental aging, core/shell design, XAS, MET-EDX.

## Introduction

InP QDs are proposed as a “safer by design” alternative to Cd-based QDs, due to similar optical properties combined to increased safety (Reiss et al., 2009; Tarantini et al., 2019). Their fields of application range from optoelectronics to bioimaging, particularly the development of light-emitting diode (LED), organic light-emitting diode (OLED), TVs and displays (Piccinno et al., 2012). The “safer by design” approach is a concept with a main goal of improve the benefit/risk ratio of substances, from the manufacturing stage until its end of life in landfill or its recycling (Kraegeloh et al., 2018). In this context, “safer by design” nanomaterials have emerged in recent years, including InP QDs. Regarding QDs, “safer by design” strategies consist in decreasing their toxicity while enhancing their optical properties. Although InP QDs are less toxic than Cd-based QDs (Brunetti et al., 2013; Reiss et al., 2016), InP has been classified as probably carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (World Health Organization et al., 2006). Our previous formulations of gradient shell InZnP QDs (with a In:Zn ratio of 1:1), show some adverse effect on primary human keratinocytes, particularly after exposure to UV light, which causes their photodegradation (Tarantini et al., 2019). Their photodegradation can be limited by capping the QD core with a shell of inorganic material such as ZnS (Reiss et al., 2009; Huang et al., 2010). This also confers a better photoluminescence quantum yield (PLQY) to the QD, which brings its optical properties to a level comparable to that of CdSe QDs (Wegner et al., 2019; Ramasamy et al., 2017). Since ZnS shows a large lattice mismatch with InP (7.7%), which would lead to core-shell disassembly, the use of ZnSe or graded Zn(Se,S) intermediate shell has been proposed as an alternative although ZnSe is more sensitive to oxidation than ZnS (Toufaniyan et al., 2018). Such QDs are more resistant to photodegradation than core-only InP QDs (Tarantini et al., 2019). In a “safer by design” perspective, the optimal conception in terms of photostability and safety would consist in

reducing the content of toxic compounds such as In in the QD core and to design more robust shells so that they increase the QD photostability and enhance the QD optical properties. We recently reported the synthesis of core/shell InZnP QDs in which the In content in the core was reduced (with a gradient shell In:Zn ratio of 1:2). These QDs were capped with either a single shell of Zn(Se,S), as previously, or with a double shell where the Zn(Se,S) first shell was further coated with 3 (thin second shell) or 4-5 (thick second shell) monolayers of ZnS (Wegner et al., 2019). These double shell QDs were less prone to photodegradation than single-shell QDs when embedded in a PMMA matrix and exposed to UV light (Wegner et al., 2019)

The aim of the present study was to compare the photostability of these new formulations of QDs in aqueous phase when exposed in realistic environmental conditions, i.e. using accelerated weathering in a climatic chamber, and to characterize their transformation product during aging. Single shell QDs (thereafter named Gradient shell QDs) and double shell QDs with a thin or thick second shell (thereafter named Thin shell QD and Thick shell QD, respectively) were aged for 15 min to 24 h in a climatic chamber. Their photophysical properties were analysed and showed several successive steps of physico-chemical transformation. At each of these steps, the transformation products were characterized using scanning-transmission electron microscopy and energy-dispersive spectroscopy, as well as X-ray absorption spectroscopy, which provided the speciation of indium, zinc and selenium during QDs aging.

## Materials and methods

### Chemicals

Unless specifically indicated, all chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich and were >99% pure.

### QD synthesis

The synthesis of QDs was previously described (Wegner et al., 2019). Briefly, it consists in the synthesis in an organic solvent (octadecene) of an InZnP core, using indium-myristate, zinc stearate and tris(trimethylsilyl)phosphine. Then, this core is coated with gradient shell composed of Zn(Se,S), using zinc oleate, trioctylphosphine-Se and trioctylphosphine-S. This type of QD is named Gradient shell. For the Thin and Thick shell QDs, this shell is further coated with a second shell of ZnS, thanks to the use zinc ethylxanthate and zinc stearate. For the synthesis of Thick shell QDs, zinc concentration and shell growth time are doubled.

## QD functionalization

To render experiments in aqueous solution possible, QDs were transferred from the organic phase to aqueous phase using ligand exchange with D-penicillamine, as previously described (Wegner et al., 2019; Tamang et al., 2011). Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) reducing agent was used to avoid disulfide bonds formation. QDs were then stored at 4 °C in the dark, reducing as much as possible their exposure to oxygen from the air; they remained stable for at least 3 months.

## Accelerated weathering in a climatic chamber

QDs were diluted to reach the concentration of 1  $\mu\text{M}$  in 2 mL of phosphate-buffered saline solution (PBS) and placed in quartz cuvettes (10 mm  $\times$  10 mm, optical path length 10 mm), closable by a screw cap with silicone rubber seal. Samples were then placed on a magnetic stirrer into a Q-SUN Xe-1 Xenon arc test chamber (Q-LAB) simulating a continuous full sunlight spectrum. The settings were chosen in accordance to the ISO norms 4892-1 (2000) and 4892-2 (2013), that have been developed for studying the ageing of plastics. The temperature and the irradiance were fixed at 40 °C at 1.44 W/m<sup>2</sup> (measured at 420 nm) respectively, without humidity control. All QDs were aged for 24 h in these conditions with either direct measurements at different step of aging or sample collections for further characterization.

## Photophysical characterization

Photophysical characterisations were performed via measuring the UV-vis absorption spectra of pristine and aged QDs, as well as their photoluminescence (PL) spectra. For characterization of the pristine (unaged) samples, UV-vis spectroscopy was performed using a 8452A spectrometer (Hewlett Packard) and PL spectra were recorded on a Fluorolog FL3-22 spectrometer (Horiba-Jobin Yvon) comprising a 150 W xenon lamp and monochromator for excitation. The Horiba Scientist decay analysis software was used to analyse the data. For aging kinetics measurements, the UV-vis absorption was measured using a Cary 100 spectrometer (Agilent) and the fluorescence was measured using a NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (ThermoFisher Scientific). Absorption and emission spectra were measured at 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 30, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h of aging. To enable the comparison of PL intensities of different samples, spectra were acquired using identical measurement conditions (spectrometer, slits, excitation conditions, etc.) and normalized with respect to absorbance at the excitation wavelength.

## Scanning transmission electron microscopy coupled to energy-dispersive X-ray analysis

Samples were prepared by depositing a drop of QDs on a copper grid coated with lacey carbon films. Then, samples were dried for 24 h at room temperature and stored in the dark. Before analysis, samples were carbon-coated. They were imaged using scanning-transmission electron microscopy (STEM), using a high angle annular dark field (HAADF) detector and analysed using Energy-dispersive X-ray analysis (EDX), on a FEI/Tecnai OSIRIS microscope operating at 200 kV.

## X-ray absorption spectroscopy

At different stages of aging, QDs were collected for X-ray absorption spectroscopy (XAS). In, Zn and Se speciation were analysed on samples collected from Gradient shell, Thin shell and Thick shell QDs, pristine and aged for 30 min, 2 h or 6 h and 24 h, except for Zn speciation, which was not analysed on the Thick shell QD. They were concentrated by brief centrifugation and elimination of the supernatant, mixed with 20% (vol/vol) glycerol, and then 100  $\mu$ L of the suspension was deposited on the sample holder and directly frozen by immersion in liquid nitrogen. Zn speciation was analyzed by Zn K-edge extended X Ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy on FAME (BM30B) beamline (Proux et al., 2005) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France), operating in multi-bunch mode (150 to 200 mA). The protocol and settings were detailed previously (Tarantini et al., 2019). In and Se speciation were analyzed by In K-edge and Se K-edge EXAFS spectroscopy on SAMBA beamline at the SOLEIL (Optimized Light Source of Intermediate Energy to LURE) synchrotron (Saclay, France) operating at 450 mA in top-up mode. Spectra were recorded at 20 K using a liquid He cryostat. The beamline is equipped with a Si(220) monochromator running in zap scan mode. Spectra were recorded in fluorescence mode using a 35-element Ge detector. 10 to 40 spectra of 3 min each were averaged, depending on the signal. Before averaging, individual spectra were compared to check possible radiation damage. For Se, a photoreduction was observed for the samples after 24 h aging, so only the first five spectra were averaged. Metallic Se and In foils were recorded simultaneously and spectra were calibrated by setting the inflection point of the absorption edge at 12658.0 and 27940.0 eV, respectively.

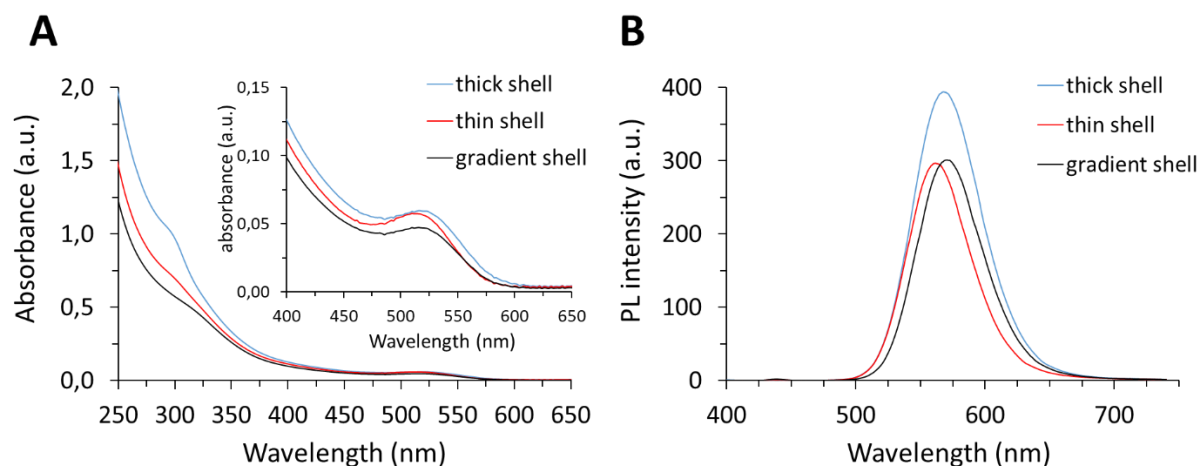
Data were normalized and treated using the Demeter software package (Ravel and Newville, 2005). Spectra for the pristine QDs were analyzed by shell fitting using ARTEMIS software (Ravel and Newville, 2005). Spectra for the aged QDs were analyzed by linear combination fitting (LCF) using Demeter/ATHENA (Ravel and Newville, 2005) using the In and Zn reference spectra previously described (Tarantini et al., 2019). Reference spectra used for Se speciation are red selenium (red Se(0)), grey selenium (grey Se(0)), sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), selenium dioxide ( $\text{SeO}_2$ ), zinc selenide ( $\text{ZnSe}$ ), selenium disulfide ( $\text{SeS}_2$ ) selenocystine, selenomethionine, selenourea. Spectra for the aged QDs were analyzed by LCF using pristine, red Se(0) and  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  reference spectra.

## Results and discussion

### Photophysical characterization of pristine QDs

The pristine forms of the three QDs were characterized after ligand exchange using penicillamine as a surface ligand (Figure 1). The absorbance spectra showed a bump at around 300 nm (Figure 1A), with increasing intensity when the shell thickness increased, as previously described (Wegner et al., 2019). All three QDs showed an excitonic peak below 520 nm (Figure 1A). While the maximum of this excitonic peak was at the same wavelength for Gradient shell and Thick shell QDs, it was slightly shifted by around 4 nm towards lower wavelengths for the Thin shell QD. All three QDs showed maximum fluorescence emission at 560-570 nm, once again with a small blue shift of the PL maximum for the Thin shell sample (Figure 1B). As expected, the photoluminescence intensity of the Gradient shell and Thin shell QDs were slightly lower than that of the Thick shell QD. This confirms that the properties of these QDs in aqueous phase were similar to those that we previously described in the organic phase (hexane) or when they were included in a PMMA matrix (Wegner et al., 2019). Moreover, these enhanced photophysical properties suggest that smaller quantities of Thick shell QDs would be necessary to achieve the same fluorescence level as Gradient shell or Thin shell QDs, confirming that they can be designated as “safer by design” QDs, as compared to the previously developed InP formulations.

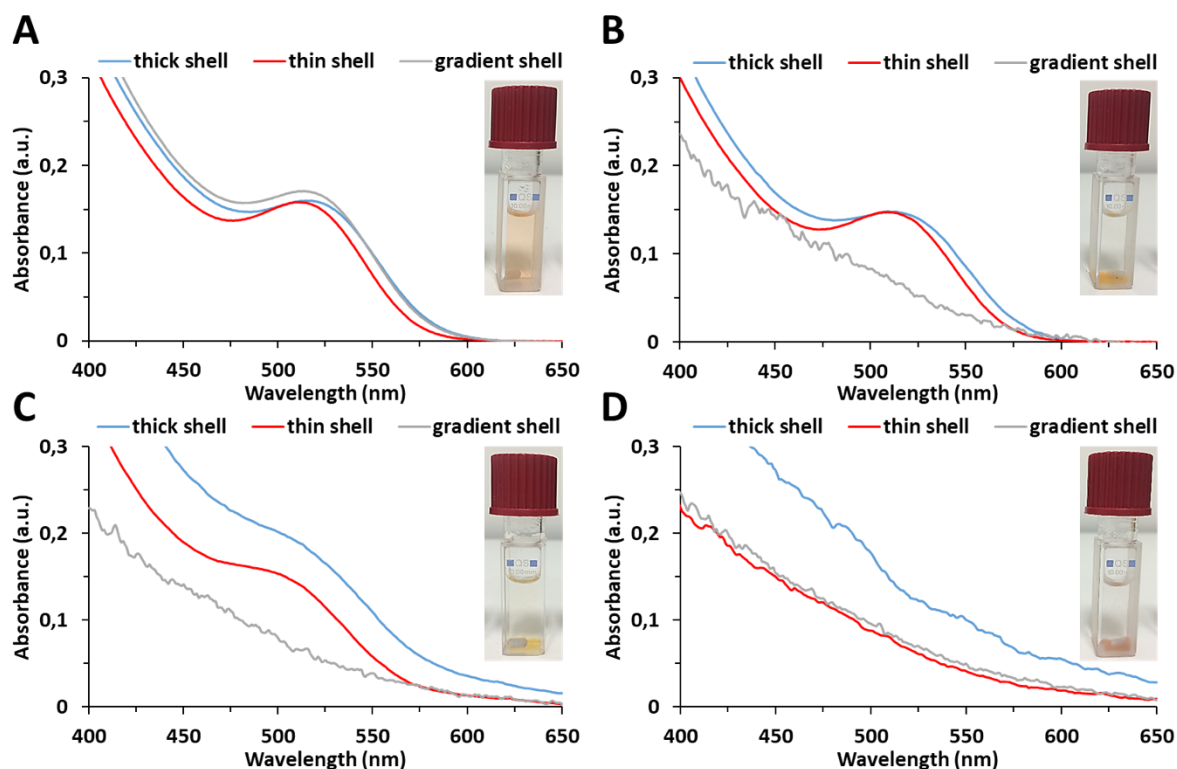




**Fig. 1.** Photophysical properties of QDs after aqueous phase transfer. UV-vis absorbance (A) and photoluminescence (B) spectra (excitation wavelength: 400 nm).

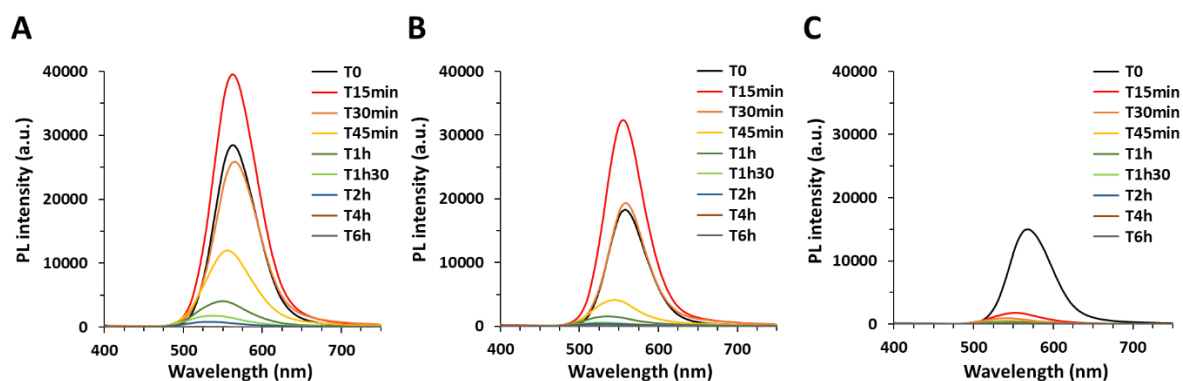
### Photostability of QDs when exposed to accelerated weathering

QDs were aged in a climatic chamber to simulate their exposure to environmental conditions in realistic conditions, i.e. under sunlight on a summer day at noon (40 °C, irradiation power: 1.44 W/m<sup>2</sup>). Progressive degradation of the QDs was observed when analysing their absorption properties after 15 min, 30 min and 1 h of accelerated weathering (Figure 2). The characteristic excitonic pic at 520 nm was progressively lost, proving their degradation, with the Gradient shell QDs degrading after only 15 min of weathering. To the contrary, the excitonic peak disappeared only after 45 min of weathering in the case of Thin and Thick shell QDs, demonstrating their enhanced resistance against environmental degradation. In addition, during aging the three QDs first precipitated, then the color of these precipitates changed progressively, as illustrated in Figure 2 (Thick shell QDs). After a few minutes of exposure to simulated sunlight, the fluorescent orange suspension of QDs (Figure 2A) settles down as a precipitate with similar properties (Figure 2B). Next, the precipitate lightens and turns yellow after 30 min of exposure (Figure 2C), then pink after 45 min and finally grey after 24 h (Figure 2D), with a progressive loss of fluorescence. This suggests that the first stage of aging corresponds to the precipitation of intact QDs, which still hold their fluorescent properties; then the following stages correspond to chemical degradation, with formation of transformation products having different optical properties, as previously described for CdSe QDs (Derfus et al., 2004). When the same QDs were exposed to high temperature (40 °C) without exposure to simulated sunlight, no degradation was observed (not shown).



**Fig. 2.** Photophysical properties of QDs during aging in a climatic chamber after aqueous phase transfert. UV-vis absorbance spectra of the different QDs after 0 min (A), 15 min (B) 30 min (C) and 45 min aging. Images of the Thick shell sample are included at each step of degradation to illustrate the macroscopic observation of QD degradation.

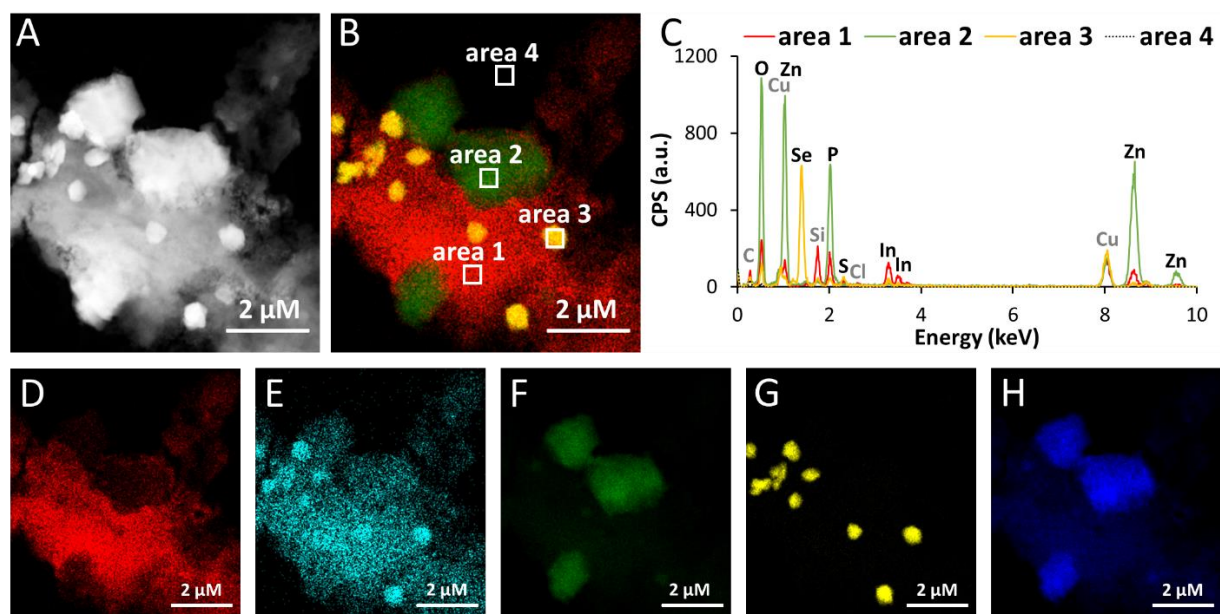
The evolution of photoluminescence during aging followed the same trend (Figure 3). The PL first increased when Thick and Thin shell QDs were exposed to UV light (Figure 3, red spectra, after 15 min of irradiation compared to the black spectra, recorded on pristine QDs), which corresponds to the removal/filling of surface trap states as described in the literature (Lee and Osborne, 2009). Then the PL of both QDs decreased progressively upon weathering, finally reaching a minimum detectable signal after 2 h (Thick shell, Figure 3A) or 1 h 30 (Thin shell, Figure 3B) of weathering. The Gradient shell QD degraded much more quickly, with no observation of the initial PL enhancement that would occur earlier than 15 min. The minimum detectable PL was reached after only 30 min of weathering (Figure 3C). This confirms the expected higher photostability of double shell QDs as compared to the single gradient shell QDs, and of thick ZnS outer shell QDs with respect to thin shell QDs. Again, in a “safer by design” approach, these results highlight that Thick shell QDs are the best candidate of this study, combining higher initial PL intensity and greater photostability.



**Fig. 3.** Photophysical properties of QDs during aging in a climatic chamber. Photoluminescence spectra of Thick shell (A), Thin shell (B) and Gradient shell (C) QDs (excitation wavelength: 400 nm).

### Physicochemical characterization of aged QDs

The transformation products of these QDs were characterized using electron microscopy coupled to energy-dispersive spectroscopy and X-ray absorption spectroscopy. Despite the low contrast of ZnS in electron microscopy, the size of these QDs have been previously estimated by TEM measurements and compositional analyses, revealing 3.6-5.0 nm (Gradient shell:  $3.6 \pm 0.3$  nm, Thin shell:  $4.2 \pm 0.3$  nm, Thick shell:  $5.0 \pm 0.4$  nm) nanocrystals that were not agglomerated or aggregated (Wegner et al., 2019). In contrast, aged QDs appeared as large electron-dense precipitates, independently of their initial composition (Figure 4A and Figure S1). These precipitates (with a gradient shell In:Zn ratio of 1:2) are morphologically similar to those obtained with the previous generation of Gradient shell InZn(S)P QDs, which was composed of much indium in the core (with a gradient shell In:Zn ratio of 1:1) (Tarantini et al., 2019). They consisted of heterogenous structures where three areas with distinct compositions could be distinguished, suggesting heterogenous aggregation (Figure 4A-B). Accordingly, In co-precipitated with P, O, C, S and some Zn (Figure 4B-C-D, area 1) while the majority of Zn co-precipitated in different areas with some P and O (Figure 4B-C-F-H, area 2). Finally, Se co-precipitated with S separately (Figure 4B-C-E-G, area 3). This result suggests that during aging, QDs underwent dissolution and reprecipitation. Due to the presence of redox-sensitive elements including Se and S, some redox reactions may be expected under UV exposure. Similarly, in the case of CdSe QDs, aging was shown to induce degradation of the surface coating and release of Cd due to the oxidation of Se (Derfus et al., 2004; Mahendra et al., 2008). Contributions of copper, silicon, and chlorine were also observed in the EDX spectra (Figure 4C), which can be explained by the fact that samples were analysed on copper grids, via a detector containing silicon and that the sample was aged in PBS that contains NaCl.



**Fig. 4.** Structural characterization of aged Thick shell QDs by STEM-EDX analysis. STEM imaging (A) followed by EDX analysis (B-H). B represents a reconstruction of the distribution of In, Zn and Se in the sample. The EDX spectra of areas 1, 2, 3 and 4 of B are shown in C. Distribution of In (D), S (E), Zn (F), Se (G) and P (H) in the sample.

The chemical speciation of In, Zn and Se was characterized by XANES and EXAFS in both pristine and aged QDs to get more insights on chemical transformations upon aging. In pristine QDs, In is mainly coordinated by P atoms at a distance of 2.53 Å, and a minor contribution of Se atoms from 2.56 to 2.57 Å was found (Figure 5B, Table S1). Similar parameters were obtained for the three types of QDs and for the previously reported InZnPS QDs with an In:Zn ratio of 1:1 (InZnPS\_CS\_pen, from Tarantini et al., 2019). These results are consistent with the structure of bulk indium phosphide (InP), in which In is bound to 4 P atoms at 2.54 Å distance (Wyckoff, R.W.G, 1963). Regarding the Se contribution, it could come from the presence of a mixed layer at the core-shell boundary (Cho et al., 2016). Moreover, the analysis of the InZnPS QDs (InZnPS\_CS\_pen, from Tarantini et al., 2019) was completed and is in agreement with Se contribution, in addition to a minor contribution of S (Tarantini et al., 2019), (Figure 5B, Table S1). This indicates that for this QD there is a mixed interfacial layer composed of S (present in the core) and Se (present in the shell).

Regarding the local structure of Zn in the Gradient and Thin shell pristine QDs (Figure 6B, Table S2), the first coordination sphere is composed of S and Se atoms in tetrahedral coordination. Further layers are dominated by Zn contributions, with a much lower number of atoms than in the crystalline phases of ZnS and ZnSe (Table S2). Two factors can

explain this structural disorder: first, the presence of a mixed phase ( $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$ ) in the gradient shell whose structure is likely disordered, and second, the presence of phases with various S/Se ratios within the shell, leading to additional destructive interferences. Finally, for the Thin shell QDs, the additional presence of ZnS in the outer shell further modulates the signal. As expected, the Thin shell QDs, which contain an additional ZnS shell compared to the Gradient shell, show a higher coordination number for S atoms (3.0 S and 1.4 Se, compared to 2.6 S and 1.5 Se atoms, Table S2). Although the cores of the QDs are expected to contain some Zn, no Zn-P contributions were detected in the shell fitting procedure, which suggests that the fraction of Zn present in the core is negligible compared to Zn present in the shell. Finally, the speciation of Se was studied in the pristine QDs. The signal was dominated by a first layer of four Zn atoms at 2.46 Å, similar as in ZnSe (Figure S3, Table S3). Contributions of further layers were very weak compared to crystalline ZnSe, which is consistent with the presence of a disordered ( $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$ ) phase.

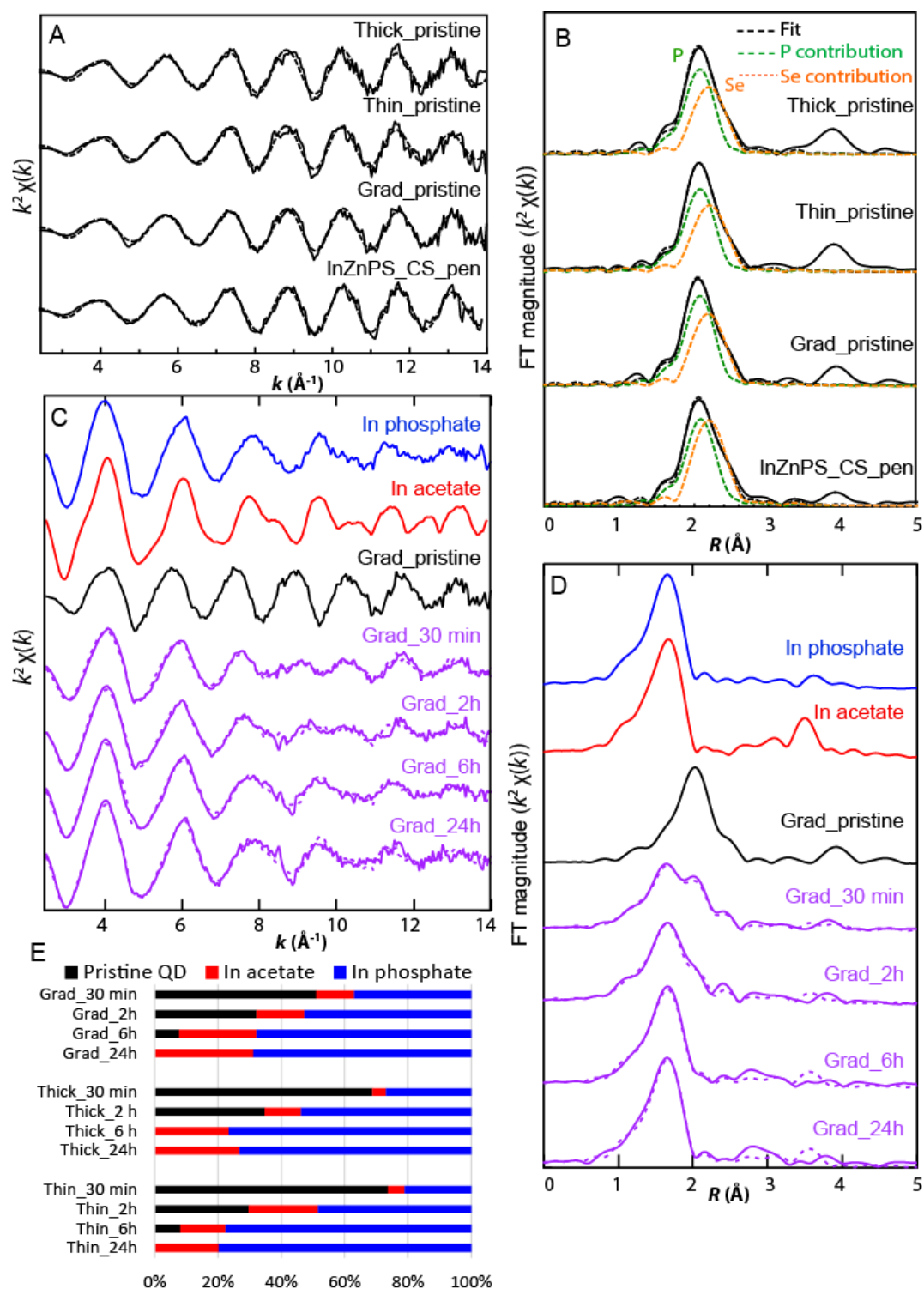
During degradation, drastic changes were observed on In, Zn and Se speciation. Concerning In, there was no change in the redox state (Figure S4), but a gradual loss of the In-P coordination in favour of a In-O coordination was observed, which was characterized by the appearance of a peak at  $R + \Delta R = 1.65$  Å in the Fourier-transformed spectra (Figure 5D and Figure S2). After 30 min of aging, the intensity of this peak was higher in the aged Gradient shell QD sample, compared to both aged Thin and Thick shell QDs. After 24 h of aging, the Fourier-transformed EXAFS spectra of all three QDs showed only this 1.7 Å peak and no more the 2 Å peak, proving complete degradation. The best fits obtained via linear combination fitting using indium acetate (as a proxy for indium carboxylate) and indium phosphate reference spectra showed the coexistence of both species in all aged samples (Figure 5E, Table S4). The ratio of indium phosphate to indium acetate increased with aging duration, with indium phosphate being always the major species. Therefore, upon degradation, In recombines with oxygenated ligands, probably provided by the PBS buffer in which they were aged (phosphate), and possibly with phosphate resulting from the oxidation of indium phosphide (however, the speciation of P was not studied, so this cannot be verified), and with carboxylates. The latter likely originate from the penicillamine surface ligands, although the contribution of environmental  $\text{CO}_2$  dissolved in water cannot be excluded either at this stage. Here again, the Thin and Thick QDs showed greater resistance to UV after 30 min than the Gradient shell QD.

The speciation of Zn also evolved during the aging process. For this element, only Gradient and Thin shell QDs were studied. The two types of QDs showed similar behaviours,

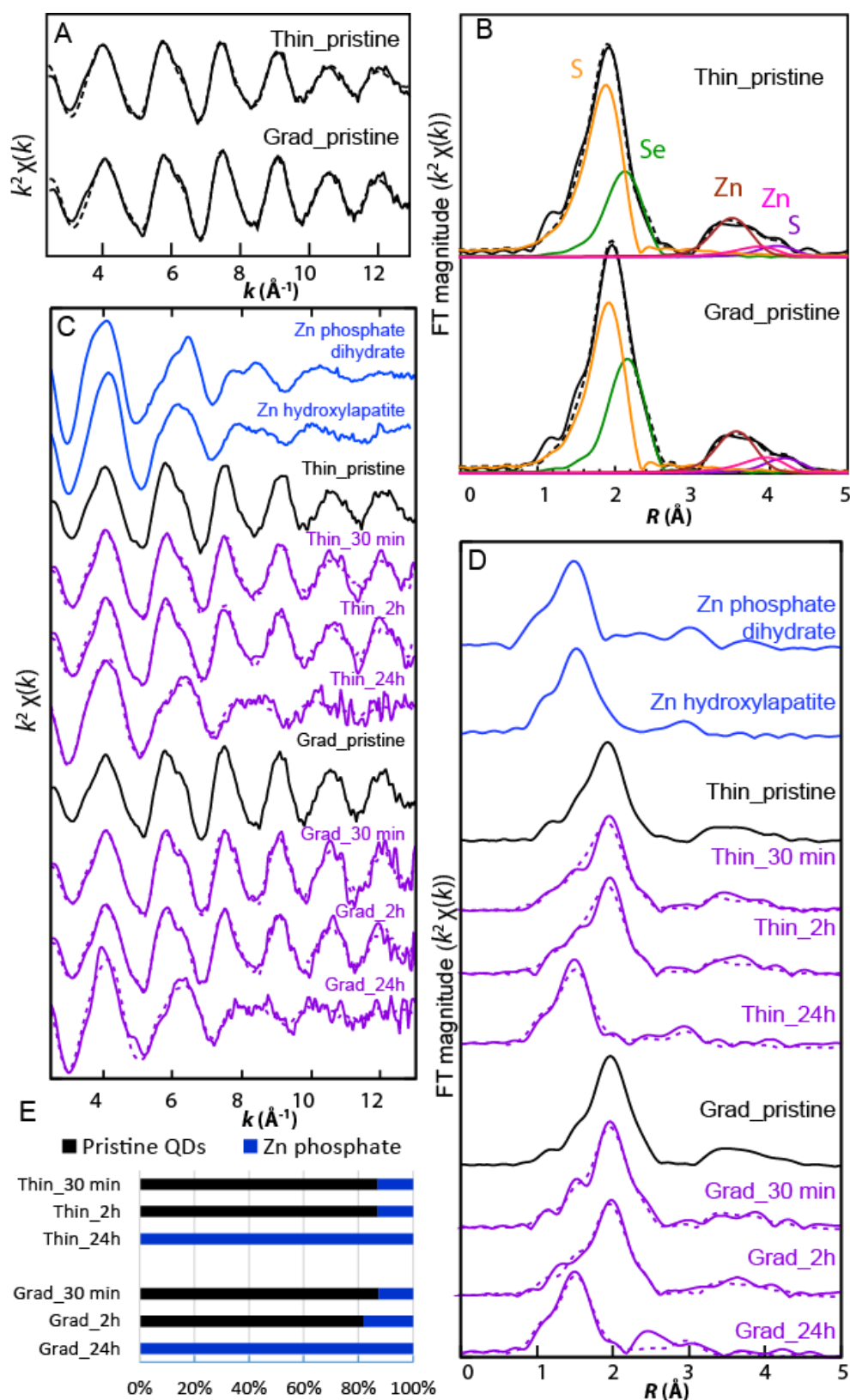
with the formation of minor amounts of Zn phosphate (10 to 20% of total Zn) after 30 min and 2 h, and a complete transformation of the initial ZnS and Zn(S,Se) into Zn phosphate after 24 h. Again, phosphate may originate from the used PBS buffer, and possibly from the oxidation of InP.

Finally, the chemical speciation and the redox state of Se also changed during the aging process. For this element, both XANES and EXAFS spectra were analysed since XANES is particularly sensitive to redox changes. For the Thick and Thin QDs after 24 h aging, only the XANES part was analysed because radiation damage occurred during the longer acquisition time required for EXAFS. In any case, XANES and EXAFS results were consistent (Figure 7D, E and Table S6). At 6 h and 24 h of aging, XANES analysis showed that Se was oxidized to Se(0), and selenite (Se(IV)) to a minor extent. For aged samples at 24 h, the Gradient shell QDs still contained a minor fraction of reduced Se (22 to 39% of total Se, based on XANES and EXAFS LCFs, respectively) and the rest was mostly Se(0), whereas in Thin and Thick shell QDs Se was totally oxidized, and contained about 70% Se(0) and 30% Se(IV).

Based on these results concerning the speciation of the three elements present in the QDs, a scenario of weathering processes during UV aging can be proposed (Figure 8). In the pristine QDs, In is present as indium phosphide (InP) in the core, and as a mixed layer In(P, S) at the core-shell boundary. Zn is bound to S and Se in the  $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$  phases of the gradient shell and to S in the ZnS phase of the thin or thick shell, in tetrahedral configuration in all phases. Se is bound exclusively to Zn of the gradient shell. Upon simulated solar light exposure in colloidal aqueous solution, some dissolution, oxidation, precipitation and complexation processes occur. The chemical transformation of the core constituents occurs faster than that of the shell elements, since after only 30 min, about half of In has been transformed into In phosphate and indium carboxylate, favoured by the high oxophilicity of  $\text{In}^{3+}$  ions. The formation of Se and Zn secondary products occurs mainly after 6 h and 24 h, respectively. The comparison of the three types of QDs showed similar behaviours and no clear difference in terms of stability during simulated solar light.

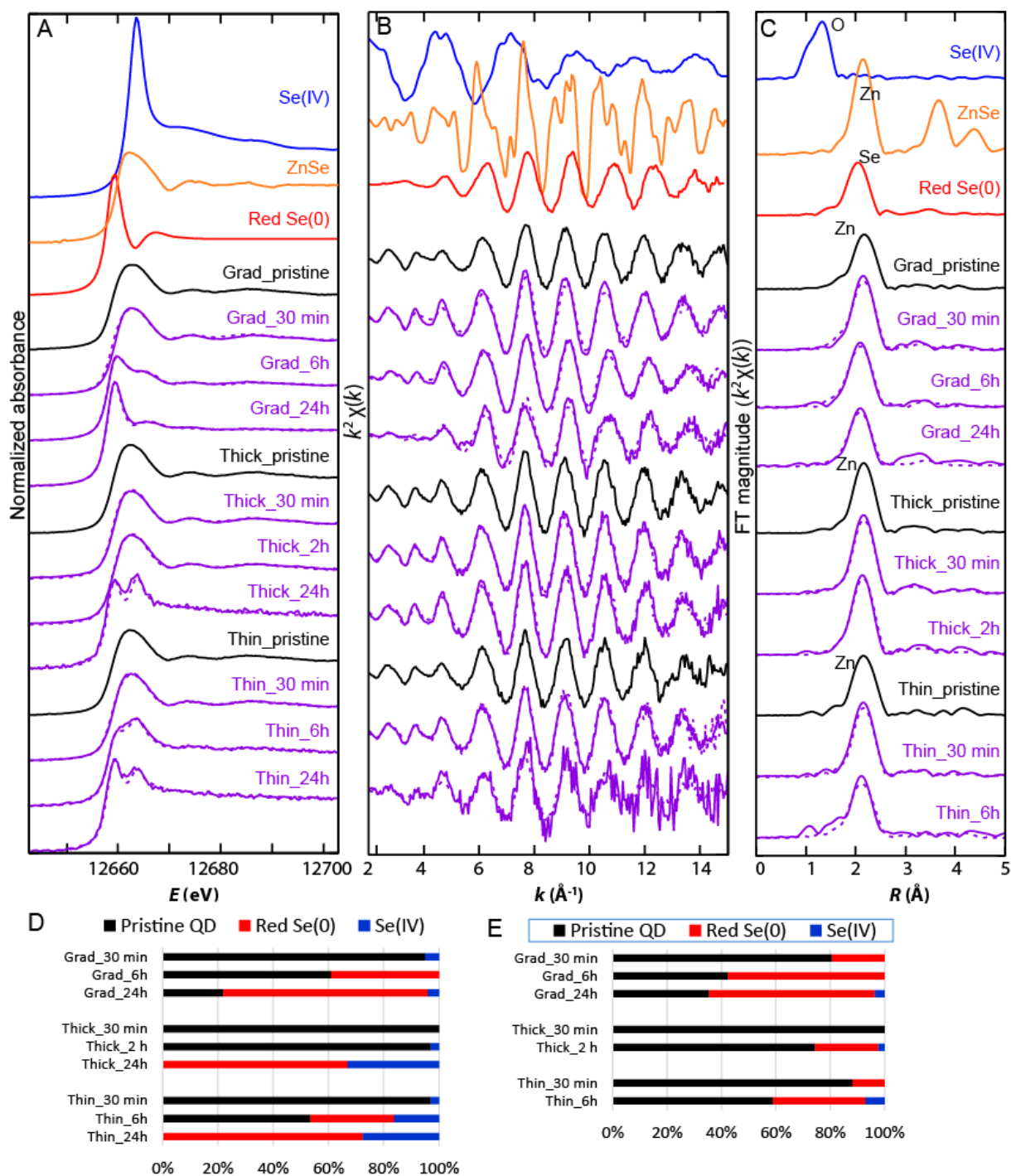


**Fig. 5.** In K-edge EXAFS results. EXAFS (A) and Fourier transformed (B) spectra for the pristine QDs from this study, for the InZnPS\_CS\_pen pristine QDs from Tarantini et al. (2019), and first shell fits (dashed lines, structural parameters given Table S1). EXAFS (C) and Fourier transformed (D) spectra for the Gradient shell QDs at different UV aging exposure times, and LCFs (dashed lines). E, percentage of In species determined by LCFs for the aged QDs (LCFs for Thin and Thick shell QDs in Figure S2).

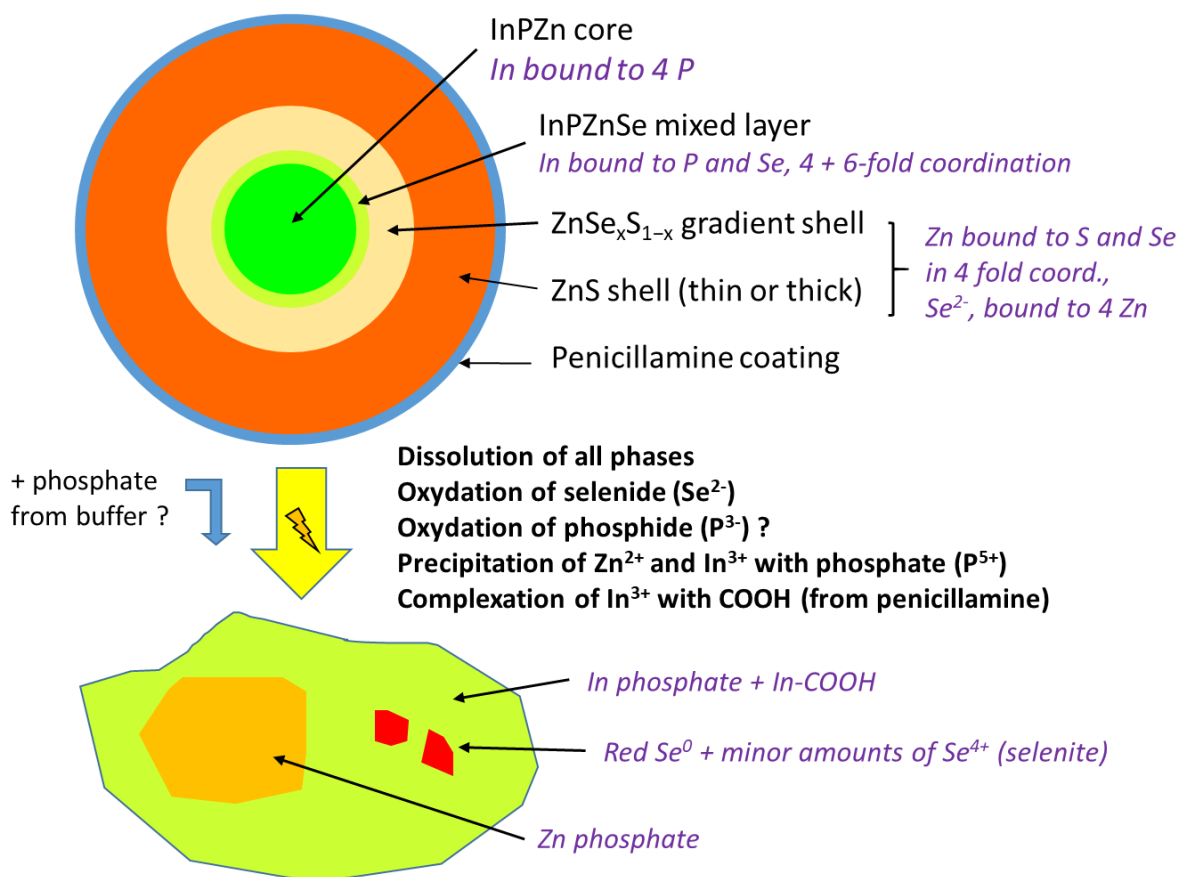


**Fig. 6.** Zn K-edge EXAFS results. EXAFS (A) and Fourier transformed (B) spectra for the pristine QDs, and shell fits (dashed lines, structural parameters given Table S2). EXAFS (C) and Fourier transformed (D) spectra for the QDs at different UV aging exposure times, and LCFs (dashed lines). E, percentage of Zn species determined by LCFs for the aged QDs (Table S5).





**Fig. 7.** Se K-edge XANES and EXAFS results. XANES (A), EXAFS (B) and Fourier transformed (C) spectra for the pristine and aged QDs, and LCFs using the pristine QDs, red Se(0) and Na selenite as components (dashed lines, structural parameters given Table S3). D, E: Percentage of Se species determined by LCFs on the XANES (D) and EXAFS (E) spectra (Table S6).



**Fig. 8.** Proposed scheme of the processes taking place during accelerated aging under simulated solar irradiation.

## Conclusion

The present study increases knowledge about QDs aging as well as their degradation mechanisms. It demonstrates that a careful shell design could increase the nanocrystals photostability, particularly in the presence of a thick double shell. However, results show that physico-chemical transformations of QDs occurred for the three kinds of QDs during aging under simulated sunlight irradiation. Thus, the double shell protects the QDs, which are more stable and more resistant than single shell QDs, but does not completely prevent them from degrading. The QDs developed in our laboratory are nevertheless more and more resistant to photodegradation. New formulations, where a surface layer of alumina is added, seem very promising to further resist photodegradation and avoid degradation of QDs in environment follow by the release of toxic compounds and contaminated food cycle.

## Acknowledgements

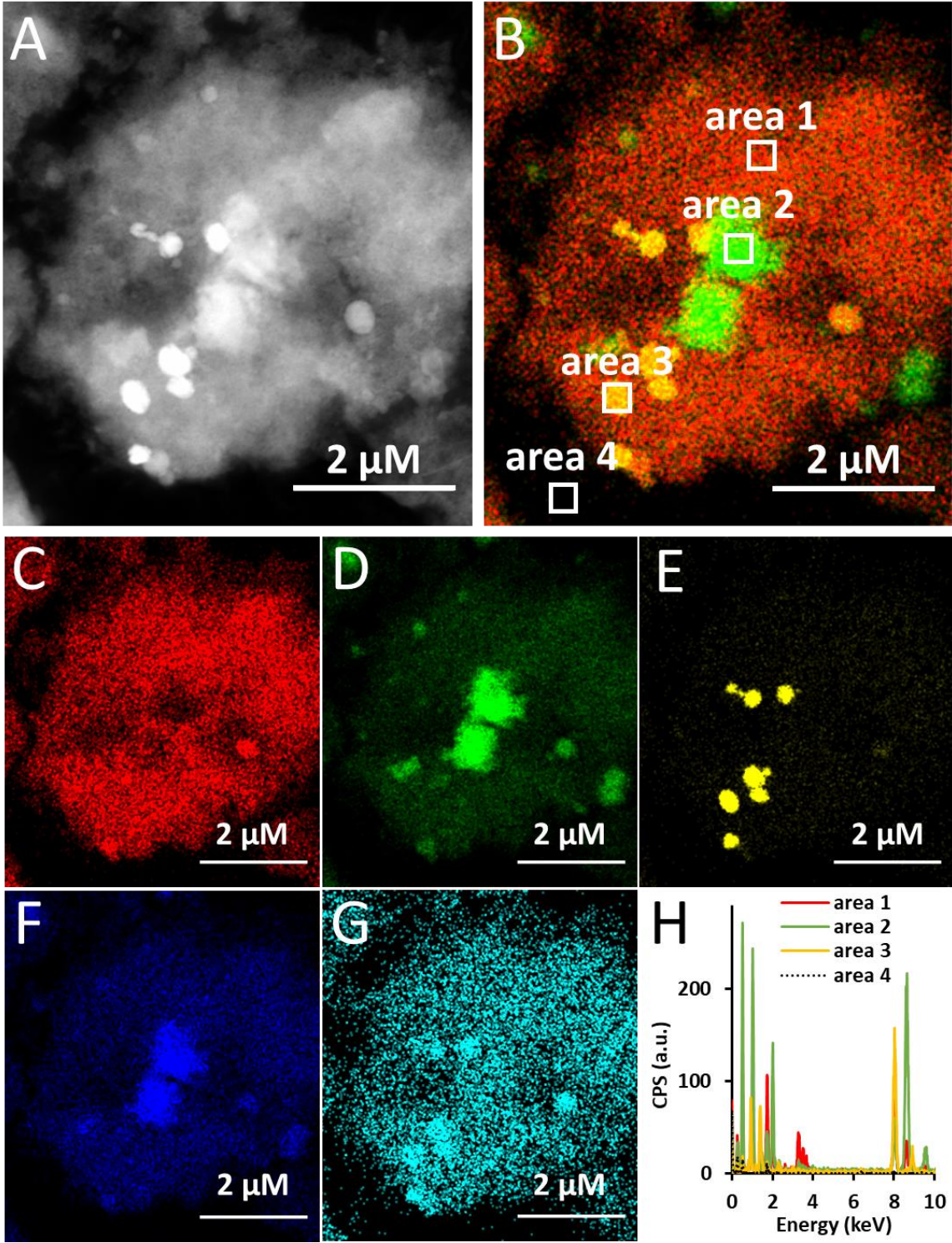
This work is a contribution to the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) funded by the French Government's "Investissements d'Avenir" ANR program, through the A\*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). It was supported by Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA) and the French Environment and Energy Management Agency (ADEME). P.R. acknowledges financial support from ANR (grants NEUTRINOS, ANR-16-CE09-0015-03 and FLUO, ANR-18-CE09-0039-01). The authors thank E. Omnes and S. Mottellier for their help on QSUN devices for QDs aging, and C. Saint-Pierre for help with PL and UV-vis measurements during aging.

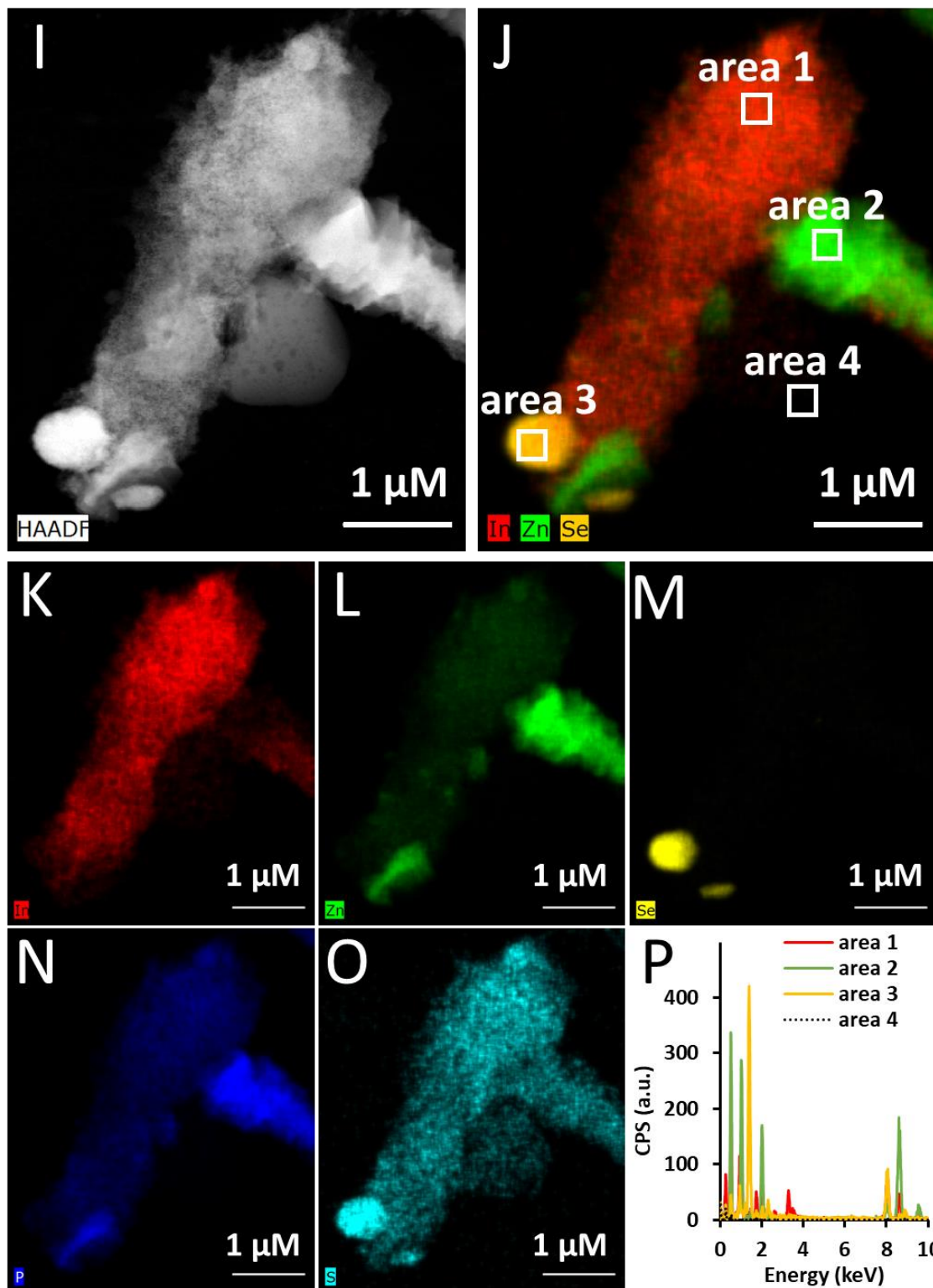
## References

- Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengo, R., Galeone, A., Malvindi, M.A., Vecchio, G., Cingolani, R., Nadeau, J.L., Pompa, P.P., 2013. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. *Nanoscale* 5, 307–317. <https://doi.org/10.1039/C2NR33024E>
- Cho, D.-Y., Xi, L., Boothroyd, C., Kardynal, B., Lam, Y.M., 2016. The role of ion exchange in the passivation of In(Zn)P nanocrystals with ZnS. *Scientific Reports* 6, 22818. <https://doi.org/10.1038/srep22818>
- Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N., 2004. Probing the Cytotoxicity Of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett* 4, 11–18. <https://doi.org/10.1021/nl0347334>
- Huang, K., Demadrille, R., Silly, M.G., Sirotti, F., Reiss, P., Renault, O., 2010. Internal Structure of InP/ZnS Nanocrystals Unraveled by High-Resolution Soft X-ray Photoelectron Spectroscopy. *ACS Nano* 4, 4799–4805. <https://doi.org/10.1021/nn100581t>
- Kraegeloh, A., Suarez-Merino, B., Sluijters, T., Micheletti, C., 2018. Implementation of Safety-by-Design for Nanomaterial Development and Safe Innovation: Why We Need a Comprehensive Approach. *Nanomaterials (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/nano8040239>
- Lee, S.F., Osborne, M.A., 2009. Brightening, Blinking, Bluing and Bleaching in the Life of a Quantum Dot: Friend or Foe? *ChemPhysChem* 10, 2174–2191. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900200>
- Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V.L., Alvarez, P.J., 2008. Quantum Dot Weathering Results in Microbial Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9424–9430. <https://doi.org/10.1021/es8023385>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 14, 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Proux, O., Biquard, X., Lahera, E., Menthonnex, J.-J., Prat, A., Ulrich, O., Soldo, Y., Trévisson, P., Kapoujyan, G., Perroux, G., Taunier, P., Grand, D., Jeantet, P., Deleglise, M., Roux, J.-P., Hazemann, J.-L., 2005. FAME: a new beamline for x-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests. *Phys. Scr.* 2005, 970. <https://doi.org/10.1238/Physica.Topical.115a00970>
- Ramasamy, P., Kim, N., Kang, Y.-S., Ramirez, O., Lee, J.-S., 2017. Tunable, Bright, and Narrow-Band Luminescence from Colloidal Indium Phosphide Quantum Dots. *Chem. Mater.* 29, 6893–6899. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02204>

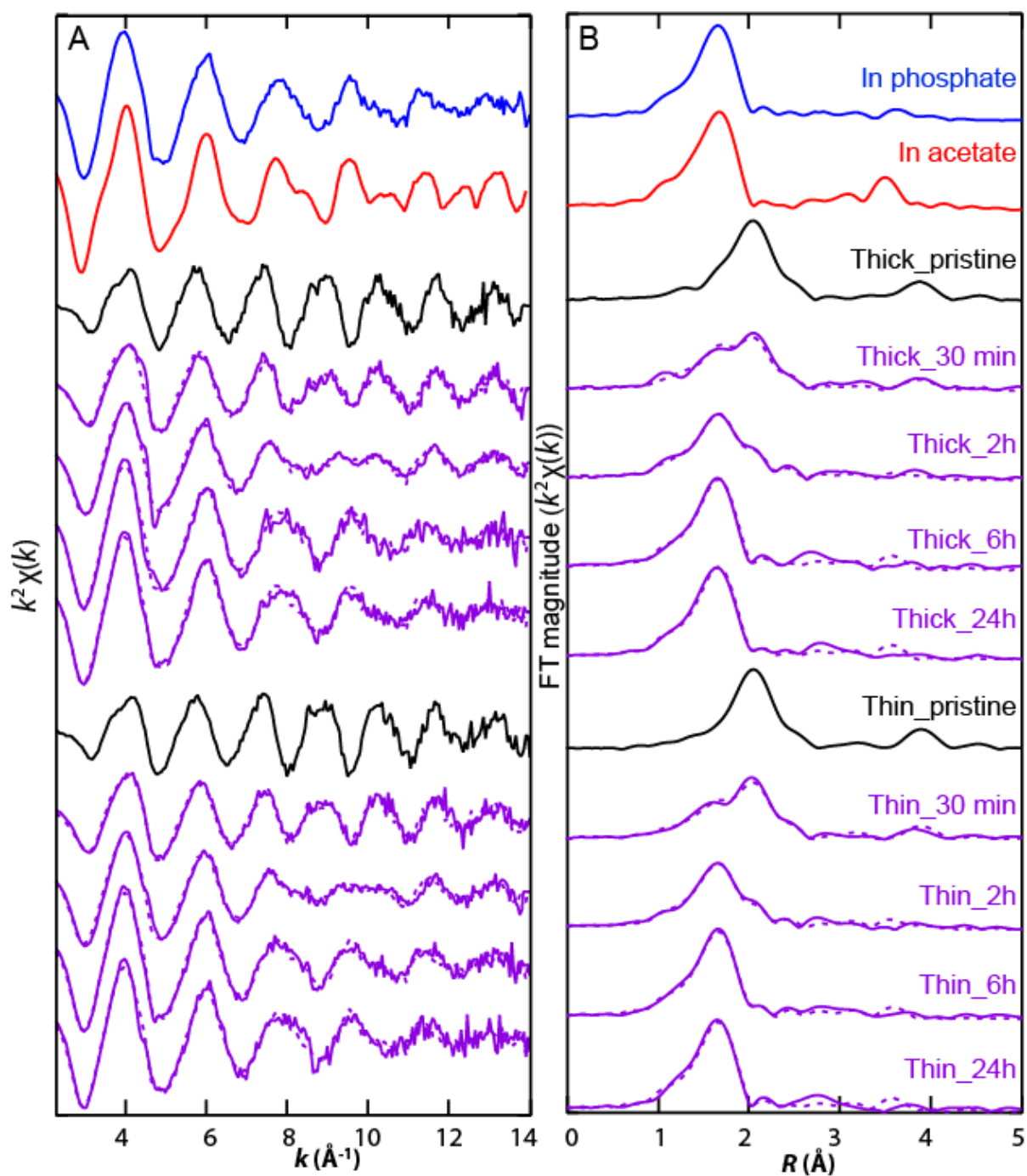
- Ravel, B., Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Radiat* 12, 537–541. <https://doi.org/10.1107/S0909049505012719>
- Reiss, P., Carrière, M., Lincheneau, C., Vaure, L., Tamang, S., 2016. Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials. *Chem. Rev.* 116, 10731–10819. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00116>
- Reiss, P., Protière, M., Li, L., 2009. Core/Shell Semiconductor Nanocrystals. *Small* 5, 154–168. <https://doi.org/10.1002/sml.200800841>
- Tamang, S., Beaune, G., Texier, I., Reiss, P., 2011. Aqueous Phase Transfer of InP/ZnS Nanocrystals Conserving Fluorescence and High Colloidal Stability. *ACS Nano* 5, 9392–9402. <https://doi.org/10.1021/nn203598c>
- Tarantini, A., Wegner, K.D., Dussert, F., Sarret, G., Beal, D., Mattera, L., Lincheneau, C., Proux, O., Truffier-Boutry, D., Moriscot, C., Gallet, B., Jouneau, P.-H., Reiss, P., Carrière, M., 2019. Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation. *NanoImpact* 14, 100168. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100168>
- Toufanian, R., Piryatinski, A., Mahler, A.H., Iyer, R., Hollingsworth, J.A., Dennis, A.M., 2018. Bandgap Engineering of Indium Phosphide-Based Core/Shell Heterostructures Through Shell Composition and Thickness. *Front Chem* 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00567>
- Wegner, K.D., Dussert, F., Truffier-Boutry, D., Benayad, A., Beal, D., Mattera, L., Ling, W.L., Carrière, M., Reiss, P., 2019. Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity. *Front. Chem.* 7, 466. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00466>
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Eds.), 2006. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press, Lyon, France : Geneva, Switzerland.
- Wyckoff, R.W.G., 1963. *Crystal Structure*, Second edition. 1. New York Interscience Publishers, pp. 85-237.

Supplementary data





**Fig. S1.** Structural characterization of aged Gradient and Thin shell QDs by STEM-EDX analysis. STEM imaging of Gradient shell QDs (A) and Thin shell QDs (I) follow by EDX analysis imaging (B-H, for Gradient shell QDs) and (J-P, for Thin shell QDs). B and J imaging are reconstructions of the distribution of In (represented in C and K), Zn (represented in D and L) and Se (represented in E and M) in the sample. Distributions of P (F and N) and S (G and O) in the sample are also represented, and H-P graphs represents EDX spectra of areas 1, 2, 3 and 4 shown in B and J imaging.



**Fig. S2.** In K-edge EXAFS (C) and Fourier transformed (D) spectra for the Thick and Thin QDs after different times of UV exposure, and LCFs (dashed lines).

**Table S1.** First shell structural parameters for In atoms in the pristine QDs.

	Atom	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R factor
Grad	P	2.53	4.2	0.0040	0.002
	Se	2.56	1.8	0.0040	
Thin	P	2.53	4.1	0.0046	0.003
	Se	2.57	1.9	0.0046	
Thick	P	2.53	4.2	0.0044	0.005
	Se	2.56	1.3	0.0044	
InZnPS_CS_pen	P	2.53	4.0	0.0037	0.004
	Se	2.55	2.0	0.0037	

N: number of atoms, R: interatomic distance,  $\sigma^2$ : Debye-Waller factor, R factor: residual between fit and experiment. K range of the fit: 3.4-12.9 Å<sup>-1</sup>, R range: 1.2-2.7 Å. In-P and In-Se paths were calculated using FEFF code, based on the structure of InP and InSe.

**Table S2.** Structural parameters for Zn atoms in the pristine QDs

	S shell			Se shell			Zn shell			Zn shell			S shell			R factor
	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	
Grad	2.34	2.6	0.0052	2.46	1.5	0.0052	3.88	4.3	0.0120	4.47	2.0	0.0120	4.46	2.6	0.0120	0.0079
Thin	2.33	3.0	0.0068	2.44	1.4	0.0068	3.85	4.0	0.0120	4.40	1.5	0.0120	4.40	1.7	0.0120	0.0134

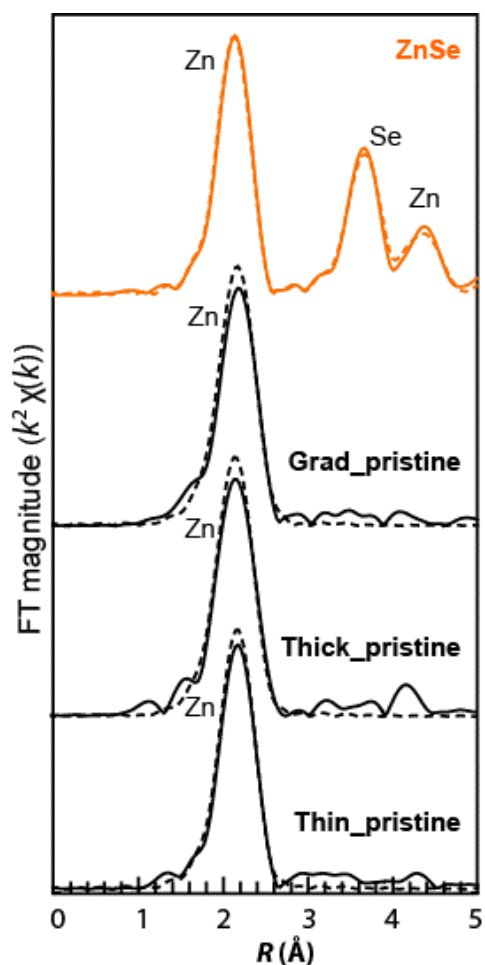
N: number of atoms, R: interatomic distance,  $\sigma^2$ : Debye-Waller factor, R factor: residual between fit and experiment. K range of the fits: 3.6-12.5 Å<sup>-1</sup>, R range: 1.0-4.5 Å. Paths were calculated using FEFF code, based on the structure of ZnS (4 S atoms at 2.34 Å, 12 Zn atoms at 3.82 Å, 12 S atoms at 4.48 Å) and ZnSe (4 Se atoms at 4.49 Å, 12 Zn atoms at 4.06 Å, 10 Se atoms at 4.75 Å).

**Table S3.** Structural parameters for Se atoms in the pristine QDs (first shell only) and for ZnSe (three shells).

	Atom	R (Å)	N	$\sigma^2(\text{Å}^2)$	R factor
Grad_pristine	Zn	2.46	4.0	0.0040	0.009
Thin_pristine	Zn	2.46	4.0	0.0041	0.030
Thick_pristine	Zn	2.46	4.0	0.0048	0.051

N: number of atoms, R: interatomic distance,  $\sigma^2$ : Debye-Waller factor, R factor: residual between fit and experiment. K range of the fit: 4.3-14.3 Å<sup>-1</sup>, R range: 1.3-2.7 Å. Se-Zn path was calculated using FEFF code, based on the structure of ZnSe (4 Zn atoms at 2.45 Å, 12 Se atoms at 4.00 Å, 12 Zn atoms at 4.70 Å).



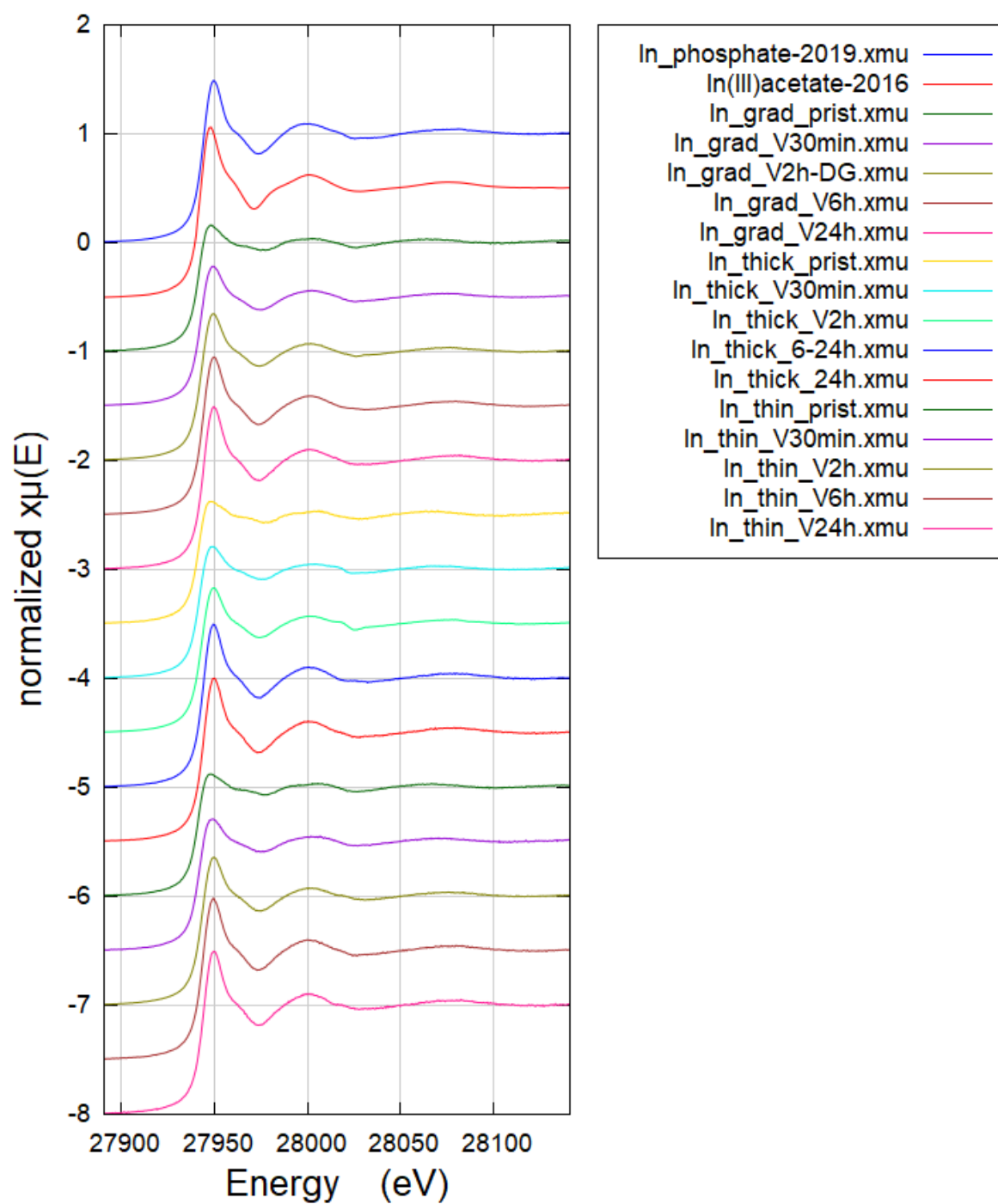


**Fig. S3.** Fourier transformed Se K-edge EXAFS spectra for the pristine QDs and ZnSe

**Table S4.** Results of the linear combination fits of the In K-edge EXAFS spectra for the aged QDs

	In species (molar %)			Sum	R factor
	Corresponding pristine QDs	In acetate	In phosphate		
Thin_24h	0	19	75	94	0.047
Thin_6h	8	14	76	98	0.025
Thin_2h	27	20	44	91	0.041
Thin_30 min	70	5	20	95	0.062
Thick_24h	0	26	71	97	0.030
Thick_6 h	0	22	72	94	0.047
Thick_2 h	33	11	51	95	0.039
Thick_30 min	64	4	25	93	0.071
Grad_24h	0	29	64	93	0.038
Grad_6h	7	22	61	90	0.031
Grad_2h	30	14	49	93	0.042
Grad_30 min	47	11	34	92	0.039

R factor: residual between fit and experiment.



**Fig. S4.** In K-edge XANES spectra for the pristine and aged QDs.

**Table S5.** Results of the linear combination fits of the Zn K-edge EXAFS spectra for the aged QDs

	Zn species (molar %)			R factor
	Corresponding pristine QDs	Zn phosphate	Sum	
Thin_24h	0	102	102	0.046
Thin_2h	88	13	101	0.060
Thin_30 min	88	13	101	0.053
Grad_24h	0	106	106	0.085
Grad_2h	81	18	99	0.056
Grad_30 min	91	13	104	0.067

R factor: residual between fit and experiment.

**Table S6.** Results of the linear combination fits of the Se K-edge XANES and EXAFS spectra for the aged QDs

		Se species (molar %)			Sum	R factor
		Pristine QD	Red Se(0)	Se(IV)		
Thin_24h	XANES		71	27	98	0.00460
Thin_6h	XANES	53	30	16	99	0.00260
	EXAFS	59	34	7	100	0.367
Thin_30 min	XANES	97		3	100	0.00094
	EXAFS	98	13		111	0.05900
Thick_24h	XANES		67	33	100	0.00900
Thick_2 h	XANES	97		3	100	0.00120
	EXAFS	96	30	3	129	0.060
Thick_30 min	XANES	99			99	0.00120
	EXAFS	100			100	0.043
Grad_24h	XANES	22	74	4	100	0.00060
	EXAFS	39	67	4	110	0.155
Grad_6h	XANES	61	39		100	0.00038
	EXAFS	42	58		100	0.049
Grad_30 min	XANES	94		5	99	0.00106
	EXAFS	100	24		124	0.087

R factor: residual between fit and experiment.

### 3. Conclusion

Dans cette première partie, de nombreuses transformations physico-chimique des QDs d'InP en phase aqueuse sont mises en évidence au cours du vieillissement solaire effectué en enceinte climatique.

Avant vieillissement, les propriétés physiques des trois types de QDs sont relativement similaires, avec un pic excitonique proche de 520 nm en UV-vis et un pic d'émission maximale à 560-570 nm en PL (un léger décalage vers le bleu ou *blue shift* est observable lorsque la coquille de ZnS s'épaissit, en raison de l'augmentation du désaccord de maille). Cependant, le QD Thick shell possède une fluorescence nettement supérieure aux deux autres types de QDs, ce qui fait de lui un bon candidat dans l'approche « *safer by design* » des QDs. En effet, une fluorescence plus élevée signifie que pour une même application, la concentration des QDs pourra être diminuée, ce qui peut participer à réduire leur toxicité.

Au cours du vieillissement, les QDs se dégradent entraînant simultanément une précipitation de la solution colloïdale et une baisse de la fluorescence. Différentes étapes de vieillissement sont observées, plus ou moins rapidement selon le type de QD. Tout d'abord, la solution colloïdale (orange et fluorescente) précipite car le ligand, qui maintient les QDs en suspension, se dégrade. Le précipité formé (orange et fluorescent), s'éclaircit progressivement pour devenir jaune pâle et perd conjointement sa fluorescence, ce qui signifie que la structure chimique des QDs se dégrade. Enfin, le précipité devient rose-cuivré puis gris, probablement à cause de l'oxydation des éléments avec l'air. Il est à noter que le vieillissement est ralenti par la présence d'une double coquille sur les QDs en comparaison aux simple coquille, et que l'effet est d'autant plus marqué pour la double coquille épaisse. Une fois encore, les QDs Thick shell semblent être de bons candidats dans l'approche « *safer by design* » des QDs, avec une meilleure photostabilité face aux irradiations solaires. Pour aller plus loin, les transformations chimiques ont été caractérisées et montrent qu'au cours du vieillissement, les QDs perdent totalement leur structure. Le cœur cristallin composé d'InZnP se dissout totalement et libère progressivement des ions  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Le sélénium de la coquille (Se(-II)), quant à lui, s'oxyde pour former du sélénium élémentaire rouge (Se(0)) et du sélénite (Se(IV)).

Ces résultats montrent que, bien qu'elle soit meilleure que les précédentes formulations, cette conception de QDs double coquille améliore la résistance des QDs d'InP face à la photodégradation mais n'évite pas leur dégradation à long terme ainsi que la libération d'éléments potentiellement toxiques.



## **Chapitre 4 :**

*Développement et optimisation  
de méthodes de criblage à  
moyen et haut débit des effets  
cytotoxiques et génotoxiques*



Une partie de ces travaux de recherche consistait au développement de nouvelles méthodes de criblage des effets toxiques des nanomatériaux. Celles-ci ont été développées sur une plateforme HCS (*high content screening*), récemment acquise au laboratoire (modèle CellInsight CX5, Thermo Fisher Scientific). Pour rappel, il s'agit d'une plateforme d'imagerie à fluorescence automatisée permettant l'analyse qualitative et quantitative de la fluorescence dans des cellules (cf. chapitre 2). Les tests optimisés lors de ces travaux sont les suivants : test de marquage au Hoechst 33342 et décompte des noyaux cellulaires (test de cytotoxicité), test d'immunomarquage du 53BP1 (marqueur des cassures double-brin de l'ADN, donc test de génotoxicité), test du micronoyau (marqueur de lésions chromosomiques, donc test de génotoxicité), test CellROX (marqueur du stress oxydant). Le développement de méthodes analytiques nécessitant de nombreux essais sur un matériel biologique dont la réponse ne varie pas d'un passage à l'autre, nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, deux lignées cellulaires pour optimiser ces essais. Nous avons ainsi utilisé une lignée cellulaire, représentative d'une exposition aux nanomatériaux par inhalation (lignée A549) et une autre représentative d'une exposition aux nanomatériaux par ingestion (lignée HCT116). Les méthodes ainsi développées ont ensuite été appliquées et optimisées sur les kératinocytes primaires humains (HKPM) qui sont l'objet principal de cette étude. Dans un premier temps, des produits chimiques représentant de bons contrôles positifs pour chacun de ces tests ont été recherchés, puis leur concentration a été optimisée sur chacun des trois types cellulaires. L'idée étant de développer des méthodes à moyen et haut débit, ces tests ont ensuite été appliqués sur les différents types cellulaires, à partir d'une banque de nanomatériaux dont nous disposons au laboratoire et provenant de partenaires du LabEx SERENADE. Dans ce chapitre, chacune de ces méthodes est illustrée par les résultats obtenus avec les nanoparticules développées dans le projet SafeTiPaint. Les résultats concernant le projet SAQUADO sont présentés dans le chapitre 5 (sur les kératinocytes exposés aux QDs).

Le projet SafeTiPaint, en collaboration avec le partenaire industriel ALLIOS, repose sur l'éco-conception de peintures photocatalytiques à base de nanoparticules de dioxyde de titane, dans le cadre d'une approche « *safer by design* ». Différentes matrices minérales de peintures, appelées également « *slurries* », ont été testées dans le cadre du projet. Dans les diverses peintures, le TiO<sub>2</sub> nanoparticulaire est retrouvé sous forme libre dans la matrice (PC500), greffé sur des nanocristaux ou nanofibrilles de cellulose (respectivement CNC et NFC) avec différents niveaux de dopage (58, 77 et sans dopage), ou fonctionnalisé en surface avec des ligands comme le polyéthylène glycol (PEG), un dérivé de la dopamine (DOPA) et de l'acide polyacrylique



(PAA). Parmi les *slurries* de peintures testées au début de ce projet, aucun n'a mis en évidence de potentiel effet cytotoxique sur les cellules pulmonaires et intestinales. Dans la deuxième partie du projet, trois peintures ont donc été sélectionnées en raison de leur activité photocatalytique, de leur coût et de leur stabilité (résistance à l'abrasion). Ainsi, les peintures qui ont été retenues sont les PC500, PEG et CNC. Elles ont été étalées sur des supports puis vieilles (par l'équipe du LITEN sur la plateforme NanoSécurité au CEA de Grenoble) dans des enceintes climatiques Q-UV pour mimer des vieillissements en intérieur et Q-SUN pour mimer des vieillissements en extérieur (températures, humidité, ...). Après vieillissement, les supports ont été récupérés et les peintures grattées de manière à obtenir des résidus d'abrasion sous forme de poudres très fines, dont la toxicité a également été testée.

## 1. Comptage des noyaux au Hoechst 33342

La plateforme CellInsight permet d'analyser des cellules ensemencées et traitées dans des plaques 96 puits. Ainsi, chaque puits peut être utilisé comme une condition de traitement, ce qui permet de tester de nombreuses conditions sur une même expérience. D'autre part, si l'on utilise des marqueurs spécifiques de différents dommages cellulaires et émettant de la fluorescence à des longueurs d'onde différentes, le CellInsight permet de multiplexer les mesures. On peut ainsi sur une même plaque compter les noyaux cellulaires présents dans les puits (reflet de la viabilité cellulaire, et donc de la cytotoxicité d'un produit), la quantité d'espèces réactives de l'oxygène et les lésions de l'ADN. Les plaques 96 puits utilisées sont des plaques noires à fond plat et transparent, pour éviter que la fluorescence d'un puits interfère sur celle du puits voisin lors de l'analyse et parce que l'objectif du microscope automatisé est situé au-dessous de la plaque. Le Hoechst 33342 est un agent intercalant de l'ADN, qui fluoresce lorsqu'il est intercalé avec ce dernier, au même titre que le DAPI. Il possède l'avantage de pouvoir marquer des cellules vivantes ou fixées alors que le DAPI nécessite obligatoirement une étape de fixation. C'est un test rapide qui permet le décompte des noyaux en microscopie à fluorescence. Il peut servir de test de cytotoxicité puisque seules les cellules vivantes restent accrochées au support. En revanche, les cellules ayant subi trop de dommages se décrochent et sont éliminées au cours des différents rinçages. Ce test peut être utilisé en parallèle d'autres méthodes comme l'immunomarquage 53BP1 et le test des micronoyaux (cf. partie 2 et 3).

Cependant, pour que le système d'analyse puisse détecter et mesurer correctement la fluorescence, les cellules doivent être suffisamment isolées les unes des autres. A l'inverse, si

elles ne sont pas assez nombreuses, l'appareil aura du mal à les trouver et mettra beaucoup de temps à analyser. Pour chaque type de test, il convient donc de commencer par optimiser la densité des cellules dans la plaque au moment de l'analyse. Dans le cas du décompte des noyaux via le marquage Hoechst 33342, qui est effectué dans ces travaux 48 h après l'ensemencement, les différents essais ont montré que pour une lecture efficace, les ensemencements doivent être de 5 000 cellules/puits pour la lignée A549, 8 000 cellules/puits pour la lignée HCT116 et 10 000 cellules/puits pour les kératinocytes primaires (pour des kératinocytes ayant un temps de doublement d'environ 36 h).

La recherche d'un contrôle positif est la deuxième étape obligatoire pour confirmer l'efficacité d'un test en HCS. Pour les mesures de cytotoxicité au marquage Hoescht 33342, le contrôle positif utilisé est le même que pour le test de cytotoxicité colorimétrique WST-1 (cf. chapitre 2). Il s'agit des nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées en surface par des amines (PSNH<sub>2</sub>). Dans l'exemple ci-dessous (Figure 35), l'exposition des cellules A549 à différentes concentrations de PSNH<sub>2</sub> montrent des résultats similaires dans les deux tests utilisés. En effet, le test WST-1 (Figure 35A) révèle une diminution de la viabilité cellulaire lors d'expositions à des concentrations supérieures à 50 µg/mL de PSNH<sub>2</sub>, ce qui correspond à la perte d'adhérence des cellules à ces mêmes concentrations dans le test du marquage au Hoechst 33342 (Figure 35B). Dans les cellules exposées à 100 µg/mL PSNH<sub>2</sub>, on note 40 % de viabilité cellulaire dans le test WST1, contre aucun noyau restant dans la plaque dans le test Hoechst 33342. L'explication la plus probable est que la densité cellulaire est beaucoup plus faible dans le test Hoechst 33342, et de ce fait, les cellules sont plus sensibles au toxique. Etant donné que la cytotoxicité entraîne une perte des cellules, le CellInsight est en difficulté pour compter les quelques cellules restantes, ce qui augmente considérablement le temps d'analyse. Dans les tests suivants, les concentrations induisant la perte de plus de 50 % des cellules n'ont généralement pas été utilisées.

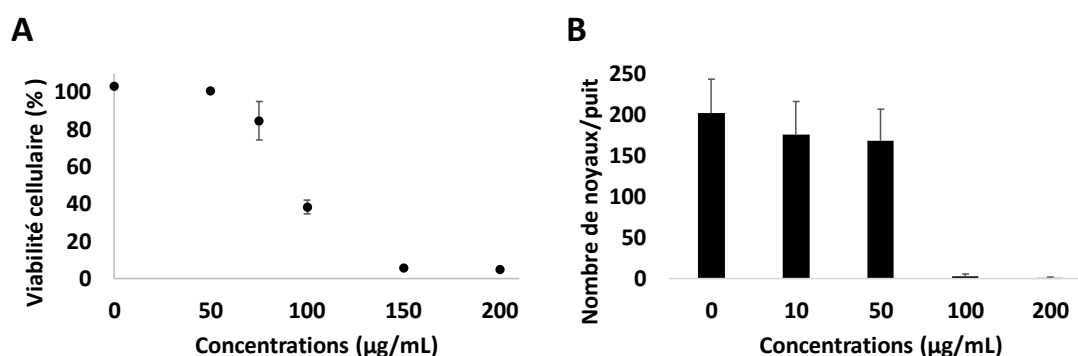


Figure 35 : Mesure de la cytotoxicité des nanoparticules PSNH<sub>2</sub> sur les cellules A549, via le test colorimétrique WST-1 (A) ainsi que le test du marquage fluorescent Hoechst 33342 en HCS (B).

Enfin, la dernière étape consiste en la vérification qu'il n'existe pas d'interférences entre les marqueurs fluorescents utilisés pour les tests en HCS et les différents composés testés, comme l'exposition aux QDs qui fluorescent également. Pour cela, une comparaison des spectres d'excitations et d'émissions des différents produits est effectuée afin de vérifier qu'ils ne se superposent pas (cf. chapitre 2).

## 2. Immunomarquage 53BP1

Pour rappel, ce test permet de marquer la protéine 53BP1 qui fait partie du complexe de réparation des cassures double-brin de l'ADN, recrutée directement sur le site de lésion (cf. chapitre 2). L'ensemencement des cellules est réalisé de la même manière que pour le marquage Hoechst 33342 puisque ce marquage est aussi effectué 48 h après l'ensemencement des cellules. La détection des foci de 53BP1 dans les noyaux des cellules par le CellInsight est illustrée dans la Figure 36. Les noyaux marqués au Hoechst 33342 (en bleu sur les photos), servent d'objets principaux pour la détection des foci. Ils sont entourés en vert s'ils sont validés, ou en orange s'ils sont rejetés par l'appareil, en fonction des paramètres sélectionnés comme la taille et la forme des noyaux (Figure 36B). Ensuite, au sein de noyaux validés, la présence de foci de 53BP1 est recherchée (spot vert, Figure 36A), et validée (en rouge, Figure 36B) s'ils correspondent aux paramètres enregistrés. Les paramètres de détection des foci sont optimisés en fonction de leur taille, leur forme et leur intensité de fluorescence. Pour l'analyse, l'appareil fait la moyenne du nombre de foci détectés par noyau.

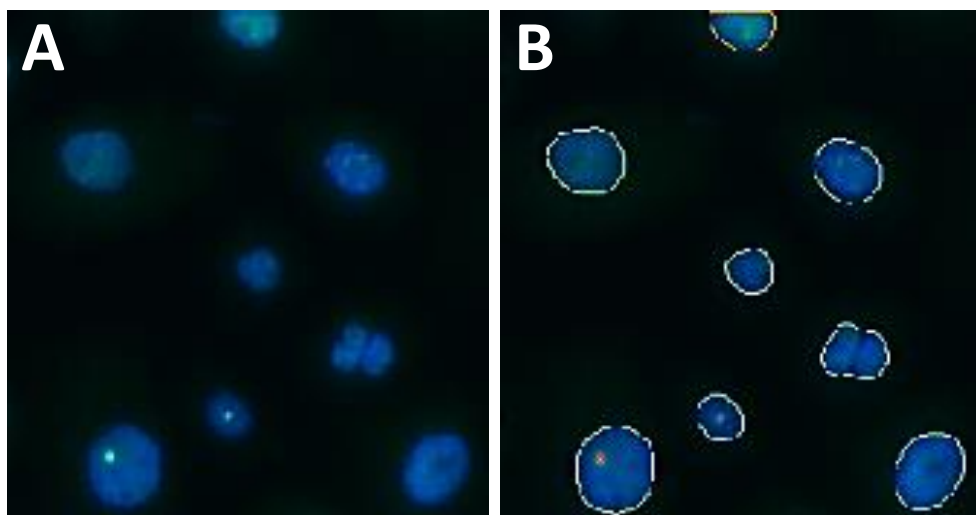


Figure 36 : Observation des foci de 53BP1 dans les noyaux des cellules en A, ainsi que les paramètres de détection par le CellInsight en B.

La première étape d'optimisation de ce test fût de mettre au point les bonnes concentrations d'anticorps primaire (Ac I) et secondaire (Ac II) pour obtenir un marquage suffisamment intense mais sans bruit de fond. Pour l'Ac II (Anti Rabbit IgG Atto 488, Sigma-Aldrich), la dilution testée puis validée est de 1/2 000. En revanche, les dilutions testées pour l'Ac I (Rabbit TP53BP1, Abnova) spécifique de la protéine 53BP1, sont de 1/500, 1/1 000 et 1/2 000. Une condition supplémentaire sans Ac I est réalisée pour tester la spécificité de l'Ac II sur ce dernier, afin de s'assurer qu'il ne se fixe que sur l'Ac I. Les résultats de ces expériences sont synthétisés dans la Figure 37. Les différentes dilutions en Ac I testées fonctionnent toutes et les images obtenues par le microscope sont similaires, avec peu de bruit de fond (Figure 37 A-C). Dans une optique d'utilisation raisonnable du produit, la dilution retenue pour l'Ac I est de 1/1 000. De plus, l'absence de foci dans la condition où l'Ac I n'a pas été ajouté prouve que l'Ac II fluorescent ne se fixe que sur l'Ac I (photo en haut à gauche de la Figure 37 et graph C).

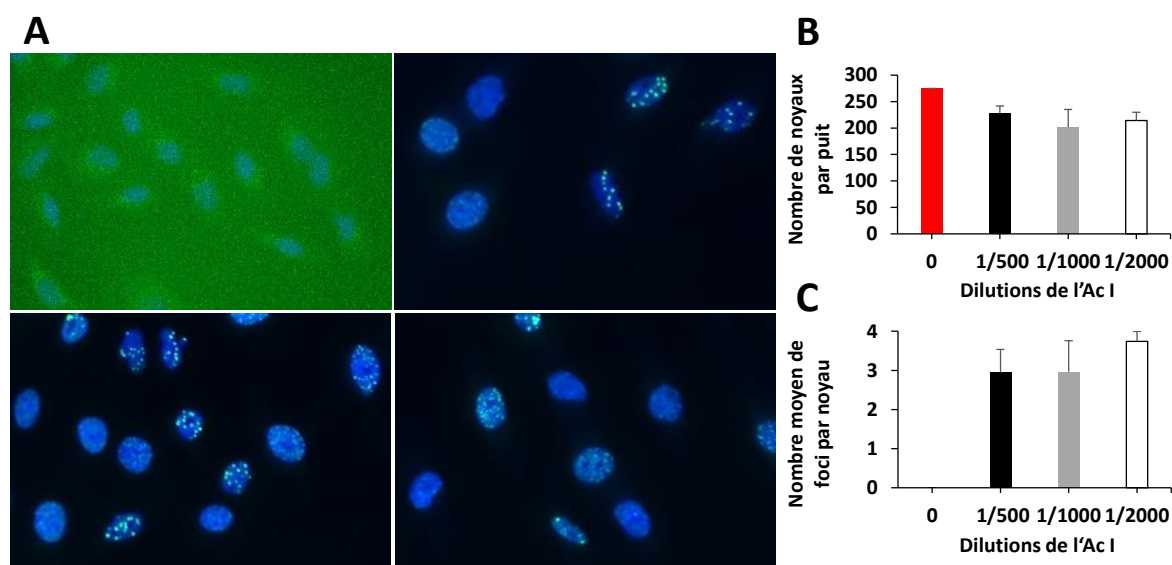


Figure 37 : Optimisation de la dilution de l'Ac I pour la mise au point du test 53BP1 en HCS sur des cellules A549. Marquages fluorescents permettant le décompte du nombre de noyaux via le marquage Hoechst 33342 (noyaux en bleu sur les photos de la figure A, quantifiés dans le graph B), ainsi que le nombre de foci moyen par noyau via l'immunomarquage 53BP1 (spots en vert sur les photos de la figure A, quantifiés dans le graph C).

Une fois ces tests mis au point, les essais sur les QDs ont révélé une interférence de fluorescence avec l'Ac II. L'anticorps a donc été remplacé par un autre, similaire mais couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge profond (Anti Rabbit IgG Atto 633, Sigma-Aldrich). La dilution utilisée est la même que précédemment, à savoir 1/1 000. Les résultats sont présentés dans le chapitre 5.

### **Criblage à haut débit sur les nanomatériaux issus du projet SafeTiPaint :**

Les résultats obtenus après optimisation de la méthode sont présentés dans la Figure 38. Ces résultats concernent les peintures vieilles présentées dans l'introduction du chapitre. Après réception de ces échantillons, les poudres sont dispersées dans de l'eau puis diluées dans le milieu de culture des cellules pulmonaires A549, avant d'exposer ces dernières durant 24 h à 50 µg/mL. Cette concentration a été choisie arbitrairement après qu'aucune cytotoxicité n'ait été mise en évidence sur une gamme de concentration allant de 6,25 à 100 µg/mL (Figure 39). Les concentrations plus élevées n'ont pas été testées pour éviter toute interférence entre les particules de titane et les tests biologiques [1]. Par ailleurs, un contrôle positif nanoparticulaire a été recherché. Or, il a été rapporté que l'oxyde de cobalt ( $\text{CoO}_3$ ) et l'oxyde de nickel ( $\text{NiO}$ ) à l'état nanoparticulaire ont des propriétés génotoxiques [2], [3]. Dans cette expérience, l'oxyde de nickel cobalt ( $\text{CoNiO}_2$ ) nanoparticulaire a été testé à 10 et 50 µg/mL (après avoir vérifié la cytotoxicité pour ces concentrations). Ce composé génère bien des cassures de l'ADN (Figure 38A) avec un effet plus marqué à 50 µg/mL. Cependant, l'effet reste beaucoup plus marqué avec l'étoposide à 100 µM. De plus, cet effet est retrouvé chez les cellules intestinales HCT116 exposées à 20 µg/mL, mais pas chez les kératinocytes primaires à 50 µg/mL. Donc, pour plus d'homogénéité entre les tests et dans le cadre de cette thèse reposant principalement sur les kératinocytes primaires, l'étoposide à 100 µM est conservé puisqu'il est un bon contrôle positif sur les trois lignées. Il est important de noter que les contrôles positifs étant cytotoxiques, ils entraînent généralement une diminution du nombre de noyaux dans les puits (Figure 38C). Il s'agit donc de trouver le bon compromis entre la concentration générant le plus de lésions et la concentration induisant le moins de cytotoxicité possible. Pour les différentes peintures, les résultats montrent que le nombre de noyaux dans les puits reste stable après exposition aux différents résidus (Figure 38D) et qu'aucune augmentation significative du nombre de cassures double-brin n'est observée après 24 h d'exposition (Figure 38B) en comparaison au contrôle dont la valeur est en moyenne de 0,09 foci par noyau (Figure 38A). En conclusion de ces résultats, les résidus d'abrasion de peintures ne semblent pas engendrer de cytotoxicité ni de génotoxicité.

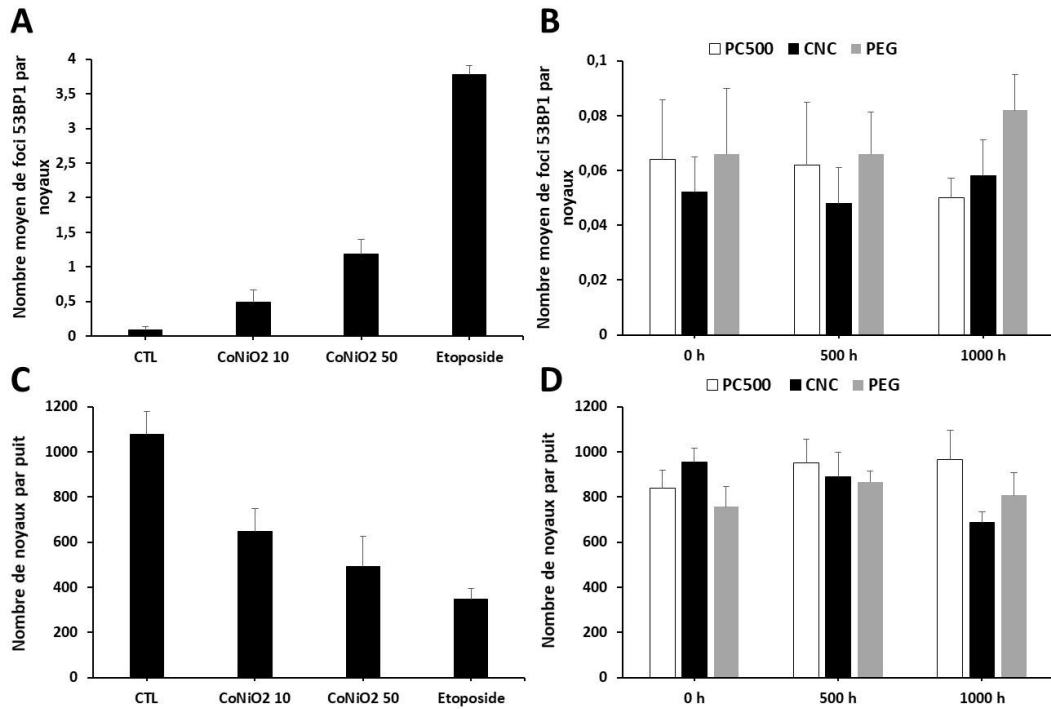


Figure 38 : Evaluation des cassures double-brin de l'ADN après exposition des cellules A549 pendant 24 h à des résidus d'abrasion de peintures non vieillis (0 h) ou préalablement vieillis en enceinte climatique pendant 500 h et 1000 h. Ces résultats sont issus de la méthode d'un immunomarquage 53BP1 (A-B) associée au décompte des noyaux par marquage au Hoechst 33342 (C-D). L'étoposide à 100  $\mu$ M et l'oxyde de nickel cobalt (CoNiO<sub>2</sub>) à 10 et 50  $\mu$ g/mL sont utilisés comme contrôle positif. PC500, PEG, CNC correspondent respectivement aux peintures avec le TiO<sub>2</sub> seul, fonctionnalisé en surface avec du polyéthylène glycol ou greffé sur des nanocristaux de cellulose.

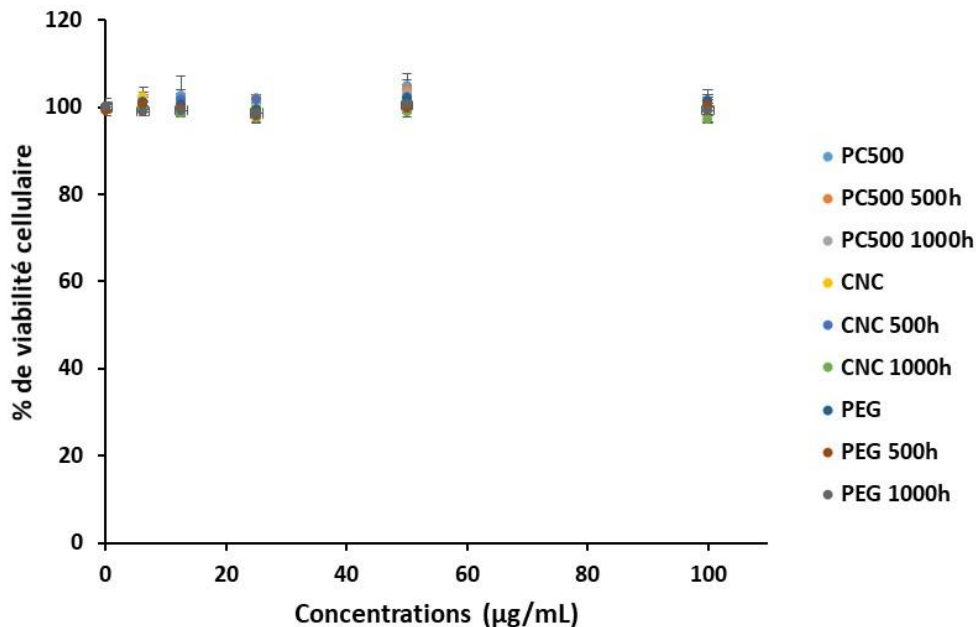


Figure 39 : Evaluation de la cytotoxicité des résidus de peintures non vieillis ou préalablement vieillis en enceinte climatique pendant 500 h et 1000 h après exposition des cellules A549 pendant 24 h. Ces résultats sont issus du test colorimétrique WST-1 et PSNH<sub>2</sub> à 100  $\mu$ g/mL est utilisé comme contrôle positif. Pour des raisons de clarté, ce contrôle n'est pas représenté sur la figure mais entraîne une mortalité cellulaire d'environ 70 %.

### 3. Test des micronoyaux

Ce test n'a pas été présenté dans le chapitre 2 puisqu'il a été difficile à mettre au point sur les lignées commerciales et que l'optimisation sur les kératinocytes primaires n'a pas été réussie. Il s'agit d'un test de génotoxicité mettant en évidence des cassures ou pertes de chromosomes induits par des agents génotoxiques après division cellulaire. Il se forme alors des micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Le protocole, adapté d'une ligne directrice de l'OCDE [4], consiste àensemencer des cellules à faible densité dans des plaques 96 puits noires à fond plat et transparent. Pour les cellules pulmonaires A549, la densité d'ensemencement est de 5 000 cellules/puits, pour les cellules intestinales HCT116, elle est de 2 500 cellules/puits et de 10 000 cellules/puits pour les kératinocytes. Après 24 h, les différentes expositions sont réalisées puis les cellules incubées 24 h supplémentaires à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Le contrôle positif utilisé peut être spécifique du type de lésion (aneugène, en cas de pertes de chromosomes ou clastogène en cas de cassures de chromosomes). Pour cette expérience, l'agent clastogène Mitomycine C est utilisé à 25 et 50 ng/mL pour tenir lieu de contrôle positif. A T = 48 h, un blocage de la cytokinèse est réalisé en exposant les cellules à 4 µg/mL de cytochalasine B durant 24 h. A T = 72 h, les cellules sont rincées avec du PBS puis fixées avec de la PFA 4 % pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite colorées au Hoechst 33342 pendant 15 min puis rincées au PBS et stockées dans du PBS avec 50 % de glycérol. Après avoir optimisé les paramètres de lecture afin que l'appareil détecte les bons objets, les plaques sont analysées par le CellInsight qui détecte, dans les cellules binucléées, la présence de micronoyaux (Figure 40). Les cellules binucléées possédant des micronoyaux sont tout d'abord recherchées par le CellInsight. Elles sont entourées en bleu foncé si elles sont validées ou en orange si elles sont rejetées par l'appareil (Figure 40B). Puis, dans une aire définie autour de ces cellules binucléées (grand cercle vert, Figure 40B), la présence de micronoyaux est recherchée (petit cercle bleu clair, Figure 40B). L'optimisation des paramètres consiste à trouver le meilleur compromis pour détecter le maximum de cellules binucléées et de micronoyaux, tout en limitant les erreurs de comptage. Les résultats obtenus sont donc le taux de cellules binucléées dans les champs analysés, le taux de cellules binucléées présentant au moins un micronoyau parmi toutes les cellules binucléées (sans prendre en compte le nombre de micronoyaux dans les cellules binucléées), ainsi que l'indice de prolifération qui détermine le nombre de divisions effectuées par les cellules pendant la période d'exposition à la cytochalasine B. Des difficultés ont été rencontrées avec les cellules HCT116 puisqu'elles adhèrent moins bien au support que les cellules A549 et se décrochent au cours des différents

traitements. Pour pallier ce problème, la référence des plaques a été changée et l'étape de rinçage avant la fixation des cellules a été supprimée. La concentration en Mitomycine C est également plus élevée pour cette lignée (100 et 500 ng/mL). En ce qui concerne les kératinocytes primaires, plusieurs expériences ont été réalisées sans succès (pas de cellule binucléée). Le temps de doublement de ces cellules étant plus élevé que pour les autres lignées, des incubations plus longues (jusqu'à 48 h) avec la cytochalasine B ont été testées sans succès. Cette méthode n'a donc pas été utilisée avec les QDs.

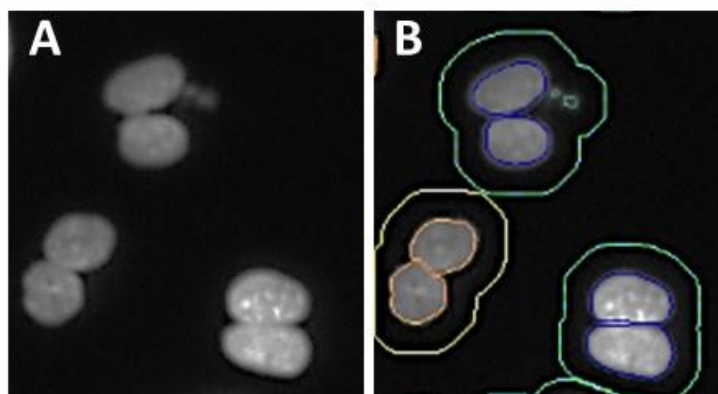


Figure 40 : Observation des cellules binucléées possédant des micronoyaux en A, ainsi que les paramètres de détection par le CellInsight en B.

### **Criblage à haut débit sur les nanomatériaux issus du projet SafeTiPaint :**

Etant donné que l'objet principale de l'étude est la toxicité des QDs sur les kératinocytes primaires et que les cellules binucléées n'ont pas été obtenues sur ce modèle, toutes les expériences de criblage des micronoyaux n'ont pas été menées. La Figure 41 présente une série de résultats obtenus sur la lignée cellulaire A549. Ces résultats concernent les *slurries* de peintures présentées dans l'introduction du chapitre. Pour le test, ces échantillons sont dilués à 50  $\mu\text{g/mL}$  dans du milieu de culture puis les cellules y sont exposées pendant 24 h. Après analyse par le CellInsight, les données sont regroupées puis synthétisées dans la Figure 41. Dans un premier temps, il faut s'assurer que le nombre de cellules binucléées soit suffisant pour l'analyse. Suivant les recommandations OCDE, ce nombre doit être au minimum de 2 000 cellules par condition (à répartir entre les réplicats et les expériences réalisées indépendamment). Généralement au laboratoire, les expériences sont réalisées trois fois indépendamment avec cinq réplicats par expérience. Mis à part le contrôle positif Mitomycine C (MMC c) qui est cytotoxique, la Figure 41A montre un taux d'environ 50 % de cellules binucléées par condition sur 2 500 cellules comptées, soit plus de 1 000 cellules binucléées par condition pour chaque expérience, ce qui est suffisant pour l'analyse. Il est



également nécessaire d'évaluer la prolifération cellulaire afin de s'assurer que les cellules se soient bien divisées de la même manière dans toutes les conditions durant l'exposition à la cytochalasine B. Pour cela, l'effet cytotatique est mesuré à l'aide de l'indice de prolifération (CBPI pour *cytokinesis-block proliferation index*) sur le CellInsight. Cette valeur correspond au nombre moyen de noyaux par cellule. Un résultat de 1 signifie que toutes les cellules sont mononuclées (cytostase de 100 %) et plus le résultat est proche de 2, plus le nombre de cellules binuclées est important (cellules ayant subi une division au cours du blocage de la cytokinèse). Dans la Figure 41B, l'IP est d'environ 1,7-1,8 pour les différentes conditions, ce qui est correct. Le contrôle positif MMC c est nettement inférieur (1,2), ce qui est justifié par le fait que ce composé soit cytotoxique et donc qu'il augmente l'effet cytotatique des cellules. Finalement, les résultats obtenus dans la Figure 41C ne montrent pas d'augmentation du taux de cellules binuclées traitées ayant des micronoyaux en comparaison avec le contrôle (CTL). Ainsi, aucune lésion chromosomique n'est mise en évidence après exposition aux différents échantillons de peintures.

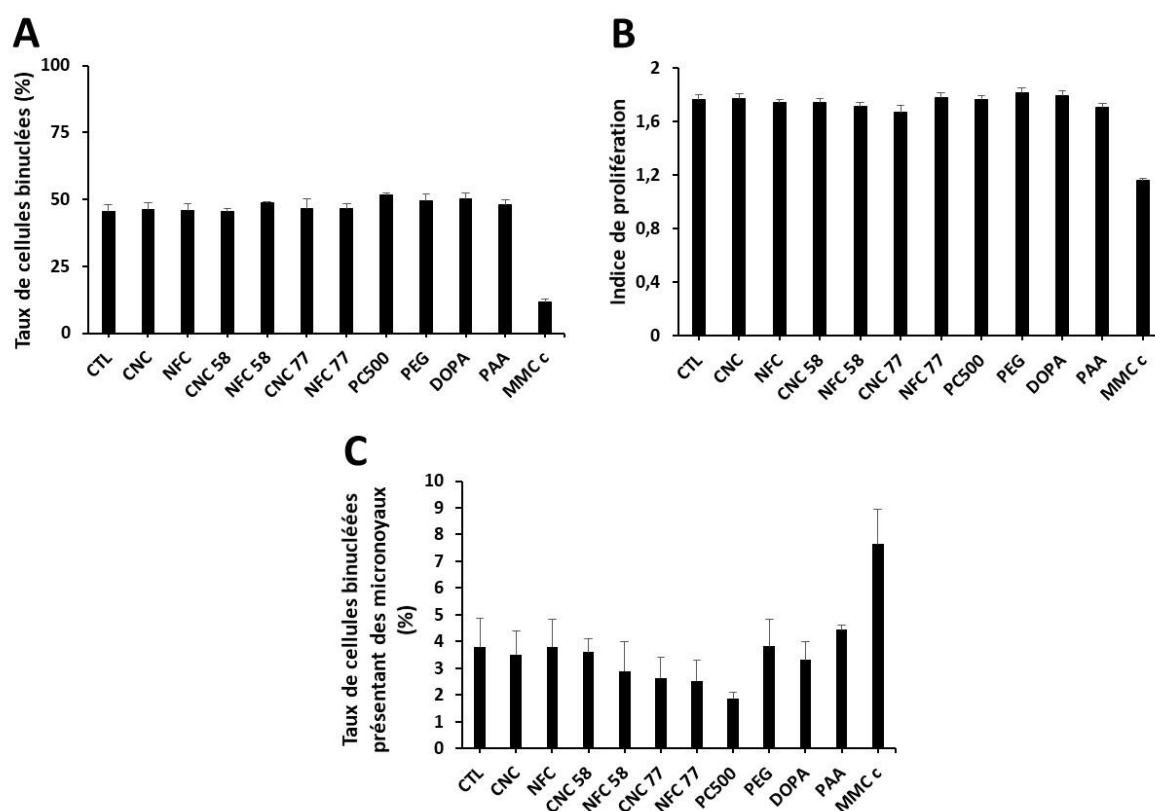


Figure 41 : Test des micronoyaux après exposition des cellules A549 pendant 24 h à des slurries de peintures à base de TiO<sub>2</sub>. La Mitomycine C à 50 ng/mL est utilisée comme contrôle positif. Le taux de cellules binuclées est mesuré en A, l'indice de prolifération en B et le taux de cellules binuclées avec présence de micronoyaux en C.

## 4. Marquage CellROX pour l'évaluation des ROS

Le CellROX est un colorant perméant qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules et qui s'oxyde en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour devenir fluorescent. Le CellROX deep red est sélectionné car ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission dans le rouge profond (respectivement 644 nm et 665 nm) sont moins couramment utilisées en microscopie et permettent donc de le coupler à d'autres marqueurs fluorescents. D'autre part, nous avons montré dans le test 53BP1 que la fluorescence des QDs n'interfère pas avec la mesure de la fluorescence à cette longueur d'onde. Le protocole consiste à incuber les cellules (préalablement exposées aux différents traitements et non fixées) pendant 30 min à 37 °C avec 5 µM du réactif CellROX et 0,3 µg/mL de Hoechst 33342, puis à les rincer trois fois au PBS. A ce stade, les cellules peuvent être fixées 15 min avec de la PFA 4 % et marquées avec d'autres colorants comme le « MitoTracker Green » qui colore les mitochondries. La lecture doit être faite rapidement, dans les deux heures qui suivent le marquage. Le contrôle positif testé est le  $\text{KBrO}_3$  à 250 µM, auquel les cellules sont exposées pendant 24 h, mais pour la suite de l'optimisation, si ce contrôle ne fonctionne pas bien, le Ménadione à 100 µM pendant 1 h à 37 °C et l'hydroperoxyde de tert-butyle à 200 µM pendant 2 h à 37 °C pourront être testés. En effet, par manque de temps, la mise au point de ce protocole n'a pas pu être terminée. Les premiers résultats ont révélé un bruit de fond très élevé qui reste également à optimiser (représenté en vert dans la Figure 42B).

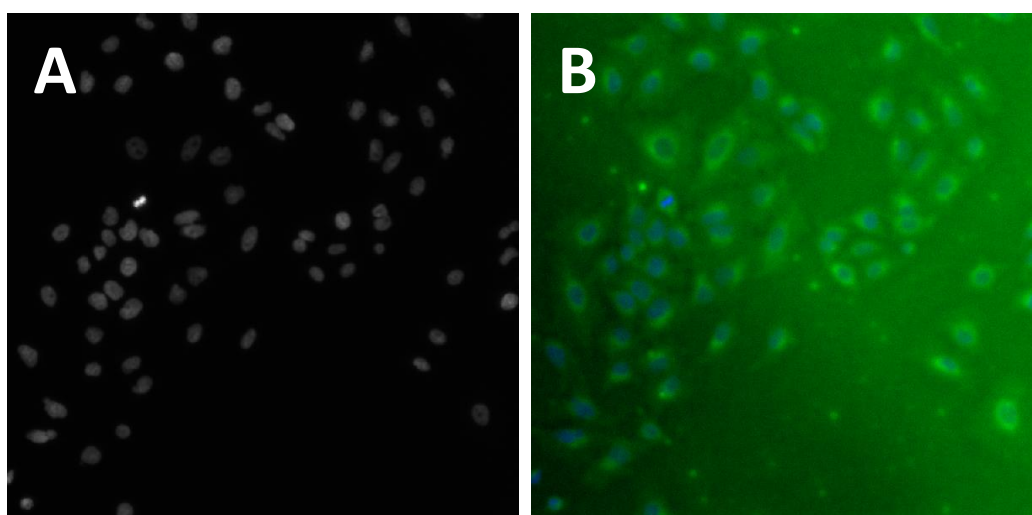


Figure 42 : Optimisation de la méthode d'évaluation des ROS par le marquage au CellROX deep red. Décompte des noyaux par la coloration Hoechst 33342 en A et co-marquage Hoechst 33342 et CellROX en B.

## 5. Test des comètes à moyen/haut débit

L'obtention d'un financement STSM (*short term scientific mission*) par le réseau européen COST Actions, sur le projet CA15132-The comet assay as a human biomonitoring tool (hCOMET), a permis d'adapter le protocole du test des comètes (déjà utilisé au laboratoire) au moyen et haut débit, dans le laboratoire du Dr. Amaya Azqueta, à l'université de Navarre, (Pampelune, Espagne). Les objectifs de cette collaboration étaient :

- L'apprentissage de la méthode des comètes à moyen/haut débit (2 et 12 gels par lame).
- Le test des sels d'iridium ( $\text{IrCl}_6$ ) comme alternative à l'endonucléase Fpg dans la méthode des comètes Fpg-modifié, pour la détection des lésions oxydatives de l'ADN de type 8-oxoG de manière plus spécifique.

Le protocole de la méthode 2 et 12 gels par lame est décrit dans le chapitre 2. En ce qui concerne la méthode 2 gels par lame, elle a été implémentée avec succès au laboratoire et la méthode 12 gels par lame nécessite l'achat de supports qui seront commandés dès qu'ils seront à nouveaux commercialisés.

En ce qui concerne les sels d'iridium, des études ont démontré que  $\text{IrCl}_6^{2-}$  et  $\text{IrBr}_6^{2-}$  pouvaient oxyder spécifiquement les purines. Ainsi,  $\text{IrCl}_6^{2-}$  est capable d'oxyder la 8-oxoG et dans une moindre mesure la 8-oxoA alors que  $\text{IrBr}_6^{2-}$  oxyde uniquement la 8-oxoG [5]. Pour mettre en évidence ces lésions dans le test des comètes, il faut casser l'ADN. Une étude a mis en évidence l'effet de la pipéridine à 1 M à 90 °C pendant 30 min [6]. Cependant, une température si élevée ne peut pas être utilisée sur les gels d'agarose nécessaires au test des comètes. Une troisième étude a mis en évidence la formation de différents produits d'oxydation après exposition à de  $\text{IrCl}_6^{2-}$  en fonction du pH (Nucléoside de la spiroimino-dihydantoïne à pH neutre ou basique et un mélange d'imino-allantoïne et Guanidino-hydantoïne à pH acide) [7].

Expérimentalement, nous avons décidé d'utiliser le test des comètes en conditions alcalines afin de vérifier si le pH est suffisant pour générer les produits d'oxydation de la 8-oxoG après exposition à de  $\text{IrCl}_6^{2-}$  (Ir (IV)), sans utiliser de pipéridine. Dans les premiers tests, la concentration optimale de Ir (IV) est recherchée sur des cellules TK6 (lignée lymphoblastoïde humaine). Une première gamme d'exposition entre 0,1  $\mu\text{M}$  et 10 mM est testée pour laquelle aucune lésion n'est détecté (incubation Ir (IV), 1 h à 37 °C). Une deuxième gamme est ensuite testée entre 100  $\mu\text{M}$  et 250 mM, en considérant un effet de la température sans pipéridine

(incubations Ir (IV), 1 h à 37 °C ou à 55 °C). Cette expérience a mis en évidence une réduction du nombre de cassures de l'ADN lorsque la concentration en Ir (IV) augmente, indépendamment de la température (Figure 43). Pour les cellules exposées aux plus fortes concentrations (25 mM et 250 mM), aucun noyau n'est observé, certainement car les dégradations de l'ADN sont trop élevées (toxicité à de si fortes concentrations).

Ces premiers résultats suggèrent un potentiel effet de l'Ir (IV) comme agent réticulant de l'ADN. Dans la deuxième partie des expériences, nous avons voulu démontrer cet effet. Pour cela, les cellules sont exposées à 25 µM ou 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, connu pour entraîner de nombreuses cassures, pendant 5 min sur de la glace (100 µM a aussi été testé mais le taux de lésions était beaucoup trop élevé pour être analysé). Les résultats présentés dans la Figure 44 montrent que l'Ir (IV) réduit la migration de l'ADN (produite par les cassures de l'ADN induites par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Il en résulte que l'Ir (IV) ne peut pas être utilisé comme alternative à la Fpg puisqu'il agit comme un agent réticulant en diminuant la quantité d'ADN dans la queue de comète. La pipéridine n'a pas été testée mais il pourrait être intéressant d'évaluer son effet avec l'Ir (IV) avec des incubations à 55 °C.

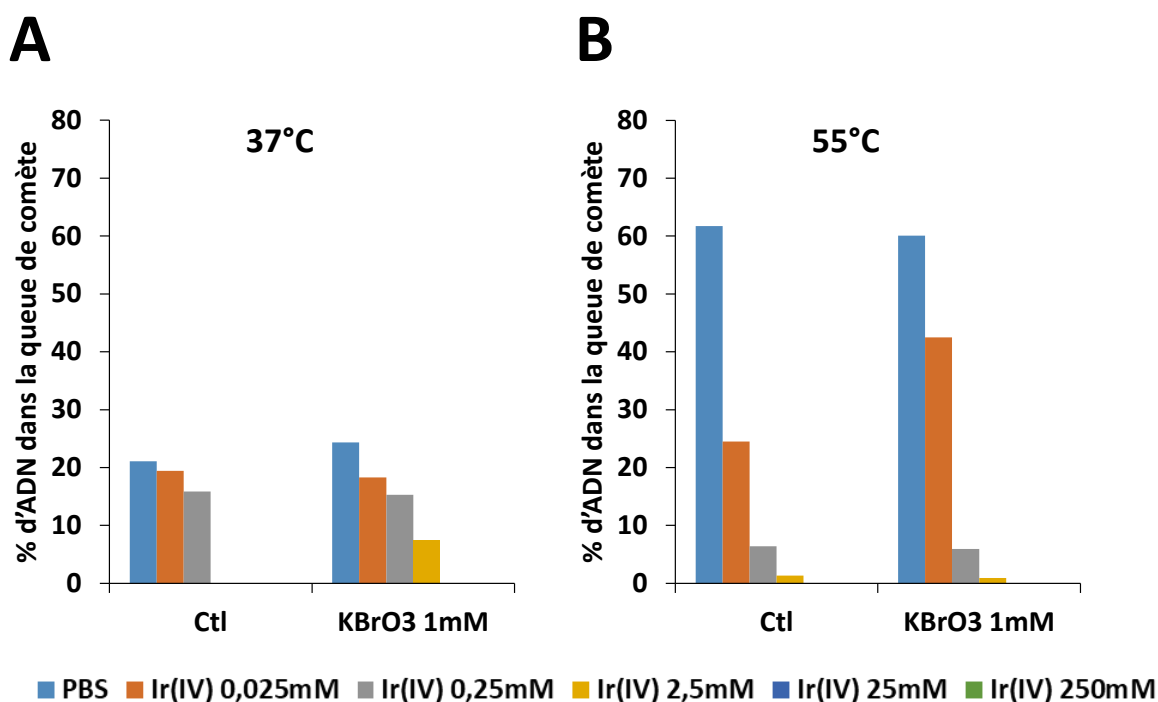


Figure 43 : Optimisation de la concentration en Ir (IV) pour la détection de lésions 8-oxoG par le test des comètes. Des cellules non-exposées et exposées à KBrO<sub>3</sub> (contrôle positif) ont été utilisées. Les cellules ont été exposées à Ir (IV) pendant 1 h, à deux températures différentes : 37 °C et 55 °C.

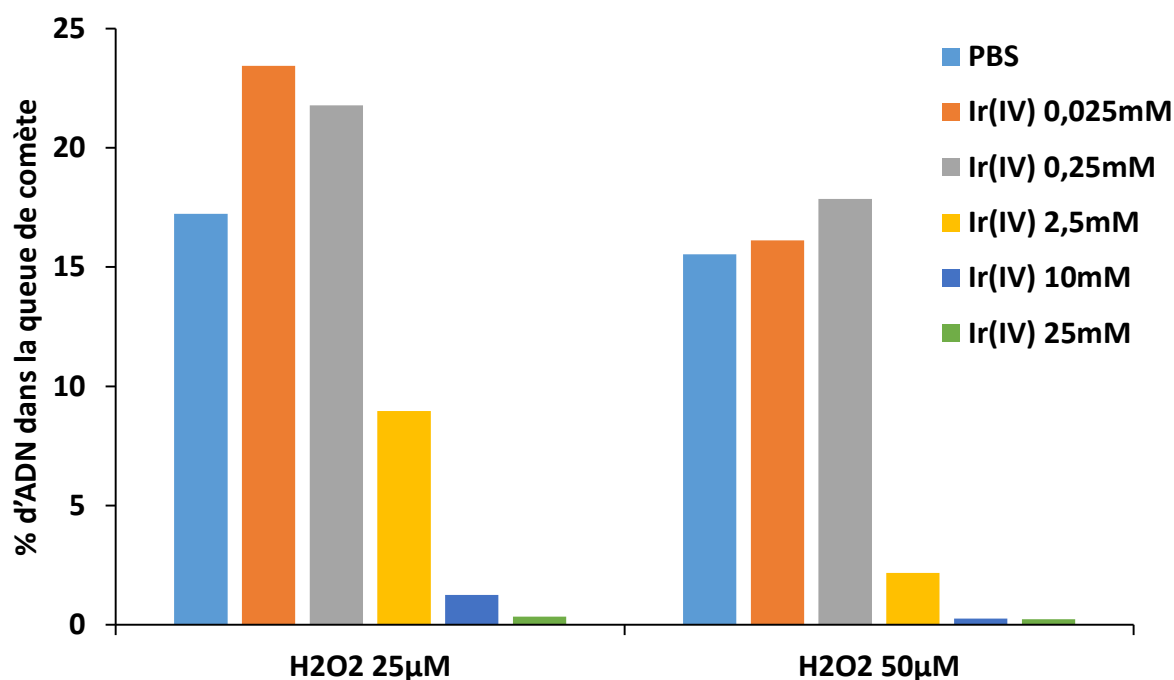


Figure 44 : Recherche de l'effet réticulant de Ir (IV) sur la lignée cellulaire TK6. Les cellules lysées ont été exposées pendant 5 min (sur de la glace) à 25 ou 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui est connu pour provoquer des ruptures de brins d'ADN, puis à 25 μM-25 mM d'Ir (IV).

## 6. Discussion et conclusion

Le développement de ces méthodes permet de généraliser les tests de toxicologie en augmentant le débit d'analyse. Cela peut permettre de tester une multitude de composés et d'obtenir les résultats rapidement, en quelques heures seulement. Ces derniers peuvent permettre d'enrichir les bases de données toxicologiques qui représentent un besoin sociétal actuel, notamment à cause du développement de nombreuses substances et de nouveaux matériaux manufacturés pour lesquels les mécanismes de toxicité restent inconnus.

En ce qui concerne le test des comètes, maintenant que la technique 2 et 12 gels par lame est acquise au laboratoire, elle pourra être optimisée sur le CellInsight pour augmenter davantage le débit d'analyse.

## **Références :**

- [1] B. Drasler, P. Sayre, K. G. Steinhäuser, A. Petri-Fink, et B. Rothen-Rutishauser, « In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials », *NanoImpact*, vol. 8, p. 99-116, oct. 2017, doi: 10.1016/j.impact.2017.08.002.
- [2] S. Latvala et al., « Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles », *PLoS ONE*, vol. 11, no 7, p. e0159684, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0159684.
- [3] F. Cappellini et al., « Mechanistic insight into reactivity and (geno)toxicity of well-characterized nanoparticles of cobalt metal and oxides », *Nanotoxicology*, vol. 12, no 6, p. 602-620, 2018, doi: 10.1080/17435390.2018.1470694.
- [4] « Essai n° 487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères | READ online », *OECD iLibrary*. [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-487-essai-in-vitro-de-micronoyaux-sur-cellules-de-mammiferes\\_9789264264878-fr](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-487-essai-in-vitro-de-micronoyaux-sur-cellules-de-mammiferes_9789264264878-fr) (consulté le juin 30, 2020).
- [5] J. G. Muller, V. Duarte, R. P. Hickerson, et C. J. Burrows, « Gel electrophoretic detection of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7, 8-dihydro-8-oxoadenine via oxidation by Ir (IV) », *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no 9, p. 2247-2249, mai 1998, doi: 10.1093/nar/26.9.2247.
- [6] A. M. Fleming, O. Alshykhly, J. Zhu, J. G. Muller, et C. J. Burrows, « Rates of Chemical Cleavage of DNA and RNA Oligomers Containing Guanine Oxidation Products », *Chem Res Toxicol*, vol. 28, no 6, p. 1292-1300, juin 2015, doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00096.
- [7] W. Luo, J. G. Muller, et C. J. Burrows, « The pH-Dependent Role of Superoxide in Riboflavin-Catalyzed Photooxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine », *Org. Lett.*, vol. 3, no 18, p. 2801-2804, sept. 2001, doi: 10.1021/ol0161763.



## **Chapitre 5 :**

# *Les effets des quantum dots sur les kératinocytes primaires humains*





Les potentiels effets toxiques des QDs ont été recherchés, *in vitro*, sur des cellules primaires humaines cutanées en exposition aiguë de 24 h. Cette étude est basée sur l'évaluation de la viabilité cellulaire, la génération d'espèces réactives de l'oxygène et la formation de lésions de l'ADN. Après avoir mis en évidence certains effets, des mécanismes de toxicité ont été recherchés par l'analyse de l'expression de certains gènes (stress oxydant, homéostasie du zinc et inflammation) ainsi qu'une analyse protéomique. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un deuxième article scientifique, excepté pour l'étude protéomique qui figure dans la partie « résultats complémentaires ».

## 1. Introduction

La peau est un tissu qui peut être facilement soumis à l'exposition aux QDs, présents dans les produits électroniques et les écrans. Cette exposition peut alors entraîner des effets toxiques chez l'Homme. Pour évaluer cela, des kératinocytes primaires humains (HKPM), issus d'explants mammaires de différents donneurs sains, sont utilisés comme modèle. Ils sont extraits puis cultivés avant d'être exposés aux QDs (vieillis en enceinte climatique ou non vieillis) pendant 24 h comme décrit dans le chapitre 2. Dans l'article suivant, la pénétration cellulaire des QDs ou de leurs produits de dégradation est tout d'abord recherchée grâce aux techniques de TEM et de TEM-EDX. Ensuite, l'étude toxicologique de ces derniers est réalisée en évaluant leur impact sur la viabilité cellulaire via les tests WST-1 et LDH, ainsi que sur l'intégrité de l'ADN via le test des comètes et l'immunomarquage 53BP1. Suite à l'observation d'effets cytotoxiques et génotoxiques, concernant surtout les produits de dégradation des QDs après vieillissement, les mécanismes de toxicité sont investigués. L'apparition d'un stress oxydant pouvant être engendrée par une suraccumulation des ROS intracellulaires est recherchée via le test en fluorescence H<sub>2</sub>DCFDA. Puis, les expressions de certains gènes codant pour des mécanismes déjà mis en évidence dans la littérature des QDs sont mesurées (cf. chapitre 1). Ainsi des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant sont évalués en RT-qPCR. Par ailleurs, étant donnée la forte proportion de zinc dans la composition des QDs testés, l'expression de gènes codant pour l'homéostasie du zinc est également mesurée. Ces résultats, qui mettent en évidence des modifications d'expressions de certains gènes, ont ensuite été élargis à l'étude de plus de 2 500 protéines, grâce à une étude protéomique (cf. partie 3). Cette étude permet de mettre en évidence les grandes fonctions biologiques qui sont potentiellement impactées par l'exposition aux QDs ou à leurs produits de dégradation, en classant les protéines ayant une expression significativement différente des cellules contrôles en fonction de leur rôle dans les différentes voies biologiques.

## 2. Article 2 :

### **Toxicological effects of shell designed InP quantum dots on human primary keratinocytes upon environmental aging**

Fanny Dussert<sup>a</sup>, Karl David Wegner<sup>b</sup>, Christine Moriscot<sup>c</sup>, Benoit Gallet<sup>d</sup>, Pierre Henry Jouneau<sup>e</sup>, Peter Reiss<sup>b</sup>, Marie Carrière<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ.Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-SyMMES, CIBEST, 38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Univ.Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-SyMMES, STEP, 38000 Grenoble, France

<sup>c</sup> Univ. Grenoble-Alpes, CNRS, CEA, ISBG, EMBL, 38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> Univ. Grenoble-Alpes, CNRS, CEA, IBS, 38000 Grenoble, France

<sup>e</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-MEM, LEMMA, 38000 Grenoble, France

\*Corresponding author: Dr. Marie Carrière, [marie.carriere@cea.fr](mailto:marie.carriere@cea.fr), CEA-Grenoble IRIG-SyMMES/CIBEST, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France. Phone: 04 38 78 03 28. Fax: 04 38 78 50 90

## Abstract

Quantum dots (QDs) are colloidal fluorescent semi-conductor nanocrystals, which possess exceptional optical properties. They are widespread used for their optical properties, such as in light-emitting diodes (LEDs), displays and photovoltaics. Due to their toxicity, the use of common cadmium-based (Cd) QDs in electrical and electronic equipment is restricted in the European Union through the Restriction of hazardous substances in electrical and electronic equipments (RoHS) directive. This has prompted industrials to develop safer alternatives to Cd-based QDs, the more promising of them being InP QDs. We recently developed some alloyed QDs with a core composed of InZnP coated with a Zn(Se,S) gradient shell, which was further coated with an additional shell made of ZnS, either thick or thin. In this study, the toxicity of these three types of QDs, is evaluated in their pristine form or after aging in a climatic chamber, which mimics environmental weathering. The results show that pristine QDs do not show overt toxicity to human primary keratinocytes. By contrast, aged QDs reveal high

cytotoxicity, genotoxicity and they significantly modulate the mRNA expression of genes encoding proteins involved in zinc homeostasis, oxidative stress and inflammation.

Keywords: Quantum dots, Toxicity, Primary keratinocyte, Environmental aging, Safer by design.

## Introduction

Quantum dots (QDs) are colloidal fluorescent semi-conductor nanocrystals, which are used in many applications including optoelectronics where their use is rated at 90% for light conversion in light-emitting diodes (LEDs) or organic light-emitting diodes (OLEDs) and 10% for biomedical imaging (Piccinno et al., 2012). The exceptional optical properties of QDs come from their small adjustable size, which gives them tunable band gap resulting in large absorption and narrow emission spectra, high quantum yield (QY) and resistance to photobleaching (Reiss et al., 2016). Over the last few years, several QDs containing carcinogenic heavy metals have been developed, especially some QDs based on cadmium, which is classified as carcinogenic to humans by International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). Among these QDs, cadmium selenide (CdSe), cadmium telluride (CdTe) and cadmium sulfide (CdS) are still used. However, they cause some toxic effects on human and environmental models, for instance they induce the accumulation of reactive oxygen species (ROS) due to the release of Cd<sup>2+</sup> ions when QDs are degraded (Bottrill and Green, 2011). Due to their high toxicity and the restricted use of Cd compounds in electrical and electronic equipment to 0.01%, via the Restriction of hazardous substances in electrical and electronic equipment (RoHS) directive of the European Parliament (2011/65/EU), Cd-free QDs have been developed in recent years.

A promising alternative is indium phosphide (InP) QDs, which show a tunable emission from visible to the near-infrared range (Reiss et al., 2016). Few studies report the toxicity of these QDs in comparison to Cd-based QDs. In a comparative study combining *in vivo* and *in vitro* approaches, InP QDs were shown to be less toxic than CdSe QDs, owing to the lower intrinsic toxicity of In ions compared to Cd ions (Brunetti et al., 2013). Still, InP is classified as probably carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (World Health Organization et al., 2006). *In vivo*, InP/ZnS QDs accumulate in the liver and

spleen of mice and rats exposed by intravenous injection, subcutaneously or by intratracheal instillation (Li et al., 2020; Lin et al., 2020; Yaghini et al., 2018). Overall, they cause either no (Lin et al., 2015; Yaghini et al., 2018) or mild toxicity, characterized by modulation of haematological parameters related to liver or cardiac function when administered intravenously (Li et al., 2020), hyperemia in alveolar septa when administered by intratracheal instillation (Lin et al., 2020) and acute phase inflammation in mice (Chen et al., 2019). *In vitro*, InP/ZnS QDs alter the viability of BGC-823 gastric cells and SHSY-5Y neuroblastoma cells (Liu et al., 2015) and of HCC-15 and RLE-6TN lung cells via the induction of apoptosis (Chen et al., 2018). They trigger oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and inflammation in mouse bone marrow-derived macrophages (Chen et al., 2019). This means that it is necessary to investigate the toxic potential of InP QDs and to develop safer designs. QD degradation derives from surface oxidation (Reiss et al., 2016), which is accelerated by exposure to ambient air and UV light (Derfus et al., 2004; Mortensen et al., 2015, 2012; Tarantini et al., 2019). Adding a layer on the surface of QD core, such as a shell of ZnS, protects them from degradation and reduce their toxicity, probably because it avoids the release of ions from the core (Derfus et al., 2004).

In recent years, effort has been dedicated to the development and adoption of “safer by design” approaches for the synthesis and formulation of nanoparticles. The “safer by design” concept aims to develop nanomaterials limiting adverse effects on human health, animals and environment, which could be generated throughout their life cycle, from their conception to their disposal at the end of their life (Schwarz-Plaschg et al., 2017). When applied to InP QDs, this approach has led to some optimizations. For instance, it has been demonstrated that adding a second shell on the surface of InP QDs can reduce their toxicity (Brunetti et al., 2013). Moreover, alloying the InP/ZnS QD core with zinc or zinc sulfur increases their quantum yield. As a consequence, the same level of fluorescence is obtained with lower quantities of alloyed InZn(S)P QDs, as compared to InP QDs (Thuy et al., 2010). In addition, surface ligands also play a role in QD toxicity, because their degradation results in the loss of QD stability, which increases their cellular impact (Brown et al., 2018; Wiecinski et al., 2009). For instance, hydrophilic QDs are more stable than hydrophobic QDs (Karabanovas et al., 2008). The use of charged surface ligands results in more toxic QDs, especially for negative charge like carboxylic acid ( $-\text{COO}^-$ ) compared to neutral and positive charge (Chen et al., 2018). Following these concepts of “safer by design”, we recently reported the synthesis of In-based core-shell QDs, composed of a core of InZnP coated with a first shell of Zn(Se,S) then a second shell of ZnS, either thin or thick (Wegner et al., 2019). These three QD formulations (single

shell/gradient, double shell/thin, double shell/thick) were screened for their cytotoxicity on human primary keratinocytes (Wegner et al., 2019).

To further delve deeper into the mechanisms leading to the toxicity of these three QDs, we investigated their impact on cell viability, DNA integrity, on the oxidative balance of cells as well as their inflammatory potential. Moreover, since we previously showed that InZnP/Zn(Se,S) QDs degraded when exposed to UV light and released some potentially toxic In and Zn ions, we explored the impact of these three QDs on cellular Zn homeostasis.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

Cell culture medium and supplements were purchased from Thermo Fisher Scientific. All other chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich. QDs were synthesized in our laboratories and transferred to PBS by ligand exchange as previously described (Wegner et al., 2019).

### Accelerated weathering

QDs were diluted to 1  $\mu$ M in PBS and 2 mL were deposited in quartz cuvettes (10 mm $\times$ 10 mm, pathlength 10 mm), closed by a screw cap with a silicone rubber seal. Then, these samples were placed on a magnetic stirrer into a Q-SUN Xe-1 Xenon arc test chamber (Q-LAB) providing a continuous full sunlight spectrum during 24 hours. The weathering settings were chosen according to the ISO norms 4892-1 (2000) and 4892-2 (2013), developed for plastics ageing. The temperature were fixed at 40 °C and the irradiance at 1.44 W/m<sup>2</sup> (measured at 420 nm), without humidity control, as in our previous study (Tarantini et al., 2019).

### Cell culture and exposures

Human primary keratinocytes were isolated from skin donors as previously described (Mouret et al., 2006). Skins were obtained from the university hospital of Grenoble after breast surgery of healthy female with their informed consent. Experiments followed guidelines and regulations, in particular the article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes (<https://www.legifrance.gouv.fr>). Young healthy Caucasian donors were selected for this study (15-30 years old) with phototype I or II according to the scale of Fitzpatrick classification (Fitzpatrick, 1988).

Cells were cultured in keratinocyte serum-free medium (K-SFM) supplemented with 1.5 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 25 µg/mL bovine pituitary extract, 75 µg/mL primocin and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. They were used for experiments at less than three passages. They were seeded in clear or black standard 96-well plates for cytotoxicity assays or ROS measurements, respectively, at a density of 20,000 cells per well and in black 96-well plates with clear bottom for 53BP1 immunostaining, at a density of 10,000 cells per well. 12-well plates were used to comet and RT-qPCR assays and seeded at a density of 250,000 cells per well. Finally, 4 chamber Labteks were used for electron microscopy and seeded at a density of 120,000 cells per well. 24 h after seeding, cells were exposed to 3.125-100 nM of pristine or aged QDs for another 24 h. Cells were also exposed to indium and/or zinc acetate for 24 h.

### Transmission electron microscopy

Cells were stained, embedded in Epon resin and cut with an ultramicrotome, then collected on formvar-carbon coated copper grids as described previously (Tarantini et al., 2019). They were then imaged using a Tecnai G2 Spirit BioTwin (FEI) transmission electron microscopy (TEM) operating at 120 kV. Images were recorded thanks to an ORIUS SC1000 CCD camera (Gatan). For EDX analysis, samples were imaged by scanning-transmission electron microscopy (STEM) on a FEI/Tecnaï OSIRIS microscope operating at 200 kV, using a high angle annular dark field (HAADF) detector.

### Toxicity assessment

Cell viability: cytotoxicity was assessed using two colorimetric assays, lactate dehydrogenase (LDH, Sigma-Aldrich) and WST-1 (Roche), probing cell membrane integrity and cell metabolic activity, respectively, following the manufacturer's instructions. Amino-modified polystyrene nanoparticles (PSNH<sub>2</sub>) (100 µg/mL) were used as positive control.

For LDH quantification, 50 µL of each well supernatant was transferred to a clean 96-well plate and mixed with 100 µL of LDH reagent (substrate, cofactor and dye, V:V:V). After 30 min of incubation in the dark at room temperature, 10 µL of hydrochloric acid (HCl) 1 N was added into each well to stop the reaction. Then, the absorbance was measured at 490 nm, as well as the background absorbance at 690 nm, with a spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device). In the WST-1 assay, after exposure to QDs, medium was removed and wells were wash with PBS. Then, 100 µL of WST-1 diluted to the tenth in cell culture medium were added into each well. After 1 h 30 of incubation at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere,

absorbance was measured at 450 nm and 650 nm with a spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device). No interferences were detected with these assays (Fig. S1).

Experiments were repeated at least three times independently, on keratinocytes originating from different donors, with  $n = 5$  replicates in each independent experiment.

Reactive Oxygen Species (ROS) generation: ROS were quantified by fluorescence measurements using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) reagents (Thermo Fisher Scientific). 24 h after seeding, culture medium was removed, 25  $\mu$ M of H<sub>2</sub>DCFDA or 1  $\mu$ M of DHR 123 were added to each well and incubated during 40 min at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. It was then replaced by exposure medium containing QDs. Hydroperoxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 500  $\mu$ M and KBrO<sub>3</sub> at 1 mM were used as positive controls. Fluorescence (Ex/Em corresponding to 480 nm/530 nm) was measured directly after QDs exposure and after 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h and 24 h of exposure with a spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device). Each experiment was repeated twice independently on keratinocytes from different donors with  $n = 5$  replicates for each of independent experiment.

DNA damage: double-strand breaks in DNA was determined by 53BP1 immunostaining. After seeding, cells were exposed for 24 h to 100  $\mu$ L of the different QDs or etoposide at 100  $\mu$ M, which is the positive control for this experiment. Then, they were fixed by directly adding 100  $\mu$ L of 8% paraformaldehyde. After 30 min of incubation, cells were washed three time with PBS and permeabilized for 15 min with 0.2% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin (BSA), prepared in PBS. After being washed three times with PBS, non-specific sites were blocked for 15 min with 3% BSA in PBS (PBS-BSA). These steps were followed by 1 h of incubation with the primary antibody, a rabbit polyclonal anti-TP53BP1 (PAB12506, Abnova) diluted in PBS-BSA to which 0.02% sodium azide was added. Then cells were washed again three times for 5 min with PBS-BSA and incubated for 1 h in the dark with the secondary fluorescent antibody, an anti-rabbit IgG Atto 633 (41176, Sigma-Aldrich) diluted in PBS-BSA. Finally, cells were washed three times for 15 min with PBS-BSA with 0.2% Triton X-100 and stained with 0.3  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature, then washed three times with PBS. Cells were stored in PBS containing 50% glycerol and plates were analyzed using a CellInsight CX5 High-Content Screening (HCS) Platform (Thermo Fisher Scientific). In each well, the number of nucleus was automatically counted, as well as the average number of foci per cell nucleus. These cells were also used for cytotoxicity assessment, via measuring the number of nuclei remaining in each well after exposure, and



compared to the number of nuclei in control wells (unexposed cells). These experiments were repeated twice independently, on keratinocytes from different donors, with  $n = 5$  replicates for each of independent experiment.

DNA strand breaks and Fpg-sensitive sites were quantified using the alkaline and Fpg-modified comet assay, as previously described (Armand et al., 2016). Exposure to 100  $\mu\text{M}$  methyl methanesulfonate (MMS) for 24 h was used as positive control. Two gels per slides were prepared, with a density of 12,000 cells per gel (20 X 20 mm). Analysis consisted in recording the % tail DNA on 50 cells per gel using the Comet IV software (Perceptive Instruments, Suffolk, UK). Experiments were repeated six times independently, on keratinocytes from three different donors, with two technical replicates per condition for each experiment.

Gene expression level: mRNA expression levels were analysed by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). SOD1, SOD2, GPX1, CAT, HO1, GCLM and P21 were examined as probes of oxidative stress, MT1, MT2, MTF1, ZnT1, ZnT7, ZIP1 and HSPA6 as probes of cellular zinc homeostasis and IL8, IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  as probes of inflammation. RNA was extracted from keratinocytes using GenElute<sup>TM</sup> mammalian total RNA miniprep kit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. RNA purity and concentrations were determined by absorbance measurement at 260 nm and calculation of abs. 260/280 nm, abs. 260/230 nm, using a NanoDrop 3300 Fluorospectrometer. Then, cDNAs were obtained using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with 0.5  $\mu\text{g}$  of RNA, random primers at 100 ng/ $\mu\text{L}$ , dNTP mix at 10 mM each and ribonuclease inhibitor at 45 U/ $\mu\text{L}$ . Real-time quantitative transcription PCR was performed with a CFX96 Real-Time PCR Detection System, C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad) using SYBR Green SuperMix (Bio-Rad). Specific primer sequences are detailed in supplementary information (Table S1). For normalization, CycloA, GADPH and S18 were used as reference genes. Values were calculated using Relative Expression Software Tool (REST2009), based on  $\Delta\Delta\text{Cq}$  method, which compares the  $\Delta\text{Cq}$  of a condition with the  $\Delta\text{Cq}$  of control. Relative expressions follow the equation:  $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ .

### Statistical analysis

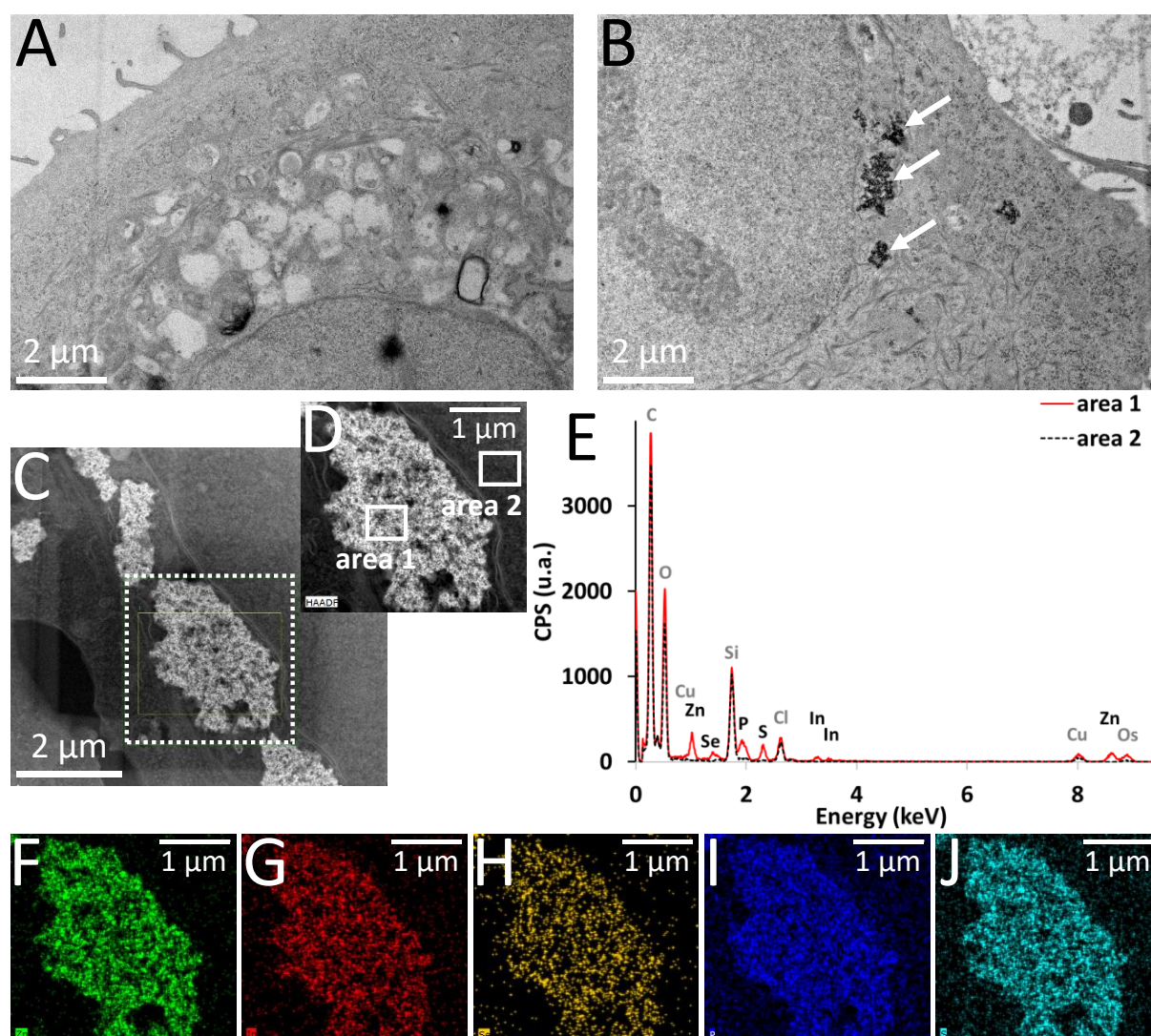
RStudio, the interface of R 3.3.2 software was used to assess statistical significance, using the non-parametric Kruskal-Wallis rank sum test followed by pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test. The P values were adjusted using Benjamini and Hochberg correction and results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### QD accumulation in cells

Human primary keratinocytes were exposed to QDs coated with a gradient shell (thereafter named “Grad”), a double shell with the thin outer shell (thereafter named “Thin”) or a double shell with the thick outer shell (thereafter named “Thick”). All of them were tested either in their pristine form or after 24 h of accelerated ageing in a climatic chamber.

Their intracellular accumulation and distribution were observed using TEM. As shown in Figure 1, the pristine Thick QD accumulated in cells and localized in the cell cytoplasm as agglomerates, close to the nuclear membrane (Fig. 1B, white arrows). To confirm the presence of QDs in keratinocytes, these agglomerates were observed by STEM (Fig. 1C-D) followed by EDX analyzes (Fig. 1E-J). EDX were detected the presence of Zn (Fig. 1E-F), In (Fig. 1E-G), Se (Fig. 1E-H), P (Fig. 1E-I) and S (Fig. 1E-J) in them (Fig. 1D-E, area 1), which clearly confirms the presence of QDs inside cells. Regarding aged QDs, no precipitate was found into keratinocytes. This is probably due to the too low exposure concentration (3 nM) compared to the results on pristine QDs (50 nM), where some precipitates were observed. However, at higher concentration cells die, so it is not relevant to increase this one.

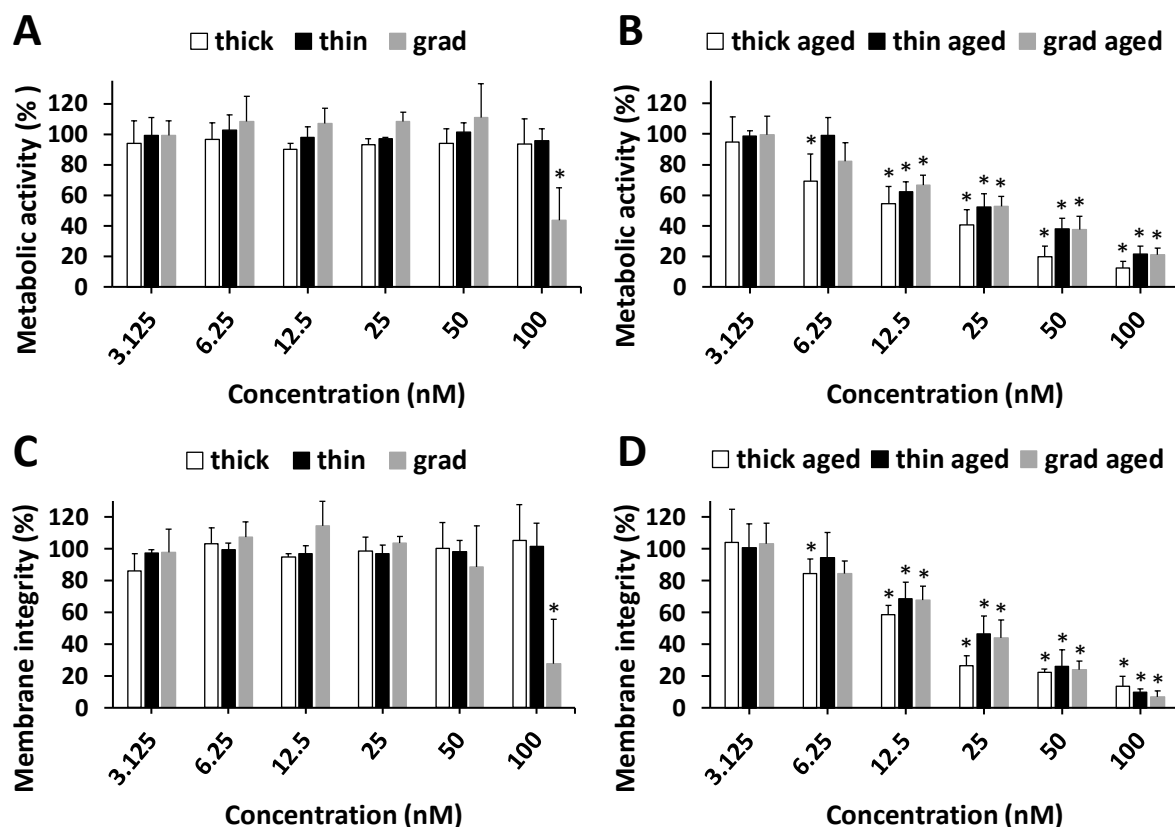


**Fig. 1.** Penetration of Thick shell QDs into keratinocytes, observed by TEM imaging. Cells were exposed for 24 h to culture medium (A), or 50 nM of pristine QDs (B, white arrows: agglomerates of QDs). Agglomerates were imaged by STEM, in HAADF mode (C-D) and analysed by EDX. Spectra of areas 1 and 2 were represented (E) and corresponding reconstruction of Zn (F), In (G), Se (H), P (I) and S (J) were adding.

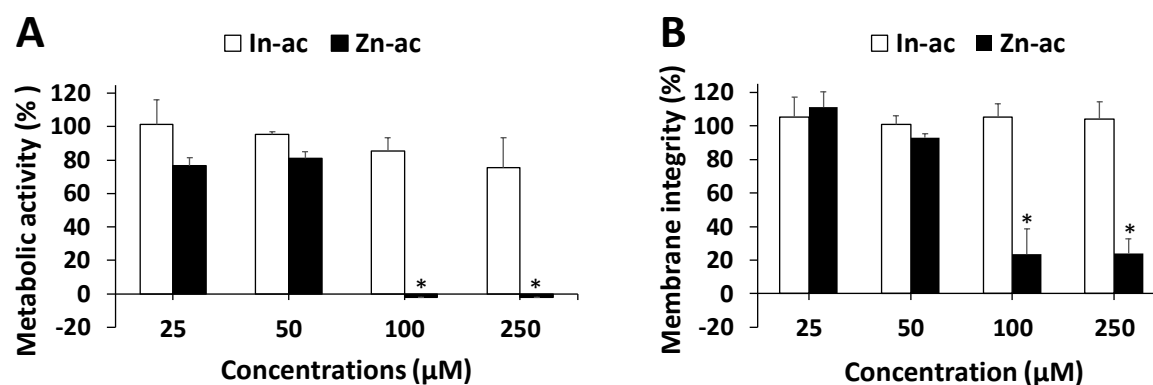
### Cell viability after QDs exposures

We then compared the cytotoxicity of these three QDs, either pristine or aged, using two complementary assays, i.e. WST1, which probes cell metabolic activity and LDH, which probes cell membrane integrity. Among pristine QDs, only the Gradient shell QD showed significant cytotoxicity, at the highest concentration, i.e., 100 nM (Fig. 2A, C). In contrast, aged QDs showed significant cytotoxicity from 6.25 nM (Thick) or from 12.5 nM (Grad and Thin). At all concentrations, the Thick shell QD showed similar or slightly greater cytotoxicity than the Gradient and Thin shell QDs (Fig. 2B, D). We previously showed that InZnP QDs degraded when exposed to UV light, leading to the release of Zn(II) and In(III) ions. Since all three QDs

were composed of similar indium content, while their zinc content varied, with the Thick shell QD containing more zinc than the Gradient and Thin shell QD, we evaluated the toxicity of indium and zinc salts, also using WST1 and LDH assays (Fig. 3A, B). Only zinc acetate showed significant toxicity at the highest concentrations, i.e. from 100  $\mu$ M. However, this concentration is clearly greater than the amount of zinc in QDs exposure (3.75  $\mu$ M of indium and 15  $\mu$ M of zinc corresponding to 50 nM of QDs Thick shell exposure).



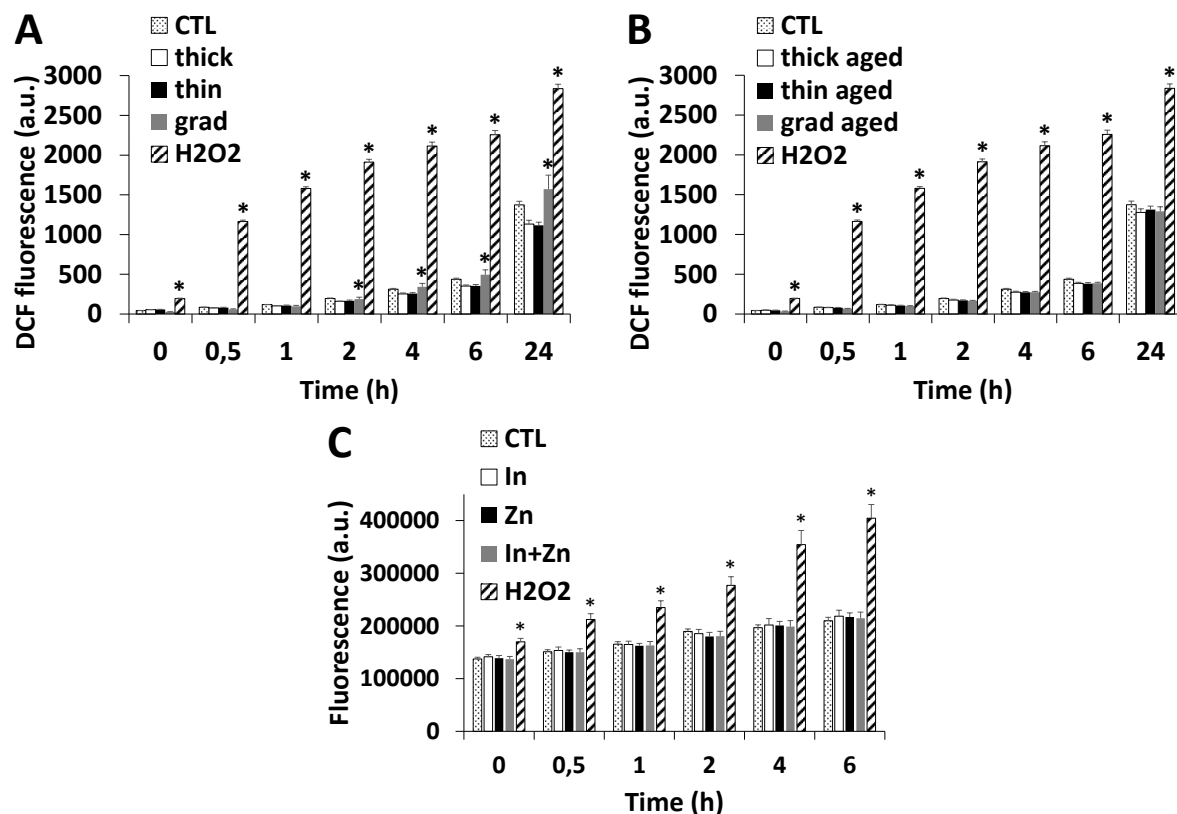
**Fig. 2.** Cytotoxicity of InZnP QDs. Cytotoxicity was assessed via the WST-1 assay (A-B) and lactate dehydrogenase assay (C-D). Cells were exposed 24 h to pristine QDs (A-C) or aged QDs (B-D). PSNH<sub>2</sub> nanoparticles at 100  $\mu$ g/mL were used as a positive control. Results are expressed as % relative to the control (unexposed cells). Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 3 independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



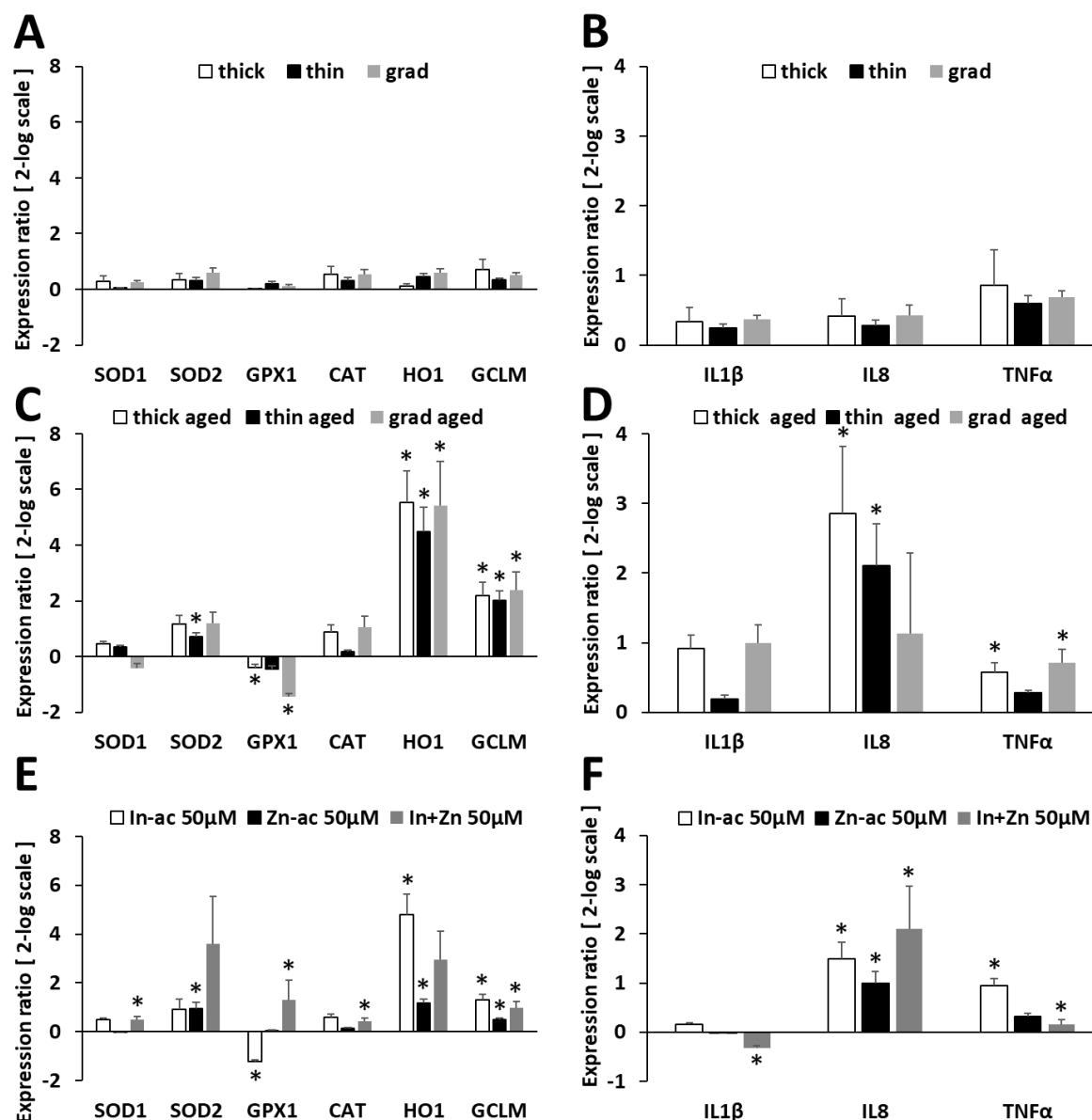
**Fig. 3.** Cytotoxicity of indium acetate (In-ac) and zinc acetate (Zn-ac). Cytotoxicity was assessed via the WST-1 assay (A) and lactate dehydrogenase assay (B). Cells were exposed 24 h and PSNH<sub>2</sub> nanoparticles at 100 μg/mL were used as a positive control. Results are expressed as % relative to the control (unexposed cells). Graphs represent mean +/- standard deviation of 2 independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per condition. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.

### Oxidative stress and inflammation

Since the main mechanisms of InP/ZnS QD toxicity reported to date are via oxidative stress and inflammation (Chen et al., 2018, 2019), we measured the intracellular ROS content in cells exposed to these three QDs, using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Fig. 4 and Fig. S2). Pristine Gradient shell QD caused a slight but significant elevation of the intracellular ROS content from 2 h of exposure, which persisted up to 24 h of exposure (Fig. 4A). Conversely, no ROS accumulation was observed with the other pristine QDs (Fig. 4A), nor with aged QDs (Fig. 4B). In addition, neither zinc acetate nor indium acetate caused accumulation of ROS in keratinocytes (Fig. 4C and Fig. S3).



**Fig. 4.** Accumulation of reactive oxygen species into keratinocytes after exposure to the InZnP QDs, indium and/or zinc acetate. ROS measurement was assessed via H<sub>2</sub>DCFDA assay for QDs exposure and DHR 123 for In and Zn acetate exposures. Cells were exposed 24 h to 50 nM of pristine (A), 12 nM of aged QDs (B), 3.75  $\mu$ M of indium, 15  $\mu$ M of zinc or a mix of both (C). 500  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of two independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



**Fig. 5.** Effects of InZnP QDs on gene expressions. These measurements were assessed via RT-qPCR assay, to study the regulation of oxidative stress (A, C, E) and inflammation markers (B, D, F). Cells were exposed 24 h to 25 nM of pristine QDs (A-B), 6.25 nM of aged QDs (C-D) and 50 μM of indium and/or zinc acetate. Graphs represent mean +/- standard deviation of an independent experiment performed on human primary keratinocytes, with 3 biological replicates and 2 technical replicates. Statistical significance:  $p \leq 0.05$ , \*: exposed vs. control.

Further to this analysis of ROS accumulation in exposed cells, the mRNA expression of genes involved in oxidative stress regulation was measured by RT-qPCR. No significant effect was observed on cells exposed to pristine QDs (Fig. 5A). In cells exposed to aged QDs a significant overexpression of HO-1 and GCLM were observed in cells exposed to the three QDs, together with an overexpression of SOD2 that was significant for Thin shell QD and decreased expression of GPX1 that was significant for Thick and Gradient shell QDs (Fig. 5C).

Overexpression of HO-1 and GCLM were also observed in cells exposed to indium and zinc acetate, as well as decreased expression of GPX1 in cells exposed to indium acetate (Fig. 5E).

Regarding inflammation markers, no significant change of the mRNA expression of IL1 $\beta$ , IL8 and was observed in cells exposed to pristine QDs (Fig. 5B). Conversely, the mRNA expression of IL8 and TNF $\alpha$  were up regulated in cells exposed to aged QDs, especially Thick and Thin shell QDs for IL8 and Thick and Gradient shell QDs for TNF $\alpha$  (Fig. 5D), suggesting the onset of an inflammatory response. IL8 and TNF $\alpha$  mRNA expression were also up regulated, in cells exposed to zinc acetate and indium acetate and the mixture of both (Fig. 5F).

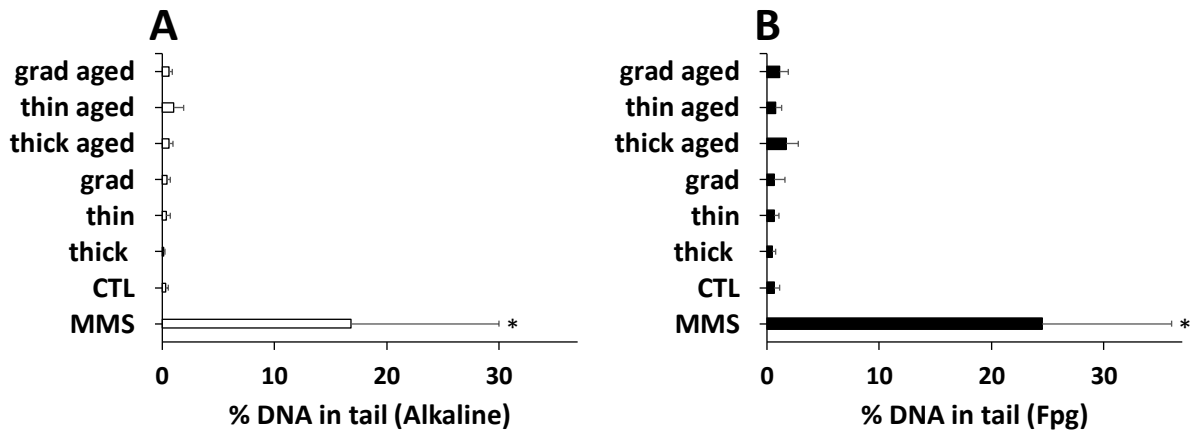
### Genotoxicity

Since oxidative stress triggers damage to biomolecules, especially DNA, we evaluated the impact of these three QDs on DNA integrity. First DNA strand breaks, alkali-labile sites and Fpg-sensitive sites were assessed in exposed cells using the comet assay in its alkaline and Fpg-modified versions. The results show no significant increase of DNA lesions after keratinocytes exposures to QDs, in both cases (Fig. 6A-B). Results after zinc and indium acetate exposures were also negative (Fig. S4).

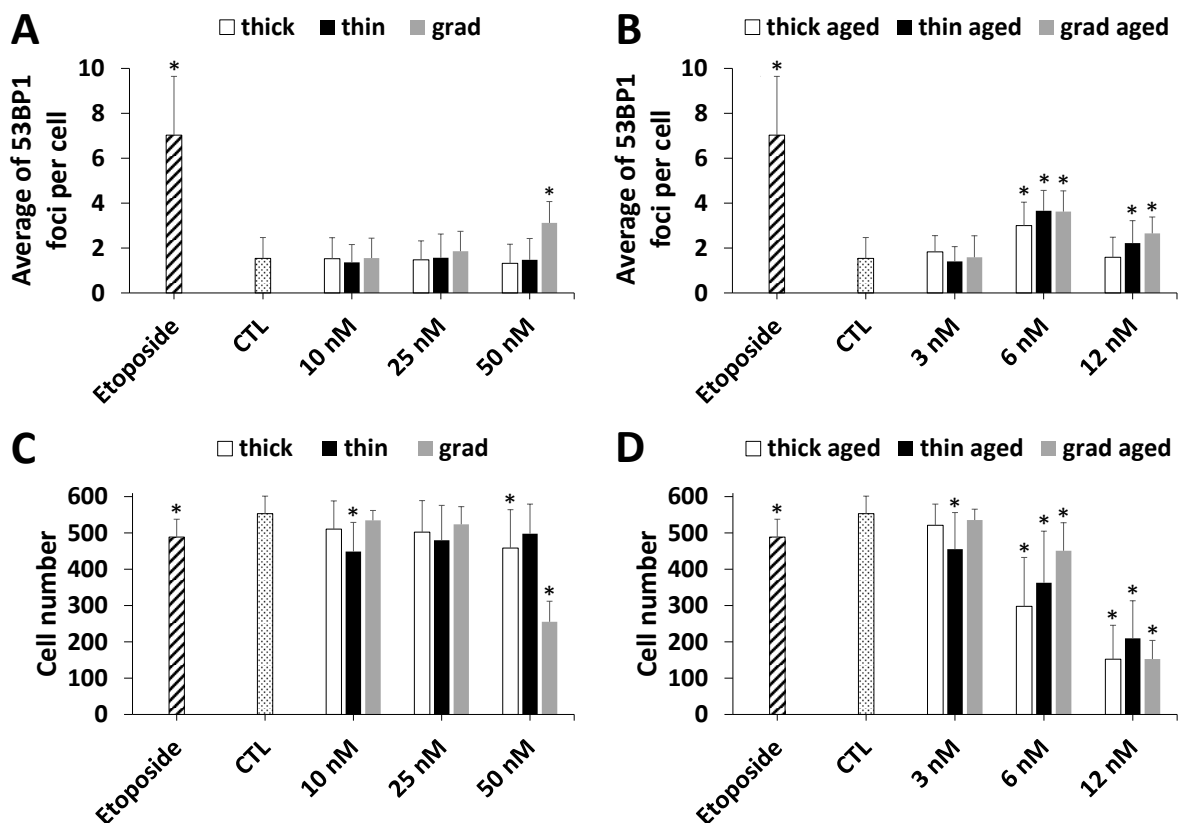
53BP1 is one of the first proteins recruited on the site of double-strand DNA breaks. Like  $\gamma$ H2AX, it can be considered as an early genotoxic biomarker of several types of oxidative DNA lesions or lesions resulting from DNA alkylation, including single-strand breaks, double-strand breaks, bulky adducts, lesions blocking DNA replication or transcription (Panier and Boulton, 2014). We used 53BP1 immunostaining to probe the presence of these lesions in cells exposed to the three QDs.

Indium and zinc acetate revealed no significant induction of 53BP1 foci (Fig. S5) and among pristine QDs only grad induced a significant elevation of 53BP1 foci count, at the tested highest concentration, i.e. 50 nM (Fig. 7A). Moreover, this increase was associated to a high decrease of number of cells in well (Fig. 7C). By contrast, aged QDs caused significant increase of foci count at 6 nM and 12 nM compared to control cells (Fig. 7B). This was also associated to diminution of number of cells in wells (Fig. 7D).





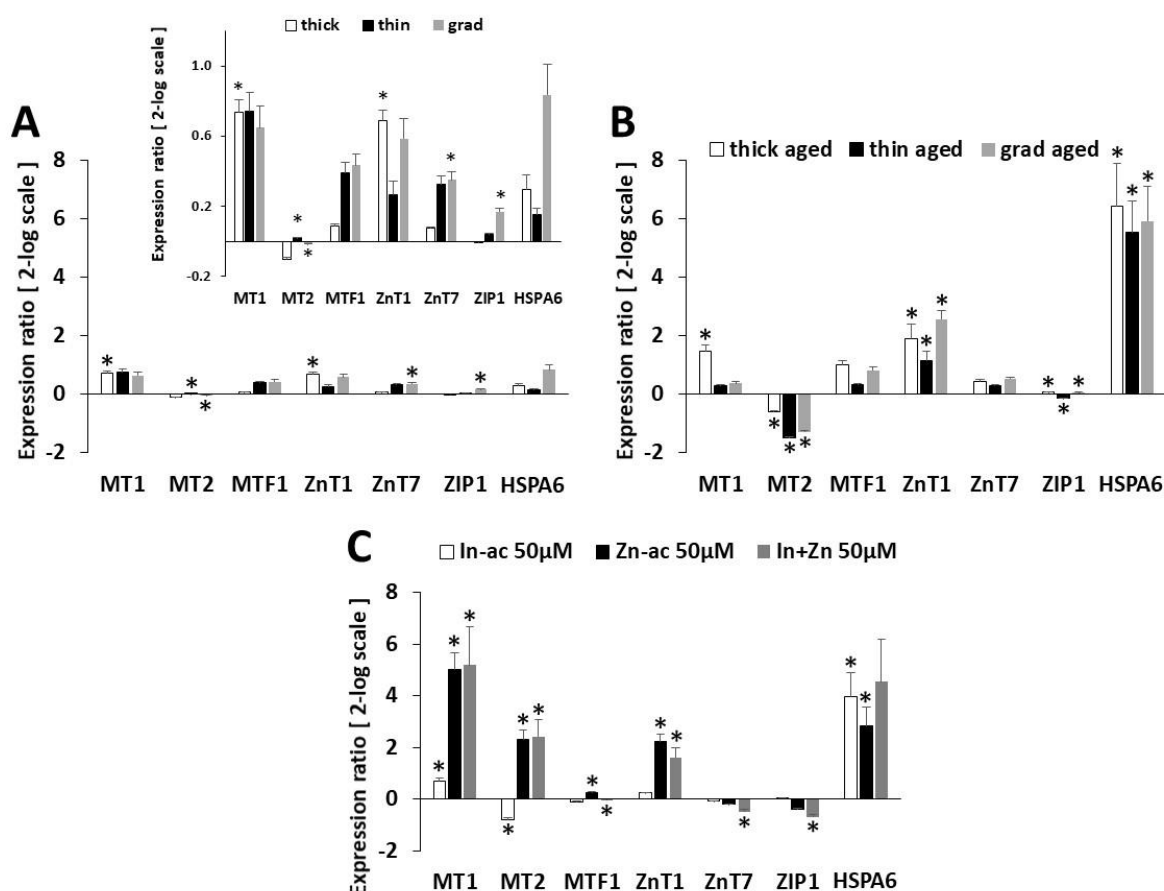
**Fig. 6.** QD genotoxicity, assessed via the comet assay. DNA integrity was assessed via the comet assay in the alkaline version (A) or the Fpg modified version (B). Cells were exposed 24 h to 25 nM of pristine QDs and 3 nM of aged QDs. Methyl methanesulfonate (MMS) 100  $\mu$ M was used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 6 independent experiments, performed on human primary keratinocytes from 3 different donors, with 2 technical replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



**Fig. 7.** QD genotoxicity, assessed via 53BP1 immunostaining. Counting of 53BP1 foci (A-B) and nucleus counting, which reflects cytotoxicity, as assessed via Hoechst 33342 staining and automated counting by HCA (C-D). Cells were exposed 24 h to pristine QDs (A-C) or aged QDs (B-D). Etoposide 100  $\mu$ M was used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 2 independent experiments, performed on human primary keratinocytes

from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.

### Impact of the three QDs on metal homeostasis



**Fig. 8.** Evaluation of keratinocyte zinc homeostasis. This measurement was assessed via RT-qPCR assay. Cells were exposed 24 h to 25 nM of pristine QDs (A), 6.25 nM of aged QDs (B), and 50  $\mu$ M of indium and/or zinc acetate. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of an independent experiment performed on human primary keratinocytes, with 3 biological replicates and 2 technical replicates. Statistical significance:  $p \leq 0.05$ , \*: exposed vs. control.

We previously showed that Gradient shell QDs (although having a different composition) degraded when submitted to accelerated weathering, and released some Zn and In ions (Tarantini et al., 2019). To understand the mechanisms of toxicity observed previously after exposure to aged QDs, expression of several zinc homeostasis genes were quantified by RT-qPCR (Fig. 8). Not clear over or under regulation were highlighted after pristine QDs exposure (Fig. 8A), whereas aged QDs induce clear overexpression of ZnT1 and HSPA6 associated to underexpression of MT2 into keratinocytes for the three kind of QDs. This underexpression of MT2 were also observed after indium acetate exposure and the overexpression of ZnT1 were observed after zinc acetate exposure (Fig. 8C).

## Discussion

In this study, we show that three InP QDs, developed to be safer by design, induce a toxic response in human primary keratinocytes that depends upon the composition of the QD and its physico-chemical state, i.e., pristine vs. degraded following accelerated weathering, *in vitro*. In brief, the two pristine double-shell QDs tested here cause no adverse outcome in keratinocytes while pristine gradient shell QD causes cytotoxicity at high concentration, increases the intracellular ROS level and the number of 53BP1 foci, reflecting oxidative damage to DNA. In contrast, all three aged QDs show much more intense toxicity, with significant cytotoxicity, genotoxicity, perturbation of cell redox metabolism and inflammatory response. Both pristine and aged QDs significantly dysregulate metal homeostasis and particularly Zn homeostasis, with aged QDs dysregulating it more intensely than pristine QDs.

When considering the cytotoxicity of these nanocrystals, measurement of keratinocyte metabolic activity with the WST-1 assay and of membrane damage with LDH leakage reveal the same results, i.e. significant and greater toxicity of aged QDs as compared to pristine QDs. We already reported such result with other InZnP/Zn(Se,S) QDs with a different composition and correlated it to the release of the toxic chemical elements contained in QDs due to photodegradation of the InZnP and InZnSP structure (Tarantini et al., 2019). Moreover, the oxidation of InP/ZnS QDs can be accelerated by lysosomal condition and leads to dissolution and the release of indium and zinc ions (Brunetti et al., 2013). This would explain why among the three pristine QDs only the QD with a single gradient shell shows significant toxicity, this QD being the one that is the least protected from lysosomal conditions when accumulated in cells, due to its single shell. This confirms the results reported by Chibli et al., which show reduced cytotoxicity of double shell as compared to single shell InP/ZnS QDs (Chibli et al., 2011). We observe cytotoxicity of InZnP/Zn(Se,S) QDs at 100 nM. For comparison, Soenen et al reported cytotoxicity of InP/ZnS QDs at concentrations higher than 80 nM (Soenen et al., 2014). Chen et al. do not observe any cytotoxicity of InP/ZnS QDs after 24 h of exposure to up to 160 µg/mL of QDs (Chen et al., 2018) and Chibli et al. observe cytotoxicity at 100-500 nM depending on the tested cell line (Chibli et al., 2011). In the two latter studies, the use of a different metrics and different exposure conditions makes it difficult to compare these results to ours but, overall, the cytotoxicity observed here with InZnP/Zn(Se,S) and InZnP/Zn(Se,S)/ZnS QDs is comparable to that observed for InP/ZnS QDs. The results presented here show that capping these QDs with a ZnS shell on top of the gradient Zn(Se,S) shell is not sufficient to completely abolish QDs degradation in harsh environmental conditions

(the aging conditions used here simulate exposure to full spectrum sunlight one sunny day at noon). It results in QDs that totally degrade and release potentially toxic  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and selenium ions. Importantly, this second shell made of ZnS increases the QD Zn content and our result suggest that Zn plays a major role in the toxicity of these QDs. Indeed, due to its pleiotropic function in cells (Maret, 2019), the intracellular Zn content is finely tuned with concentrations not exceeding a few picomolars (Simons, 1991). Exposure of cells to Zn-containing nanoparticles, such as the QDs tested in the present study, results in the accumulation of Zn in cells by endocytosis (Oh and Park, 2014), i.e., following a much less controlled entry route than the physiological accumulation via the ZnT1 transporter. Consequently, cells are in a situation of Zn overload, which is detrimental to their proper function (Maret, 2019). The cellular response to exposure to aged QDs, characterized by perturbation of the oxidative balance and Zn homeostasis, particularly with the obvious activation of the MTF1 transcription factor that further induces mRNA expression of metallothioneins and ZnT transporters, is a typical response to a Zn overload (for example, see (Emri et al., 2015)). We can therefore infer that our strategy consisting in coating InPZn QDs with a double shell of inorganic material is an effective “safer by design” strategy, but that it still does not deliver safe-by-design QDs. We previously reported that the adjunction of a third shell made of alumina protected much more efficiently the QDs from degradation (Wegner et al., 2019); this strategy will be investigated further in the future.

Noteworthy, the induction of MT1 and MT2 mRNA expression observed in cells exposed to QDs differs from the typical response to Zn exposure, which induces upregulation of both MT1 and MT2, as shown in this study in cells exposed to Zn-acetate and as reported previously by others (Emri et al., 2015). The regulation of MT expression is acknowledged to depend upon the ions to which cells have been exposed (Murata et al., n.d.; Sims et al., 2012). Here we observe upregulation of MT1 and downregulation of MT2, as also observed in cells exposed to indium-acetate. The cellular response to indium ions is poorly documented so far; this transcriptional profile of MT1 and MT2 could be a typical feature of the cell response to this heavy metal.

Regarding our TEM observations, we confirm that pristine and aged InZnP/Zn(Se,S) and InZnP/Zn(Se,S)/ZnS QDs are able to penetrate cells, which has also been previously described for InP/ZnS QDs, either single or double shell (Brunetti et al., 2013; Chibli et al., 2011; Chen et al., 2018) and for InZnP/Zn(Se,S) with a different In/Zn ratio as those used here (Tarantini et al., 2019). We did not observe any accumulation in the cell nucleus, QDs stayed located at

the periphery of the nuclear envelope, as previously reported for InP/ZnS QDs (Brunetti et al., 2013; Chen et al., 2018). The use of electron microscopy for observing QDs distribution inside cells revealed that QDs were located in cytoplasmic compartments, as large agglomerates. This agglomerated state could be due to the presence of serum proteins in the cell culture medium that triggered QDs agglomeration prior to their cellular accumulation, or to their progressive accumulation in cytoplasmic compartments after being internalized in cells as isolated QDs. Most nanoparticles are internalized in cells via endocytosis and stored in cytoplasmic vesicles (Oh and Park, 2014), which is the intracellular distribution that we observe here.

## Conclusion

This study aimed to compare the toxicity of three kind of shell design InZnP QDs in order to develop safer by design compounds. The presence of a double shell of ZnS seems to be a good way to safer QDs compare to single shell. Toxicity is not highlighted by pristine double shell QDs. However, after aging under simulated sunlight, QDs are degraded and become very toxic, particularly Thick shell probably because they are dissolved and have more ZnS than two other QDs. They induce decrease of cell viability, generation of double-strand breaks DNA damages, increase of oxidative stress associated to inflammation and modification to zinc homeostasis. These results confirm that a careful shell design of QDs can reduce their toxicity but does not prevent them from aging. These aging are probably responsible of accelerated oxidation and dissolution of QDs, which permit the release of toxic indium and zinc ions.

## Acknowledgements

This work is a contribution to the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) funded by the French Government's "Investissements d'Avenir" ANR program, through the A\*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). It was supported by Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA) and the French Environment and Energy Management Agency (ADEME). The authors thank the TEM platform of Institute of Structural Biology (IBS) to TEM experiments.

## References

- Anas, A., Akita, H., Harashima, H., Itoh, T., Ishikawa, M., Biju, V., 2008. Photosensitized Breakage and Damage of DNA by CdSe–ZnS Quantum Dots. *J. Phys. Chem. B* 112, 10005–10011. <https://doi.org/10.1021/jp8018606>
- Armand, L., Tarantini, A., Beal, D., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Sorieul, S., Pernet-Gallay, K., Marie-Desvergne, C., Lynch, I., Herlin-Boime, N., Carriere, M., 2016. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 10, 913–923. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1141338>
- Bottrill, M., Green, M., 2011. Some aspects of quantum dot toxicity. *Chem. Commun.* 47, 7039. <https://doi.org/10.1039/c1cc10692a>
- Brown, R.P., Gallagher, M.J., Fairbrother, D.H., Rosenzweig, Z., 2018. Synthesis and Degradation of Cadmium-Free InP and InPZn/ZnS Quantum Dots in Solution. *Langmuir* 34, 13924–13934. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02402>
- Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengo, R., Galeone, A., Malvindi, M.A., Vecchio, G., Cingolani, R., Nadeau, J.L., Pompa, P.P., 2013. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. *Nanoscale* 5, 307–317. <https://doi.org/10.1039/C2NR33024E>
- Chen, S., Chen, Yajing, Chen, Yenhua, Yao, Z., 2019. InP/ZnS Quantum Dots Cause Inflammatory Response in Macrophages Through Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative stress. *Int. J. Nanomedicine* Volume 14, 9577–9586. <https://doi.org/10.2147/IJN.S218748>
- Chen, T., Li, L., Xu, G., Wang, X., Wang, J., Chen, Y., Jiang, W., Yang, Z., Lin, G., 2018. Cytotoxicity of InP/ZnS Quantum Dots With Different Surface Functional Groups Toward Two Lung-Derived Cell Lines. *Front. Pharmacol.* 9, 763. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00763>
- Chevallet, M., Gallet, B., Fuchs, A., Jouneau, P.H., Um, K., Mintz, E., Michaud-Soret, I., 2016. Metal homeostasis disruption and mitochondrial dysfunction in hepatocytes exposed to sub-toxic doses of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale* 8, 18495–18506. <https://doi.org/10.1039/C6NR05306H>

- Chibli, H., Carlini, L., Park, S., Dimitrijevic, N.M., Nadeau, J.L., 2011. Cytotoxicity of InP/ZnS quantum dots related to reactive oxygen species generation. *Nanoscale* 3, 2552. <https://doi.org/10.1039/c1nr10131e>
- Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N., 2004. Probing the Cytotoxicity Of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* 4, 11–18. <https://doi.org/10.1021/nl0347334>
- Emri, E., Miko, E., Bai, P., Boros, G., Nagy, G., Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G., 2015. Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes. *Metallomics* 7, 499–507. <https://doi.org/10.1039/C4MT00287C>
- Fitzpatrick, T.B., 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124, 869–871. <https://doi.org/10.1001/archderm.124.6.869>
- IARC, 1993. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 58. pp. 119-237.
- Ipe, B.I., Lehnig, M., Niemeyer, C.M., 2005. On the Generation of Free Radical Species from Quantum Dots. *Small* 1, 706–709. <https://doi.org/10.1002/sml.200500105>
- Karabanovas, V., Zakarevicius, E., Sukackaite, A., Streckyte, G., Rotomskis, R., 2008. Examination of the stability of hydrophobic (CdSe)ZnS quantum dots in the digestive tract of rats. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 7, 725–729. <https://doi.org/10.1039/b707920f>
- Li, L., Chen, Y., Xu, G., Liu, D., Yang, Z., Chen, T., Wang, X., Jiang, W., Xue, D., Lin, G., 2020. In vivo Comparison of the Biodistribution and Toxicity of InP/ZnS Quantum Dots with Different Surface Modifications. *Int. J. Nanomedicine Volume 15*, 1951–1965. <https://doi.org/10.2147/IJN.S241332>
- Lin, C.-H., Yang, M.-H., Chang, L.W., Yang, C.-S., Chang, H., Chang, W.-H., Tsai, M.-H., Wang, C.-J., Lin, P., 2011. Cd/Se/Te-based quantum dot 705 modulated redox homeostasis with hepatotoxicity in mice. *Nanotoxicology* 5, 650–663. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.539712>
- Lin, G., Chen, T., Pan, Y., Yang, Z., Li, L., Yong, K., Wang, X., Wang, J., Chen, Y., Jiang, W., Weng, S., Huang, X., Kuang, J., Xu, G., 2020. Biodistribution and acute toxicity of cadmium-free quantum dots with different surface functional groups in mice following intratracheal inhalation. *Nanotheranostics* 4, 173–183. <https://doi.org/10.7150/ntno.42786>
- Lin, G., Ouyang, Q., Hu, R., Ding, Z., Tian, J., Yin, F., Xu, G., Chen, Q., Wang, X., Yong, K.-T., 2015. In vivo toxicity assessment of non-cadmium quantum dots in BALB/c mice. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.10.002>
- Liu, Jing, Hu, R., Liu, Jianwei, Zhang, B., Wang, Y., Liu, X., Law, W.-C., Liu, L., Ye, L., Yong, K.-T., 2015. Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models. *Mater. Sci. Eng. C* 57, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.044>
- Maret, W., 2019. The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radic. Biol. Med.* 134, 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.006>
- Morse, D., Choi, A.M.K., 2002. Heme Oxygenase-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 8–16. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.27.1.4862>

- Mortensen, L.J., Faulknor, R., Ravichandran, S., Zheng, H., DeLouise, L.A., 2015. UVB Dependence of Quantum Dot Reactive Oxygen Species Generation in Common Skin Cell Models. *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, 1644–1652. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2093>
- Mortensen, L.J., Ravichandran, S., DeLouise, L.A., 2012. The impact of UVB exposure and differentiation state of primary keratinocytes on their interaction with quantum dots. *Nanotoxicology* 7, 1244–1254. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.733437>
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., Douki, T., 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13765–13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604213103>
- Murata, M., Gong, P., Suzuki, K., Koizumi, S., n.d. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes 9.
- Nishito, Y., Kambe, T., 2019. Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. *J. Biol. Chem.* jbc.RA119.010227. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010227>
- Oh, N., Park, J.-H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- O'Hara, A.M., Bhattacharyya, A., Bai, J., Mifflin, R.C., Ernst, P.B., Mitra, S., Crowe, S.E., 2009. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: Role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. *Cytokine* 46, 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.03.010>
- Panier, S., Boulton, S.J., 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Reiss, P., Carrière, M., Lincheneau, C., Vaure, L., Tamang, S., 2016. Synthesis of Semiconductor Nanocrystals, Focusing on Nontoxic and Earth-Abundant Materials. *Chem. Rev.* 116, 10731–10819. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00116>
- Schwarz-Plaschg, C., Kallhoff, A., Eisenberger, I., 2017. Making Nanomaterials Safer by Design? *NanoEthics* 11, 277–281. <https://doi.org/10.1007/s11569-017-0307-4>
- Simons, T.J., 1991. Intracellular free zinc and zinc buffering in human red blood cells. *J. Membr. Biol.* 123, 63–71. <https://doi.org/10.1007/BF01993964>
- Sims, H.I., Chirn, G.-W., Marr, M.T., 2012. Single nucleotide in the MTF-1 binding site can determine metal-specific transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16516–16521. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207737109>
- Soenen, S.J., Manshian, B.B., Aubert, T., Himmelreich, U., Demeester, J., De Smedt, S.C., Hens, Z., Braeckmans, K., 2014. Cytotoxicity of Cadmium-Free Quantum Dots and Their Use in Cell Bioimaging. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1050–1059. <https://doi.org/10.1021/tx5000975>
- Tarantini, A., Wegner, K.D., Dussert, F., Sarret, G., Beal, D., Mattera, L., Lincheneau, C., Proux, O., Truffier-Boutry, D., Moriscot, C., Gallet, B., Jouneau, P.-H., Reiss, P., Carrière, M., 2019. Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots



- aged in environmental conditions: A safer by design evaluation. *NanoImpact* 14, 100168. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100168>
- Thuy, U.T.D., Reiss, P., Liem, N.Q., 2010. Luminescence properties of In(Zn)P alloy core/ZnS shell quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* 97, 193104. <https://doi.org/10.1063/1.3515417>
- Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H., Takeuchi, S., Mitoma, C., Moroi, Y., Furue, M., 2011. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* 62, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.10.017>
- Wegner, K.D., Dussert, F., Truffier-Boutry, D., Benayad, A., Beal, D., Mattera, L., Ling, W.L., Carrière, M., Reiss, P., 2019. Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity. *Front. Chem.* 7, 466. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00466>
- Weydert, C.J., Cullen, J.J., 2010. MEASUREMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE. *Nat. Protoc.* 5, 51–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.197>
- Wiecinski, P.N., Metz, K.M., Mangham, A.N., Jacobson, K.H., Hamers, R.J., Pedersen, J.A., 2009. Gastrointestinal biodurability of engineered nanoparticles: Development of an in vitro assay. *Nanotoxicology* 3, 202–214. <https://doi.org/10.1080/17435390902859556>
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Eds.), 2006. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press, Lyon, France : Geneva, Switzerland.
- Yaghini, E., Turner, H., Pilling, A., Naasani, I., MacRobert, A.J., 2018. In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 14, 2644–2655. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.07.009>

## Supplementary data

**Table S1.** Primers sequences for RT-qPCR experiments.

	Forward primer	Reverse primer
<b>Reference genes</b>		
<b>CycloA</b>	5'-TTC-ATC-TGC-ACT-GCC-AAG-AC-3'	5'-TCG-AGT-TGT-CCA-CAG-TCA-G-3'
<b>S18</b>	5'-AAC-GTC-TGC-CCT-ATC-AAC-TTT-3'	5'-TGG-ATG-TGG-TAG-CCG-TTT-TCT-3'
<b>GADPH</b>	5'-GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-GTC-GT-3'	5'-TTG-ATT-TTG-GAG-GGA-TCT-CG-3'
<b>Oxidative stress</b>		
<b>SOD1</b>	5'-AGG-GCA-TCA-TCA-ATT-TCG-AG-3'	5'-ACA-TTG-CCC-AAG-TCT-CCA-AC-3'
<b>SOD2</b>	5'-TCC-ACT-GCA-AGG-AAC-AAC-AG-3'	5'-TCT-TGC-TGG-GAT-CAT-TAG-GG-3'
<b>GPX1</b>	5'-CCA-GTC-GGT-GTA-TGC-CTT-CT-3'	5'-CTC-TTC-GTT-CTT-GGC-GTT-CT-3'
<b>CAT</b>	5'-AGC-TTA-GCG-TTC-ATC-CGT-GT-3'	5'-TCC-AAT-CAT-CCG-TCA-AAA-CA-3'
<b>HO-1</b>	5'-TTC-TCC-GAT-GGG-TCC-TTA-CAC-T-3'	5'-GGC-ATA-AAG-CCC-TAC-AGC-AAC-T-3'
<b>Zinc homeostasis</b>		
<b>MT1</b>	5'-GCT-TCT-CCT-TGC-CTC-GAA-3'	5'-TGA-CGT-CCC-TTT-GCA-GAT-3'
<b>MT2</b>	5'-TGC-ATT-TGC-ACT-CTT-TGC-AT-3'	5'-TCT-TCA-GCT-CGC-CAT-GGA-T-3'
<b>ZnT1</b>	5'-CGC-AGC-CAT-GGG-GTG-TTG-GG-3'	5'-CAT-CGC-CAG-CGA-CGA-GGT-CA-3'
<b>ZnT2</b>	5'-AAC-TTT-GGC-TGG-CAG-AGA-GC-3'	5'-TGG-TGA-AGG-GTC-AAC-CCC-AT-3'
<b>ZnT7</b>	5'-GTG-CCT-GAA-CCT-CTC-TTT-CG-3'	5'-CGG-AAA-TCA-GCC-TAA-GCA-G-3'
<b>ZIP1</b>	5'-GCC-AGG-AGC-TAA-CCA-TGA-AG-3'	5'-ATG-GCC-AGG-ATG-AAC-TCT-TG-3'
<b>MTF1</b>	5'-CGA-AGG-AGA-AGC-CAT-TTG-AG-3'	5'-ATT-TGC-TGC-AGC-CTT-CAG-AT-3'
<b>HSPA6</b>	5'-AGG-AGG-TGG-AGA-GGA-TGG-TT-3'	5'-TGT-CCT-CTT-CGG-GAA-TCT-TG-3'
<b>Inflammation</b>		
<b>GCLM</b>	5'-AGT-CCT-TGG-AGT-TGC-ACA-GC-3'	5'-ACA-CAG-CAG-GAC-GCA-AGA-TT-3'
<b>IL1<math>\beta</math></b>	5'-ACA-GAT-GAA-GTG-CTC-CTT-CCA-3'	5'-GTC-GGA-GAT-TCG-TAG-CTG-GAT-3'
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5'-GAG-CAG-TGA-AAG-CAT-GAT-CC-3'	5'-CGA-GAA-GAT-GAT-CTG-ACT-GCC-3'
<b>IL6</b>	5'-TCT-CCA-CAA-GCG-CCT-TCG-3'	5'-CTC-AGG-GCT-GAG-ATG-CCG-3'
<b>IL8</b>	5'-GAA-TGG-GTT-TGC-TAG-AAT-GTG-ATA-3'	5'-CAG-ACT-AGG-GTT-GCC-AGA-TTT-AAC-3'
<b>IL10</b>	5'-CAT-CGA-TTT-CTT-CCC-TGT-GAA-3'	5'-TCT-TGG-AGC-TTA-TTA-AAG-GCA-TTC-3'

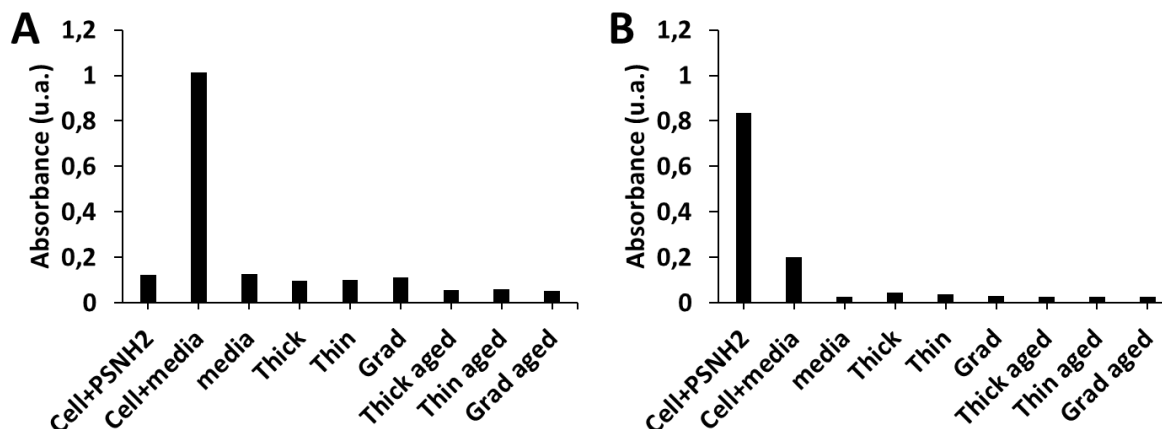


Fig. S1. Interference of QDs with WST1 (A) and LDH (B) reagents.

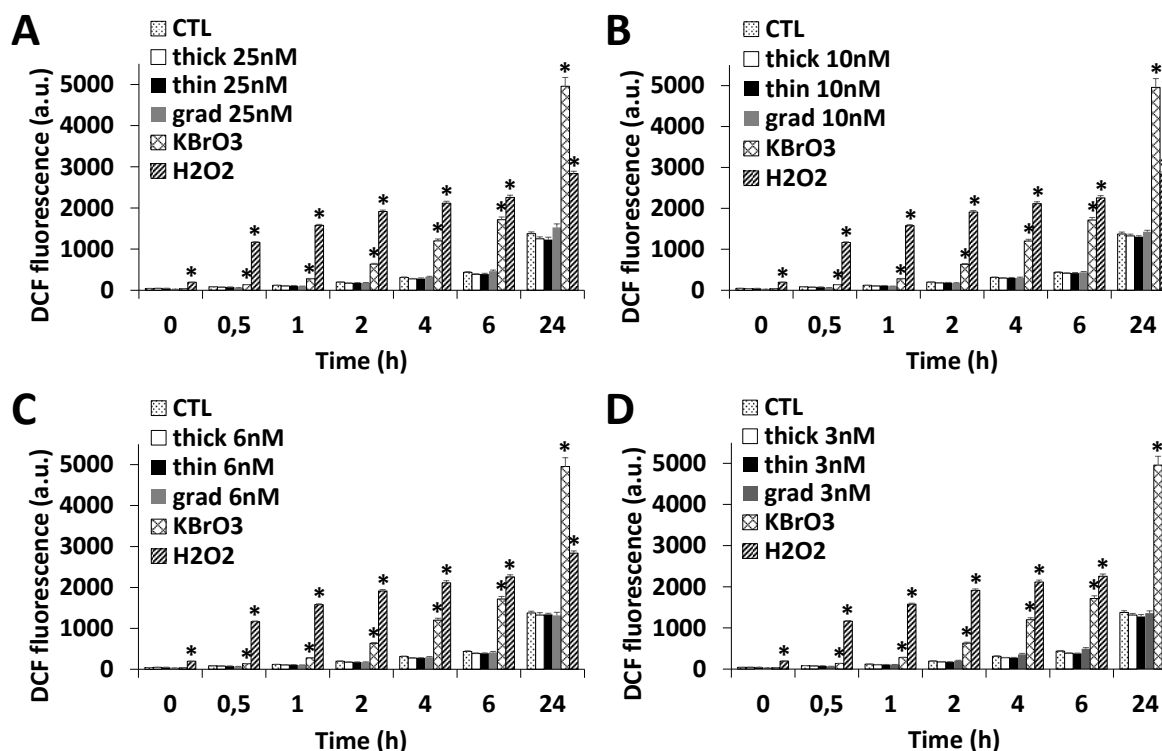
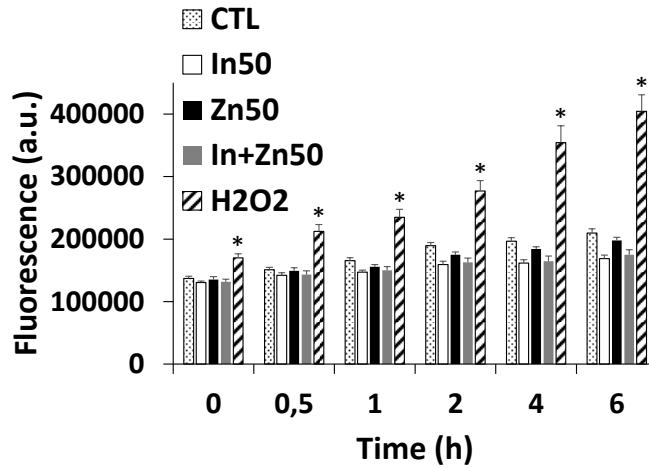
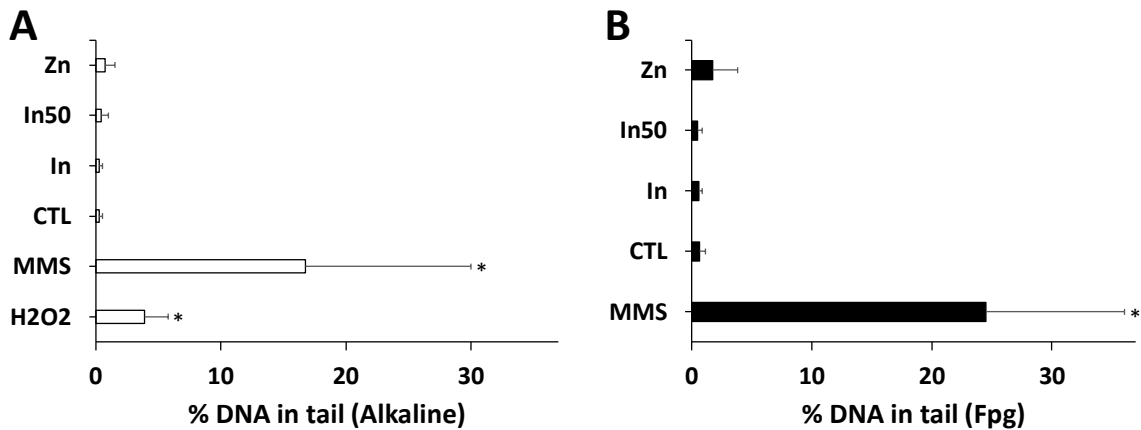


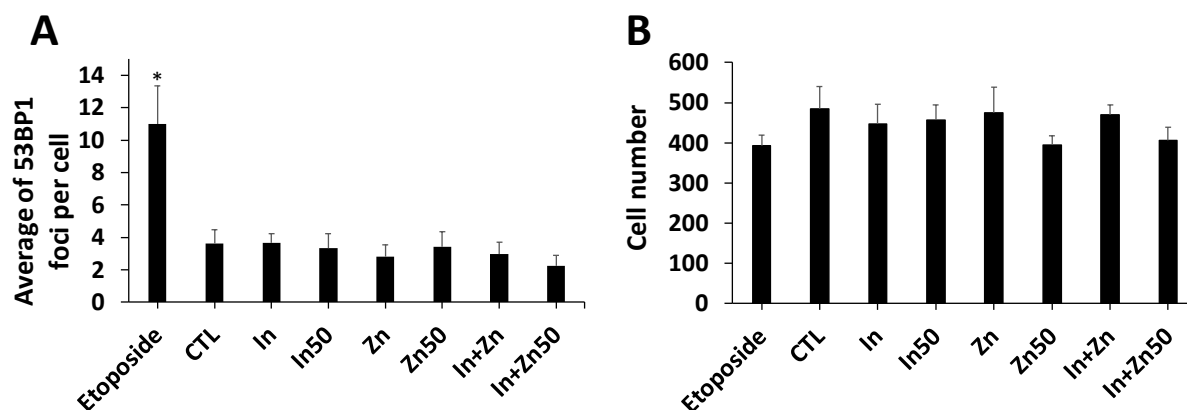
Fig. S2. Accumulation of reactive oxygen species into keratinocytes after exposure to the InZnP QDs. ROS measurement was assessed via H<sub>2</sub>DCFDA assay for QDs exposure and cells were exposed 24 h to 25 or 10 nM of pristine (A-B) and 6 or 3 nM of aged QDs (C-D). 500  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 1 mM of KBrO<sub>3</sub> were used as positive controls. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of two independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



**Fig. S3.** Accumulation of reactive oxygen species into keratinocytes after exposure to indium and/or zinc acetate. ROS measurement was assessed via DHR 123 and cells were exposed 24 h to 50  $\mu$ M of indium, 50  $\mu$ M of zinc or a mix of both (C). 500  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of two independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



**Fig. S4.** DNA integrity after exposure to indium acetate (In) and zinc acetate (Zn), assessed via the comet assay in the alkaline version (A) or the Fpg modified version (B). Cells were exposed 24 h to 3.75 nM or 50 nM of indium acetate and 15 nM of zinc acetate. Methyl methanesulfonate (MMS) 100  $\mu$ M and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M were used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 6 independent experiments, performed on human primary keratinocytes from 3 different donors, with 2 technical replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.



**Fig. S5.** DNA double-strand breaks induced by indium acetate (In) and zinc acetate (Zn), assessed via the 53BP1 immunostaining (A) associated to nucleus counting via Hoechst 33342 staining in HCA (B). Cells were exposed 24 h to 3.75 nM or 50 nM of indium, 15 nM or 50 nM of zinc or a mix of both at this same concentration. Etoposide 100  $\mu$ M was used as a positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 2 independent experiments, performed on human primary keratinocytes from different donors, with 5 replicates per experiment. Statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.

### 3. Résultats complémentaires (étude protéomique)

En complément de ces études ciblées, nous avons réalisé une étude protéomique sur des kératinocytes primaires humains exposées à des QDs Gradient, Thin et Thick, soit bruts de synthèse (exposition à 25 nM pendant 24 h) soit après vieillissement accéléré en enceinte climatique (exposition à 3 nM pendant 24 h). L'analyse protéomique par spectrométrie de masse *shotgun* a permis d'obtenir des valeurs « d'intensité de protéines », proportionnelles au niveau d'expression dans chaque échantillon. Plus précisément, pour chacune des protéines détectées, une valeur normalisée lui est attribuée en fonction de son intensité dans l'échantillon étudié. Ces valeurs étant bruitées, une transformation en  $\log_2$  est effectuée pour le traitement des données dans la suite de l'analyse.

#### 3.1. Analyse par classification globale

Des algorithmes permettent de regrouper les échantillons analysés en fonction de leurs similarités en intégrant toutes les données de protéomique. Pour cela, il existe plusieurs logiciels qui calculent des « distances » ou « dissimilarités » entre les paires d'échantillons, en se basant sur les valeurs d'intensité des protéines. Dans ce travail, nous avons utilisé le logiciel PAST. Chaque protéine  $i$  est retrouvée dans une certaine quantité dans la condition  $j$  ( $X_{ji}$ ) et une autre quantité dans la condition  $k$  ( $X_{ki}$ ). La distance  $D_{jk}$  entre l'échantillon  $j$  et l'échantillon  $k$  est calculée au moyen de toutes les valeurs de toutes les protéines présentes dans l'échantillon  $j$  (les

X<sub>ji</sub>) et de toutes les valeurs des mêmes protéines mais dans l'échantillon k (les X<sub>ki</sub>). Plusieurs méthodes permettent de calculer des distances entre les échantillons, basées sur différents algorithmes. La distance euclidienne est la plus simple et n'est pas normalisée, par conséquent elle donne plus de poids aux protéines abondantes. Au contraire, la distance de Gower, utilisée dans ces travaux de thèse, est calculée après normalisation du niveau d'expression des protéines. Une fois les distances obtenues entre toutes les paires d'échantillons, les programmes de *clustering* les utilisent pour regrouper les échantillons en classes au sein desquelles les distances sont faibles. Deux types de représentations de ces classes sont présentées ci-dessous. Bien que très performant, ce regroupement d'échantillons en fonction des distances ne tient pas compte des connaissances biologiques. Il permet néanmoins d'identifier globalement les conditions dans lesquelles les effets les plus marqués sont observés. Il s'ensuit une caractérisation fonctionnelle permettant de rechercher les mécanismes cellulaires à l'origine de ces différences.

### 3.1.1. L'échelle multidimensionnelle non-métrique (MDS)

La représentation MDS présentée dans la Figure 45, est une carte en deux dimensions. Le principe est que plus les points sont proches sur la surface 2D, plus leur distance est faible, et donc, plus ils sont apparentés. Pour chaque échantillon, les quatre réplicats sont représentés par quatre points d'une même couleur, reliés entre eux.

Dans les résultats présentés ci-dessous, les quatre échantillons exposés aux QDs Thick shell vieillis (E-V, en orange sur la figure) se différencient des autres échantillons. Cette représentation ne met pas en évidence de différence notable entre les autres échantillons, qui sont tous proches. Toutefois, les échantillons ayant subi différentes expositions sont tous différents des cellules contrôles qui n'ont pas été traitées. Pour pouvoir émettre plus d'hypothèses, une représentation par regroupement hiérarchique est réalisée.

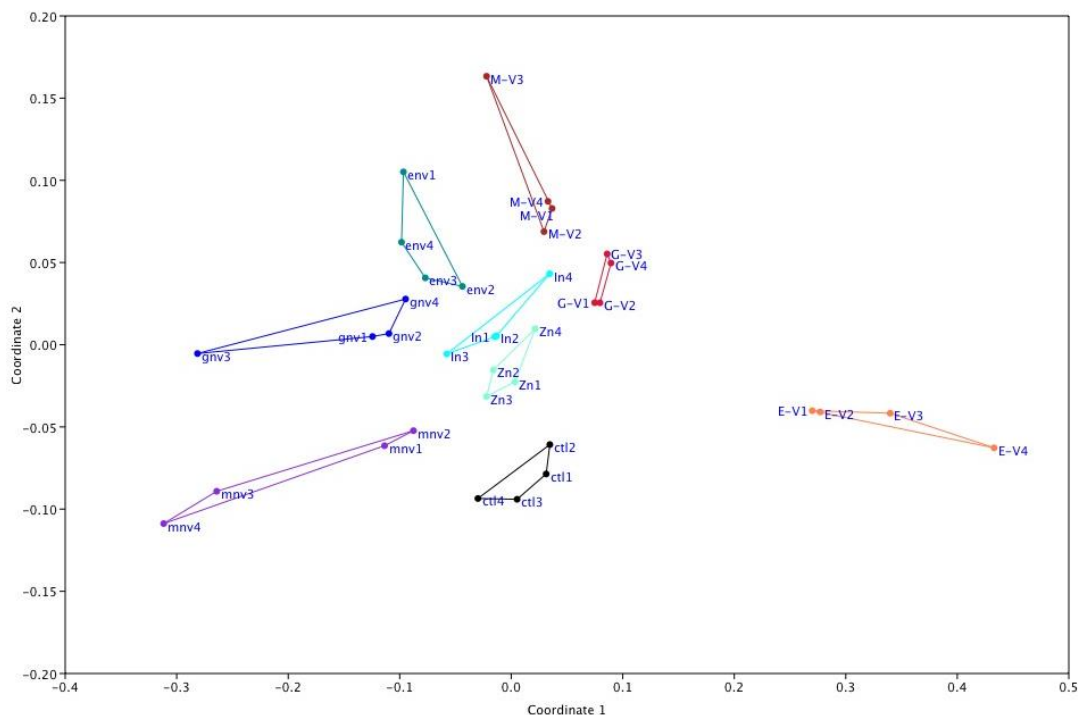


Figure 45 : Représentation MDS en 2D des échantillons analysés en protéomique en fonction de leur similarité. Les kératinocytes primaires humains ont été exposés aux ions indium ou zinc ainsi qu’aux QDs Thick, Thin et Gradient shell en condition non vieillis ou vieillis 24 h en enceinte climatique, avec quatre répliquats par condition. **Ctl** : cellules contrôle, non exposées ; **env** : Thick shell non vieillis ; **E-V** : Thick shell vieillis ; **mnv** : Thin shell non vieillis ; **M-V** : Thin shell vieillis ; **gnv** : Gradient shell non vieillis ; **G-V** : Gradient shell vieillis ; **In** : acétate d’indium ; **Zn** : acétate de zinc.

### 3.1.2. Le clustering hiérarchique

Le regroupement hiérarchique, présenté dans la Figure 46, aboutit à une représentation en dendrogramme ou diagramme en clusters. Le principe est que plus le point de branchement est bas sur le diagramme, plus la distance entre les échantillons est grande et donc plus ils sont différents. Autrement dit, les échantillons qui ont une distance faible entre eux ont une similarité élevée et sont donc regroupés. C’est le cas pour tous les répliquats d’échantillons de chaque condition d’exposition, qui sont tous regroupés entre eux avec les distances les plus faibles.

Dans les résultats présentés ci-dessous, le premier branchement est entre les cellules exposées aux QDs Thick shell vieillis et toutes les autres conditions. Le second sépare les autres QDs vieillis de tous les autres échantillons. Ensuite, le point de branchement suivant sépare les cellules contrôles de toutes les conditions restantes (exposition aux QDs non vieillis et aux ions In et Zn).

Cette représentation permet de mieux observer les différences entre les échantillons en comparaison avec la représentation MDS. Le but de cette étape est de sélectionner des paires d'échantillons et ainsi des hypothèses de travail pour l'analyse de ces données.

L'objectif de ces travaux est de concevoir des QDs plus sûrs avec de meilleures propriétés optiques. Pour cela, ils ont été recouverts d'une deuxième coquille de ZnS plus ou moins épaisse. Les QDs Thick shell (double coquille épaisse) sont les candidats sur lesquels repose le plus d'espoir en raison de leurs propriétés optiques puisqu'ils fluorescent plus que les autres et de leur conception « *safer by design* » puisque la double coquille épaisse protège davantage le cœur d'InP en comparaison à la simple coquille (Gradient shell). De plus, la fluorescence élevée des QDs Thick shell permet de réduire leur concentration tout en conservant les propriétés optiques optimales des produits. Dans un premier temps, nous avons donc choisi de nous focaliser sur un jeu de données constitué des échantillons QDs Thick shell (vieillis et non vieillis) ainsi que des échantillons exposés aux ions indium et zinc, en comparaison aux cellules contrôles. Les autres données feront l'objet d'un travail futur. Les questions que nous nous sommes posées pour la suite de l'analyse sont les suivantes :

- Quels sont les effets des QDs Thick shell sur les kératinocytes primaires humains ?
- Quel est l'effet du vieillissement de ces QDs ?
- Quels effets des QDs pourraient être attribués aux ions  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  ?



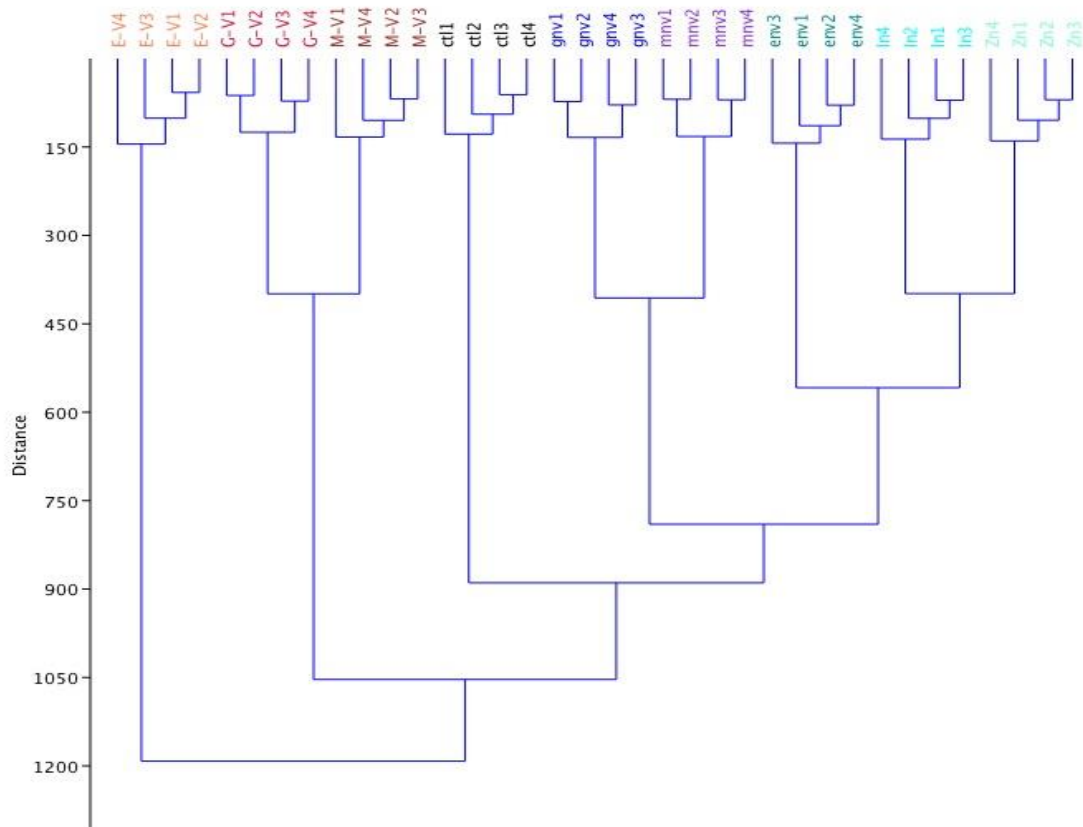


Figure 46 : Représentation en dendrogramme, des échantillons analysés en protéomique en fonction de leur similarité. Les kératinocytes primaires humains ont été exposés aux ions indium ou zinc ainsi qu’aux QDs Thick, Thin et Gradient shell en condition non vieillis ou vieillis 24 h en enceinte climatique, avec quatre réplicats par condition. **ctl** : cellules contrôle, non exposées ; **env** : Thick shell non vieilli ; **E-V** : Thick shell vieilli ; **mnv** : Thin shell non vieilli ; **M-V** : Thin shell vieilli ; **gnv** : Gradient shell non vieilli ; **G-V** : Gradient shell vieilli ; **In** : acétate d’indium ; **Zn** : acétate de zinc.

### 3.2. Exploration fonctionnelle

Cette étape permet l’étude des fonctions des protéines responsables des dissimilarités observées entre les échantillons et permet d’identifier des voies cellulaires associées à ces changements. Pour cela, le logiciel DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) est utilisé (cf. chapitre 2). Sur un total de 2 570 protéines identifiées et analysées en spectrométrie de masse, un certain nombre possède des intensités significativement différentes entre deux conditions testées. Ces dernières sont alors analysées et comparées à des bases de données par le logiciel DAVID, qui les regroupe ensuite par groupe de protéines, spécifiques à des fonctions cellulaires communes appelées termes fonctionnels. Ces fonctions sont aussi regroupées en « cluster » de termes fonctionnels mettant en évidence les grandes voies métaboliques. L’importance de ces clusters est évaluée à l’aide d’un score d’enrichissement qui correspond aux probabilités (p-values) que les groupes de gènes soient attribués aux bons termes fonctionnels au sein du cluster. Pour les analyses, les clusters

sélectionnés sont ceux ayant un score d'enrichissement supérieur à 1 et nous n'avons retenu que les clusters présentant au moins deux termes fonctionnels et dont le FDR (taux de fausse découverte) est inférieur à 10 %.

### 3.2.1. Effets des QDs Thick shell et de leur vieillissement sur les kératinocytes primaires humains

Dans cette première analyse, l'effet des QDs sur les cellules est recherché à travers les 2 570 protéines analysées dans les conditions « Thick shell non vieillis », « Thick shell vieillis » et « contrôles » :

- En ce qui concerne les cellules exposées aux QDs Thick shell **non vieillis**, 735 protéines ont une intensité significativement différente des contrôles ( $p < 0,05$ ), dont 323 avec une intensité inférieure et 412 avec une intensité supérieure à ces derniers (environ autant de diminution que d'augmentation).
- Pour les cellules exposées aux QDs Thick shell **vieillis**, 950 protéines ont une intensité significativement différente des contrôles ( $p < 0,05$ ), dont 652 avec une intensité inférieure et 298 avec une intensité supérieure aux contrôles (environ 1/3 des protéines sont augmentées et 2/3 sont diminuées).

Ces deux séries de données ont ensuite servi à construire 3 listes de protéines permettant de différencier l'effet de l'exposition aux QDs, quel que soit leur état (non vieillis/vieillis), l'effet spécifique des QDs non vieillis et l'effet spécifique des QDs vieillis.

L'évaluation de l'effet des QDs Thick shell, qu'ils soient pristine ou vieillis, sur les kératinocytes : Cette analyse s'intéresse aux protéines statistiquement différentes des contrôles dans les deux conditions (QDs vieillis et QDs non vieillis) et dont la réponse varie dans le même sens (augmentation ou diminution par rapport au contrôle dans les deux cas). Cela forme une première liste de 313 protéines analysées avec le logiciel DAVID. Sur un total de 65 clusters identifiés, nous en avons conservé 18 car ils possèdent un enrichissement  $> 1$  et des  $FDR < 10\%$ . Les grandes fonctions biologiques qui en ressortent sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 4.

L'évaluation de l'effet spécifique des QDs Thick shell non vieillis sur les kératinocytes : Cette analyse s'intéresse aux protéines dont l'expression est statistiquement différente dans les contrôles par rapport aux deux conditions (QDs vieillis et QDs non vieillis) et dont la réponse varie dans un sens opposé (augmentation par rapport au contrôle dans un cas et diminution dans l'autre). A cela sont ajoutées toutes les protéines dont l'expression est statistiquement différente

dans les contrôles, uniquement dans la condition Thick shell **non vieillis**. Cela forme une seconde liste de 422 protéines analysées. Sur un total de 87 clusters, nous en avons conservé 24 (enrichissement > 1 et FDR < 10 %). Les grandes fonctions qui en ressortent sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 4.

L'évaluation de l'effet spécifique des QDs Thick shell vieillis sur les kératinocytes : Comme dans le paragraphe précédent, cette analyse regroupe les protéines statistiquement différentes des contrôles par rapport aux deux conditions (QDs vieillis et QDs non vieillis) et dont la réponse varie dans le sens opposé. A cela sont ajoutées toutes les protéines statistiquement différentes dans les contrôles uniquement dans la condition Thick shell **vieillis**. Cela forme une troisième liste de 637 protéines analysées. Sur un total de 131 clusters, 37 sont conservés (enrichissement > 1 et FDR < 10 %). Les grandes fonctions observées sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Processus biologiques mis en évidence dans chaque cluster après analyse des différentes listes de protéines par le logiciel DAVID, après exposition des kératinocytes aux QDs Thick shell vieillis (V) et non vieillis (NV).

Numéro de cluster	Terme fonctionnel (score d'enrichissement)		
	Commun QDs (V + NV)	Spécifique QDs NV	Spécifique QDs V
1	Adhésion cellulaire (8,76)	Adhésion cellulaire (17,13)	Adhésion cellulaire (25,97)
2	Traduction (6,37)	Liaisons aux nucléotides (10,66)	Mitochondrie (19,13)
3	Epissage (4,42)	Mitochondrie (6,34)	Traduction (7,83)
4	Liaisons à l'ARN (4,38)	Epissage (5,78)	Liaisons aux nucléotides (7,24)
5	Mitochondrie (4,18)	Transport de l'ARN (4,74)	Repliement des protéines (6,96)
6	Epissage (3,62)	Processus oxydo-réduction (redox) NAD (4,73)	Processus redox NAD (4,73)
7	Expression des gènes (3,07)	Déroulement de la structure secondaire de l'ARN (4,33)	Biosynthèse des protéines (5,71)
8	Liaisons à l'ARNr (2,83)	Traduction (3,96)	Epissage (5,41)
9	Transport médié par les vésicules (2,56)	Transduction du signal médiée par la GTPase (3,59)	Protéasome (4,68)
10	Liaisons aux nucléotides (2,31)	Liaisons à l'ARN (3,46)	Cycle de Krebs (3,52)
11	Transduction du signal médiée par la GTPase (1,98)	Division cellulaire (2,84)	Architecture du cytosquelette (Plectines) (3,47)
12	Transport de l'ARN (1,93)	Activité ATPase (2,59)	Transport RE-Golgi médié par vésicule (3,26)
13	Stress du réticulum endoplasmique (RE) (1,80)	Homéostasie redox (2,51)	Repliement des protéines (3,05)

14	Activité métalloendopeptidase (1,79)	Biosynthèse des protéines (2,50)	Biosynthèse des lipides (3,00)
15	Activité Glutathion S- transférase (GST) (1,63)	Réparation par excision de nucléotides (NER), reconnaissance des lésions de l'ADN (2,46)	Transport de l'ARN (2,90)
16	Endocytose (1,58)	Processus redox FAD (2,42)	Protéasome (2,78)
17	Dégradation des acides gras (1,50)	Glycolyse (1,81)	Homéostasie redox (2,74)
18	Nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3 (1,44)	Endocytose médiée par la clathrine (1,80)	Processus redox FAD (2,54)
19		Aminoacylation de l'ARNt pour la traduction des protéines (1,76)	Déroulement de la structure secondaire de l'ARN (2,23)
20		Sumoylation des protéines (1,69)	Biosynthèse des acides aminés (2,22)
21		Régulation de la macroautophagie (1,26)	Biosynthèse des protéines (2,21)
22		Voie de signalisation du récepteur de l'acétylcholine couplé aux protéines G (1,18)	Biosynthèse des acides aminés (2,12)
23		Peroxisome (1,13)	Liaisons du calcium (2,10)
24		Protéasome (1,04)	Métabolisme du glucose (2,08)
25			Biosynthèse des protéines (2,05)
26			Import de protéines NLS dans le noyau (2,03)
27			Biosynthèse des protéines (1,99)
28			Architecture du cytosquelette (Spectrines) (1,91)
29			Transduction du signal (1,90)
30			$\beta$ -oxydation des acides gras (1,87)
31			Aminoacylation de l'ARNt pour la traduction des protéines (1,82)
32			Respiration mitochondriale (1,78)
33			Transport des ions (1,76)
34			Métabolisme du glucose (2,67)
35			Réponse cellulaire à un stimulus (1,64)
36			Synthèse d'ATP dans la mitochondrie couplée au transport de protons (1,45)
37			Expression des gènes (1,14)

Les processus biologiques retrouvés dans l'effet commun des QDs sont en rose, ceux retrouvés dans l'effet spécifique des QDs non vieilliss en orange clair et ceux retrouvés dans l'effet spécifique des QDs vieilliss en orange foncé.

### 3.2.2. L'effet du relargage d'ions $\text{In}^{3+}$ ou $\text{Zn}^{2+}$ observé lors du vieillissement des QDs

Dans cette deuxième analyse, l'effet des ions  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sur les cellules est recherché car il a été démontré que le vieillissement des QDs entraîne la libération d'ions indium et zinc (cf. chapitre 3). Le but est alors de comprendre les mécanismes à l'origine de la toxicité observée après exposition des cellules aux produits de dégradation des QDs vieillis. Les mêmes protéines ( $n = 2\ 570$ ) ont été analysées dans les conditions « In », « Zn » et « contrôles ».

- En ce qui concerne les cellules exposées à de l'acétate d'indium ( $\text{In}^{3+}$ ), 687 protéines ont une intensité significativement différente des contrôles ( $p < 0.05$ ), dont 267 avec une intensité inférieure et 420 avec une intensité supérieure à ces derniers (environ 2/3 d'augmentation et 1/3 de diminution).
- Pour les cellules exposées à de l'acétate de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), 754 protéines ont une intensité significativement différente des contrôles ( $p < 0.05$ ), dont 271 avec une intensité inférieure et 483 avec une intensité supérieure aux contrôles (environ 2/3 d'augmentation et 1/3 de diminution).

De même que précédemment, ces deux séries de données ont servi à construire 3 listes de protéines pour séparer l'effet commun des ions, l'effet spécifique d' $\text{In}^{3+}$  et l'effet spécifique de  $\text{Zn}^{2+}$ .

L'évaluation de l'effet commun des ions sur les kératinocytes : Elle regroupe les protéines statistiquement différentes des contrôles par rapport aux deux conditions ( $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) et dont la réponse varie dans le même sens. Cela forme une première liste de 346 protéines analysées avec le logiciel DAVID. Sur 63 clusters, 17 sont conservés (enrichissement  $> 1$  et FDR  $< 10\%$ ). Les grandes fonctions qui en ressortent sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 5.

L'évaluation de l'effet spécifique d' $\text{In}^{3+}$  sur les kératinocytes : Elle regroupe les protéines statistiquement différentes des contrôles par rapport aux deux conditions ( $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) et dont la réponse varie dans un sens opposé (augmentation par rapport au contrôle dans un cas et diminution dans l'autre). A cela sont ajoutées toutes les protéines statistiquement différentes des contrôles uniquement dans la condition  $\text{In}^{3+}$ . Cela forme une seconde liste de 340 protéines analysées avec le logiciel DAVID. Sur un total de 67 clusters, 15 sont conservés (enrichissement  $> 1$  et un FDR  $< 10\%$ ). Les grandes fonctions observées sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 5.

L'évaluation de l'effet spécifique de Zn<sup>2+</sup> sur les kératinocytes : Elle regroupe les protéines statistiquement différentes des contrôles par rapport aux deux conditions (In<sup>3+</sup> et Zn<sup>2+</sup>) et dont la réponse varie dans un sens opposé (augmentation par rapport au contrôle dans un cas et diminution dans l'autre). A cela sont ajoutées toutes les protéines statistiquement différentes des contrôles uniquement dans la condition Zn<sup>2+</sup>. Cela forme une troisième liste de 408 protéines analysées avec le logiciel DAVID. Sur un total de 72 clusters, 19 sont conservés (enrichissement > 1 et un FDR < 10 %). Les grandes fonctions sont présentées en détail dans l'Annexe 3 et synthétisées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Processus biologiques mis en évidence dans chaque cluster après analyse des différentes listes de protéines par le logiciel DAVID, concernant l'exposition des kératinocytes aux ions In<sup>3+</sup> et Zn<sup>2+</sup>.

Numéro de cluster	Terme fonctionnel (score d'enrichissement)		
	Commun ions	Spécifique In <sup>3+</sup>	Spécifique Zn <sup>2+</sup>
1	Mitochondrie (8,37)	Adhésion cellulaire (20,06)	Liaisons aux nucléotides (9,01)
2	Traduction (6,14)	Liaisons aux nucléotides (7,07)	Adhésion cellulaire (8,52)
3	Adhésion cellulaire (5,71)	Epissage (6,11)	Epissage (4,84)
4	Liaisons aux nucléotides (4,09)	Réticulum endoplasmique (RE) (4,39)	Biosynthèse des protéines (4,71)
5	Epissage (4,06)	Biosynthèse des protéines (4,09)	Transport RE-Golgi médié par vésicule (4,14)
6	Endocytose médiée par la clathrine (3,43)	Repliement des protéines (3,89)	Mitochondrie (4,07)
7	Biosynthèse des protéines (3,40)	Mitochondrie (3,68)	Transport de l'ARN (3,87)
8	Transport des protéines dans le noyau (2,91)	Transduction du signal médiée par la GTPase (2,82)	Transduction du signal médiée par la GTPase (3,85)
9	Endocytose médiée par la clathrine (2,48)	Protéasome (2,40)	Déroulement de la structure secondaire de l'ARN (3,61)
10	Transport de l'ARN (2,43)	NER, reconnaissance des lésions de l'ADN (2,36)	Sumoylation des protéines (3,58)
11	Aminoacylation de l'ARNt pour la traduction des protéines (2,39)	Stress du réticulum endoplasmique (RE) (2,23)	Endocytose (3,51)
12	Processus redox NAD (2,29)	Repliement des protéines (2,06)	Traduction (3,37)
13	Transport de l'ARN (2,26)	Epissage (1,97)	Import de protéines NLS dans le noyau (2,72)
14	Biosynthèse des lipides (1,68)	Filaments intermédiaires de kératine (1,77)	Protéasome (2,47)
15	Recyclage endocytair (1,59)	Dégradation des acides gras (1,52)	Epissage (2,41)
16	Activité métalloendopeptidase (1,59)		Organisation du Golgi (2,37)

17	Mouvement grâce aux microtubules (1,10)		Processus redox NAD (2,13)
18			Assemblage de la broche mitotique (1,91)
19			Division nucléaire mitotique (1,61)

Les processus biologiques retrouvés dans l'effet communs des ions sont en jaune pâle, ceux retrouvés dans l'effet spécifique de  $\text{In}^{3+}$  en jaune foncé et ceux retrouvés dans l'effet spécifique de  $\text{Zn}^{2+}$  en marron.

### 3.3. Résultats et discussion

#### Adhérence cellulaire et cytosquelette :

D'après ces résultats, l'exposition des kératinocytes aux QDs semble impacter l'adhérence et les jonctions entre les cellules via la voie des cadhérines, ainsi que la nucléation de l'actine via le complexe Arp 2/3 (diminution de ACTR2 et augmentation de ARPC2, ARPC5, ARPC5L). On observe également une diminution de l'intensité des intégrines (ITG $\alpha$ 6 et ITG $\beta$ 4) qui servent à l'ancrage des cellules avec la matrice extracellulaire et à la formation d'hémidesmosomes (jonctions cellule-lame basale), protégeant la peau des agressions mécaniques et des frottements. D'autres protéines impliquées dans le cytosquelette d'actine sont modifiées (Rho GDI, myosine, aniline, palladine, paxilline et dynactine), pouvant entraîner des changements au niveau des adhésions focales (interactions entre les microfilaments d'actine et les protéines de la matrice extracellulaire). Les laminines (LAMC2), constituantes majeures de la lame basale, sont également diminuées.

L'effet semble encore plus important lorsqu'il s'agit d'expositions aux QDs vieillis avec la diminution de nombreuses protéines du cytosquelette servant à la formation de jonctions mais aussi à la motilité et à la migration cellulaire. Parmi ces protéines, on retrouve la fibronectine (FN1), constituant de la matrice extracellulaire permettant l'adhésion des cellules à cette dernière. On retrouve également les cadherines et caténines (CADH3, CTNNA1, CTNND1), les plakines (plectines, envoplakines, periplakines, plakophilines, desmoplakines et epiplakines), la spectrine (SPTAN1, SPTBN1, MACF1) et la tropomoduline (TMOD3), qui adhèrent aux protéines du cytosquelette afin de structurer la cellule. Plus spécifiquement, une augmentation de la kératine est observée (KRT13 et KRT84) pouvant entraîner des modifications au niveau des filaments intermédiaires.

Ces effets sont également retrouvés après exposition aux ions (diminution de MACF1), notamment avec  $\text{In}^{3+}$  dont les résultats montrent la diminution des envoplakines et plakophilines, des intégrines (ITG $\alpha$ 6), de la spectrine (SPTAN1), les laminines (LAMC2) ainsi que des modifications d'expression des protéines codant pour les filaments intermédiaires de

kératine (diminution de KRT1, KRT15, KRT19, KRT3 et KRT76). En ce qui concerne l'effet des ions  $Zn^{2+}$ , on retrouve l'augmentation de ARPC2, ARPC5L appartenant au complexe Arp 2/3.

Pour confirmer les effets des QDs sur le cytosquelette des kératinocytes qui sont peu décrits dans la littérature (une étude sur les QDs CdSe/ZnS recense des altérations du cytosquelette dans les cellules BEAS-2B et HFF-1, en particulier la diminution des plaques d'adhésion focale) [1], des tests de validation vont être effectués en microscopie à fluorescence via des marquages du réseau d'actine (phalloïdine) et des filaments intermédiaires de kératines.

#### Mitochondrie et homéostasie redox :

La deuxième modification importante mise en évidence dans cette analyse concerne les protéines mitochondriales ainsi que l'homéostasie redox intracellulaire. En effet, l'exposition aux QDs (vieillis ou non) semble entraîner des modifications au niveau du transit des ions et des protéines à travers les différents compartiments de la mitochondrie. Une diminution de TOMM40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40) ainsi qu'une augmentation de l'expression de TIMM44 (translocase of inner mitochondrial membrane 44), signifie que l'import de protéines dans la mitochondrie à travers la membrane externe est peut-être altéré, et que l'import dans la matrice mitochondriale à travers la membrane interne est peut-être augmenté par les QDs. Des modifications d'expression des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire permettant le transport de protons sont également mises en évidence, telles que les ubiquinol cytochrome c reductases, la cytochrome c oxydase, l'ATP synthase et la NADH ubiquinone oxydoreductase (augmentation de COX6C, UQCRFS1 et diminution de UQCRC2, ATP5L, IMMT, NDUFV1). La voie d'entrée des ions  $Ca^{2+}$  dans la matrice mitochondriale via l'uniprot calcique mitochondrial (MCU) semble également réprimée (diminution de MCU), pouvant expliquer la diminution de l'activité de la  $NAD^+$  isocitrate deshydrogénase (IDH3A) qui est directement activée par le calcium. Ces modifications ioniques induites par l'exposition des kératinocytes aux QDs peuvent modifier le potentiel mitochondrial.

De plus, l'exposition aux QDs vieillis semble modifier l'homéostasie redox intracellulaire, qui pourrait être causé par la répression de la voie métabolique «  $\beta$ -oxydation ». Celle-ci permet de dégrader les acides gras pour former de l'acétyl-CoA et du NADH ainsi que du FADH. L'acétyl-CoA peut alors servir au fonctionnement du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire, et nos données indiquent une diminution de ACAT1, ACAT2 et ABCD3. Ceci est associé à une modification de la respiration mitochondriale via le cycle de Krebs, qui se



caractérise ici par la diminution des isocitrate et pyruvate deshydrogénases (IDH1, IDH2, IDH3B, PCK2 et PDHB). De plus, la voie de synthèse du glutathion, molécule impliquée dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et la détoxification des cellules, est également affectée (augmentation de GCLC, GSR, GSTP1 et diminution de GPX1 et GSTK1), tout comme la voie de synthèse de thiorédoxines (augmentation de TXNRD1 et TXN), dont le rôle est de maintenir l'homéostasie redox face à une élévation du stress oxydant. Les expressions de la catalase et des cytochromes p450, servant à l'équilibre redox au sein de la mitochondrie, sont également modifiées après exposition aux QDs vieillis (diminution de CAT, CYP51A1 et POR).

En ce qui concerne l'exposition aux ions, la diminution de la NADH ubiquinone oxydoréductase et de la NAD<sup>+</sup> isocitrate deshydrogénase (NDUFB1, IDH3A) ainsi que l'augmentation de la cytochrome c oxydase (COX6C) et TIMM44 sont retrouvées. Les effets des ions In<sup>3+</sup> en commun avec l'exposition aux QDs sont la diminution de l'ATP synthase (ATP5L), TOMM40 et de la pyruvate deshydrogénase (PDHB) ainsi que l'augmentation de l'ubiquinol-cytochrome c reductase (UQCRC1). Pour ce qui est de l'effet des ions Zn<sup>2+</sup>, ils diminuent l'expression de la catalase et des cytochromes p450 (CAT et POR) ainsi que de la glutathion-S-transférase (GSTK1).

Ces résultats conduisent à émettre l'hypothèse que les QDs perturbent l'homéostasie redox intracellulaire, en particulier dans la mitochondrie avec un ralentissement de la chaîne respiratoire entraînant des modifications du potentiel membranaire mitochondrial. De telles modifications peuvent être dues à la présence d'In<sup>3+</sup>, puisqu'une étude récente a mis en évidence des effets spécifiques de In<sup>3+</sup> sur la mitochondrie (inhibition des canaux à protons de la membrane interne, diminution de la respiration, augmentation de la motilité de la membrane, modification de la pression osmotique, réduction du potentiel membranaire et ouverture des pores membranaires avec un gonflement de la matrice) [2]. L'excès de zinc est également connu pour entraîner des dysfonctionnements de la mitochondrie, notamment par une inhibition des enzymes à glutathion ainsi que de la NAD<sup>+</sup> isocitrate deshydrogénase, entraînant un déséquilibre de la balance redox intracellulaire [3]. Pour valider cette hypothèse, des mesures en fluorescence (kit JC-10, Sigma-Aldrich) du potentiel membranaire mitochondriale seront effectuées, ainsi que des mesures de l'activité d'enzymes de la chaîne respiratoire.

#### Stress du réticulum endoplasmique (RE) :

Le troisième effet des QDs mis en évidence par cette analyse est l'apparition d'un stress du RE qui peut être dû aux modifications du statut redox intracellulaire, commentées dans le

paragraphe précédent. Généralement, ce stress est causé par une élévation de la quantité de protéines mal repliées dans le RE. En réponse à ce stockage massif de protéines mal repliées, les échanges avec l'appareil de Golgi sont généralement réprimés et la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) est initiée, entraînant une diminution générale de la synthèse protéique (mis à part celle de certaines chaperonnes qui servent à la réponse au stress) ainsi qu'une augmentation de la dégradation protéique via l'activation du protéasome [4]. Dans ces résultats, la modification de l'intensité des protéines intervenant dans la biosynthèse protéique ainsi que dans le bon repliement est observée, comme, par exemple, pour les protéines *splicing factor* (SF1, SF3B2 et SF3B3) permettant l'épissage qui sont fortement diminuées après exposition aux QDs Thick shell. D'autres protéines, intervenant dans la synthèse des acides gras et des sucres, sont également diminuées (par exemple : AC5L3, EBP et GNPAT1). L'augmentation de PSMG1, chaperonne spécifique du protéasome dont le rôle est de dégrader les protéines mal repliées, est également observée. La protéine Erlin-2 (*endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2*), qui fait partie de la réponse ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*), est également augmentée. D'autres modifications montrent une modification des protéines anti et pré-apoptotiques comme la diminution de API5 (anti-apoptotique) et de GAS6 (impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire). De plus, l'augmentation de RAB35, FLOT1 et PREB semble montrer une augmentation de l'endocytose après exposition aux QDs. Enfin l'augmentation de mTOR est aussi révélatrice d'un stress du RE.

En ce qui concerne les QDs vieilliss, ils semblent augmenter ce stress. Tout d'abord, la diminution de nombreuses protéines de la famille des SEC23/SEC24 montre que les transports du RE vers l'appareil de Golgi sont diminués. De plus, la réponse UPR semble amplifiée dans cette condition, avec l'augmentation de eIF2 $\alpha$  (EIF2S1 et EIF2B1), principal substrat de PERK (protéine transmembranaire du RE), qui permet à la cellule d'inhiber la traduction des protéines (limitant ainsi le nombre de protéines mal repliées). Par ailleurs, l'augmentation des protéines heat shock protein 90-alpha (HSP90AB1) et disulfide-isomérase A5 (PDIA5), indique que la voie de signalisation IRE1 $\alpha$ , semble activée en réponse à des protéines mal repliées. Cette activation entraîne la formation de protéines apoptotiques (voie de signalisation CHOP), observée par l'augmentation des protéines BAX (pré-apoptotique) et la diminution de BCL-2 (anti-apoptotique), permettant de réduire le nombre de cellules stressées lorsque le système est dépassé. L'augmentation de la p38-MAPK (MAPK14), révèle une fois encore une réponse à un stress et est probablement aussi impliquée dans le processus apoptotique. Cette voie apoptotique et de mort cellulaire programmée (PDCD4) est enclenchée lors de la réponse UPR lorsque les

cellules n'ont pas réussi à retrouver leur homéostasie, pouvant à terme entraîner le développement de pathologies [4].

En ce qui concerne l'effet des ions, on retrouve l'augmentation de PSMG2, ERLIN2, PREB, BAX, EIF2S1 ainsi que la diminution de SF1, SF3B2, EBP et API5. Il semble y avoir des effets spécifiques aux ions, par exemple, on retrouve l'augmentation de mTOR et HSP90AB1 après l'exposition à l' $\text{In}^{3+}$  et l'augmentation de FLOT1 ainsi que la diminution de BCL-2 après l'exposition au  $\text{Zn}^{2+}$ . Ceci constitue des indices de l'implication de ces ions dans les effets cellulaires des QDs.

L'effet des QDs sur le réticulum endoplasmique a été récemment décrit. Il est démontré que des QDs d' $\text{InP/ZnS}$  sont capables d'induire un stress oxydant ainsi qu'un stress du réticulum endoplasmique et la production de cytokines IL6 chez des macrophages [5]. Pour valider cet effet sur nos QDs, des tests seront réalisés, avec notamment une mesure de l'apoptose et du cycle cellulaire en FACS (via le kit caspase 3/7 green, ThermoFisher et un marquage à l'iodure de propidium) ainsi que l'évaluation du niveau d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la réponse UPR (CHOP, ATF6, GRP78, IRE-1 et sXBP1) en RT-qPCR.

## 4. Conclusion

Dans de cette partie, nous avons mis en évidence des effets toxiques des QDs d' $\text{InZnP}$  sur les kératinocytes primaires humains. Cette toxicité varie en fonction de leur composition chimique (simple coquille vs double coquille) et de leur état de dégradation (non-vieillis vs vieillis). Non-vieillis, les QDs double coquille (Thin et Thick shell) ne révèlent aucun effet indésirable alors que les simple coquille (Gradient shell) à forte concentration induisent une cytotoxicité élevée ainsi que l'élévation du niveau de ROS intracellulaire et du nombre de foci de 53BP1. En ce qui concerne les QDs vieillis, une cytotoxicité et une génotoxicité élevées sont mises en évidence pour les trois types de QDs, même aux plus faibles concentrations, avec une tendance inversée, dans laquelle le Thick shell semble un peu plus toxique que les Thin et Gradient shell. Des modifications de l'expression des gènes intervenant dans l'inflammation et l'homéostasie redox intracellulaire sont également observées. Enfin, dans les deux conditions (vieillis et non-vieillis), les QDs modifient l'expression de gènes codant des protéines intervenant dans le maintien de l'homéostasie du zinc, avec une réponse plus élevée pour les QDs vieillis. De plus, l'analyse protéomique réalisée en parallèle de ces travaux montre des modifications importantes du protéome après exposition aux QDs. Des protéines intervenant

dans l'adhérence cellulaire, dans l'homéostasie redox intracellulaire ainsi que dans la réponse au stress du RE, sont exprimées différemment après exposition aux QDs. L'hypothèse émise après l'analyse de ces résultats est que la présence de QDs dans les kératinocytes provoque des modifications dans l'organisation du cytosquelette ainsi que dans la formation des jonctions intercellulaires. Une seconde hypothèse est que les QDs entraînent une modification du statut redox intracellulaire, concomittant au déclenchement d'un stress du RE suivi de l'activation de la réponse UPR. Des expériences de validation restent à conduire pour pouvoir confirmer ces hypothèses.

Pour tenter de comprendre les mécanismes de toxicité induits par la présence de QDs et afin d'améliorer les formulations futures, les éléments responsables de cette toxicité sont recherchés. Pour cela une étude parallèle a été menée sur l'effet des ions  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (via des expositions à de l'acétate de zinc et d'indium), car les résultats du chapitre 3 ont montré que les QDs libèrent ces ions en se dégradant. Les premières mesures ont montré une cytotoxicité plus élevée pour les ions Zn que pour l'In, ce qui pourrait expliquer la tendance à une toxicité plus importante des Thick shell vieillies. En effet, les trois QDs contiennent la même quantité d'In, en revanche le Thick shell contient huit fois plus de zinc. Les autres résultats sur l'effet des ions montrent certaines similarités au niveau de l'expression de certains gènes. L'augmentation de nombreux gènes en qPCR, codant pour l'inflammation et l'homéostasie redox intracellulaire, est retrouvée après exposition à chacun de ces deux ions. D'autres modulation d'expression de gènes sont observées uniquement dans les cellules exposées à l'un ou l'autre de ces ions, comme la diminution de GPX1, intervenant dans l'homéostasie redox, observée après exposition à  $\text{In}^{3+}$ . En ce qui concerne les perturbations de l'homéostasie du zinc par les QDs, il semblerait que l'indium joue un rôle puisque la diminution de MT2, observée après exposition aux QDs, n'est pas retrouvée après exposition aux ions zinc alors qu'elle l'est avec les ions indium. Ces résultats signifient que ces ions sont en partie impliqués dans la toxicité observée, avec certains mécanismes attribuables à la présence d'indium (dont les mécanismes de toxicité sont peu décrits dans la littérature). Cependant d'autres éléments, comme le sélénium, n'ont pas été testés, mais restent potentiellement impliqués dans la toxicité des QDs.

Ces résultats montrent que dans le contexte de l'approche « *safer by design* », les QDs double coquille Thin et Thick shell sont moins toxiques que les simple coquille Gradient shell lorsqu'ils sont synthétisés. Cependant, après vieillissement sous simulation solaire, les trois types de QDs se dégradent et deviennent alors toxiques, entraînant de nombreuses perturbations dans les kératinocytes.

## **Références :**

- [1] B. B. Manshian *et al.*, « Evaluation of quantum dot cytotoxicity: interpretation of nanoparticle concentrations versus intracellular nanoparticle numbers », *Nanotoxicology*, vol. 10, n° 9, p. 1318-1328, oct. 2016, doi: 10.1080/17435390.2016.1210691.
- [2] L. Yuan, J. Zhang, Y. Liu, J. Zhao, F. Jiang, et Y. Liu, « Indium (III) induces isolated mitochondrial permeability transition by inhibiting proton influx and triggering oxidative stress », *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 177, p. 17-26, déc. 2017, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.08.012.
- [3] Y. Nzenge, « Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53 », p. 300.
- [4] S. Fougeray, « Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain », p. 166.
- [5] S. Chen, Y. Chen, Y. Chen, et Z. Yao, « InP/ZnS Quantum Dots Cause Inflammatory Response in Macrophages Through Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative stress », *IJN*, vol. Volume 14, p. 9577-9586, déc. 2019, doi: 10.2147/IJN.S218748.

**Chapitre 6 :**  
*Discussion générale et  
perspectives*



L'objectif de ces travaux de thèse était de réaliser une évaluation toxicologique de nouvelles formulations de QDs d'InP, synthétisés dans nos laboratoires et conçus par une approche « *safer by design* » sur la barrière cutanée. Pour cela, deux analyses ont été menées en parallèle sur des kératinocytes primaires humains : l'une sur les QDs intègres, après transfert en phase aqueuse, et l'autre sur les produits de dégradation obtenus après un vieillissement des QDs en enceinte climatique. Pour rappel, trois formulations de QDs ont été étudiées et comparées (Figure 47).

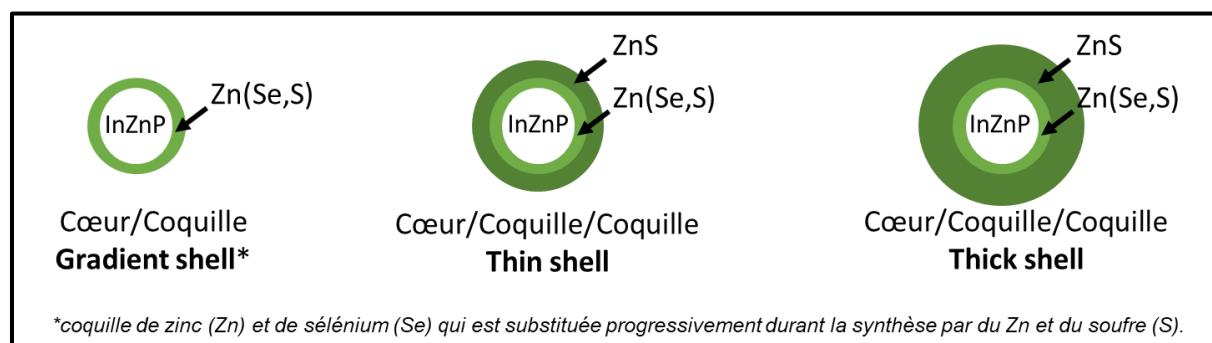


Figure 47 : Schéma récapitulatif de la composition chimique des trois QDs étudiés au cours de ces travaux de thèse.

Avec les générations précédentes de QDs formulées au laboratoire, il avait été montré que la présence d'une coquille de Zn(Se,S) diminuait la toxicité des QDs en comparaison aux QDs sans coquille [1]. Avec ces nouvelles générations de QDs d'InZnP, la quantité d'indium dans le cœur est deux fois moins importante et les coquilles sont plus épaisses. Le but est alors de réduire davantage la toxicité du cœur tout en améliorant les propriétés optiques par l'ajout d'une coquille supplémentaire de ZnS. Cela permet également de réduire les quantités de QDs dans les produits tout en conservant l'intensité de fluorescence originale. Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, sur les QDs non vieillis, montrent qu'ils sont globalement stables et peu toxiques. La présence d'une double coquille de Zn(Se,S)/ZnS autour du cœur d'InP réduit leur toxicité par rapport à ceux qui ne possèdent qu'une simple coquille. Ces résultats sont en accord avec ce qui était attendu lors de la conception de ces nouveaux QDs et complètent les résultats obtenus avec les formulations antérieures, à savoir que l'ajout de coquilles rend les QDs plus sûrs, présentés dans l'Annexe 2 [1]. Les formulations synthétisées au laboratoire sont donc de moins en moins toxiques et de plus en plus performantes. Ainsi, elles suivent bien le concept de « *safer by design* », dans la première partie de leur cycle de vie.

En revanche, lorsque ces QDs vieillissent, ils se dégradent. Il est donc important d'évaluer aussi la fin de vie de ces produits. Nous avons observé, dans ces travaux, une



dégradation des trois types de QDs au cours du temps. Les ligands qui maintiennent les QDs en suspension sont probablement les premiers éléments à se détacher des nanocristaux, entraînant ainsi leur précipitation, puis leur dissolution progressive. Une oxydation du sélénium ainsi que la libération d'ions  $Zn^{2+}$  et  $In^{3+}$  ont été mises en évidence au cours de ces vieillissements. Toutefois, la présence de la double coquille épaisse (Thick shell) rend les QDs plus résistants à la photodégradation, en comparaison avec les QDs à double coquille fine (Thin shell), eux-mêmes plus résistants que les simple coquille (Gradient shell) qui se dégradent très vite. Ce phénomène de dégradation, déjà observé dans de nombreux travaux, est généralement dû au contact des QDs avec l'air ambiant. Cela entraîne une oxydation en surface des nanomatériaux et provoque de nombreuses transformations telles que la dissolution du cœur et la libération d'ions toxiques. De plus, comme observé avec les formulations antérieures de QDs à base d'InP, la dégradation est accélérée sous l'effet de l'irradiation solaire [1]. Cependant, même si les nouvelles formulations synthétisées au laboratoire sont toujours sensibles à la photodégradation, elles sont de plus en plus résistantes, ce qui est également en accord avec l'approche « *safer by design* ».

L'évaluation toxicologique, réalisée sur les produits de dégradation obtenus après 24 h de vieillissement, révèle une forte cytotoxicité sur les kératinocytes primaires pour les trois types de QDs vieillis, avec une toxicité légèrement supérieure pour les QDs Thick shell. Ces résultats suggèrent que le zinc est impliqué dans la toxicité des QDs, puisque les QDs Thick shell contiennent environ 8,5 fois plus de zinc que les Gradient shell et 2 fois plus de zinc que les Thin shell pour une même quantité d'indium [2]. En plus de leur forte cytotoxicité, ces produits de dégradation se révèlent également génotoxiques avec la mise en évidence de cassures double-brin. L'homéostasie du zinc est perturbée, ce qui peut être dû à un excès de cet élément dans les cellules, qui tentent alors de réguler sa concentration. L'homéostasie redox des cellules est également perturbée et l'apparition de marqueurs de l'inflammation est observée. Il est possible que les éléments libérés lors du vieillissement induisent l'apparition d'un stress oxydant. Les résultats complémentaires obtenus grâce à l'analyse du protéome mettent en évidence d'autres effets cellulaires des QDs. Des problèmes dans la synthèse et le repliement des protéines seraient à l'origine d'un stress du RE et de modifications dans l'organisation du cytosquelette, particulièrement dans le cas d'expositions aux produits de dégradation des QDs. Face à ces effets, les cellules initient la réponse UPR spécifique de ce type de stress, accompagnée de signaux d'apoptose. La présence de ces derniers peut être due

à une saturation des systèmes de réparations en réponse à une trop forte quantité de métaux intracellulaire. Pour confirmer ces effets, des expériences de validation devront être réalisées.

Pour tenter de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité observée, il faut prendre en compte le fait que les QDs sont des mélanges complexes, composés de divers éléments, et dont la structure chimique évolue au cours du temps. Dans ces travaux, nous avons étudié la toxicité globale des QDs et nous avons également essayé de déterminer si les ions zinc et indium, libérés au cours du vieillissement, étaient impliqués dans cette toxicité. Pour cela, des expositions à de l'acétate d'indium et de zinc, seuls ou en mélange, ont été réalisées. Cependant, comme tout modèle, ces derniers se rapprochent mieux de la réalité mais peuvent avoir certaines limites. Même s'ils ne sont pas strictement identiques aux éléments retrouvés dans les QDs, ils possèdent certaines analogies de structure et des propriétés chimiques proches qui laissent penser que l'activité biologique induite sera similaire. La toxicité des mélanges est très complexe à évaluer puisque de nombreuses interactions peuvent avoir lieu entre les substances. Par exemple, lorsque les effets des substances d'un mélange s'ajoutent entre eux, on parle d'additivité. Si l'effet est supérieur à cela on parle de synergie et à l'inverse, si l'effet est inférieur, on parle d'antagonisme. De plus, l'effet d'une substance peut être augmenté (potentialisation), ou à l'inverse diminué (inhibition), par la présence d'une autre substance. Il est donc difficile de trouver la ou les substances responsables de la toxicité d'un mélange. Au cours de ces travaux, nous avons observé une toxicité plus élevée de l'acétate de zinc par rapport à l'indium. Le zinc étant en quantité supérieure à l'indium dans les QDs, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la toxicité induite par les QDs vieilliss est en partie due au zinc. Par ailleurs, l'expression de certains gènes après exposition aux QDs, comme la diminution de l'expression de MT2 dans les mécanismes cellulaires de détoxification des métaux, est uniquement retrouvé après exposition à de l'acétate d'indium. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que l'indium est également responsable de la toxicité des QDs. Cependant, l'indium et le zinc ne sont probablement pas les seuls éléments impliqués. Nous avons montré que le sélénium (Se(-II)) s'oxyde au cours du vieillissement pour donner du sélénium élémentaire rouge (Se(0)) et du sélénite (Se(IV)). Or, il a été décrit dans l'introduction que le sélénite est toxique à plus faible dose que le sélénium élémentaire et qu'il peut induire un stress oxydant dans les cellules [3]. On peut donc penser que le sélénium, va également intervenir dans la toxicité des QDs. Il serait pertinent d'évaluer la toxicité de cet élément sur les kératinocytes primaires humains dans la suite du projet.

L'objectif de ce projet de thèse, à l'interface chimie/biologie, a été atteint. Les résultats montrent qu'au cours du temps, les formulations de QDs s'améliorent pour devenir de plus en plus sûres pour la santé et l'environnement, ce qui correspond bien à une approche « *safer by design* ». Ainsi, les dernières formulations synthétisée (double coquille) sont moins toxiques et possèdent une meilleure photostabilité avec un effet plus marqué lorsque la double coquille est épaisse. Cependant, il est important de continuer à améliorer ces formulations puisque pour le moment, la dissolution des QDs et le relargage d'éléments toxiques en fin de vie est inévitable (Figure 48).

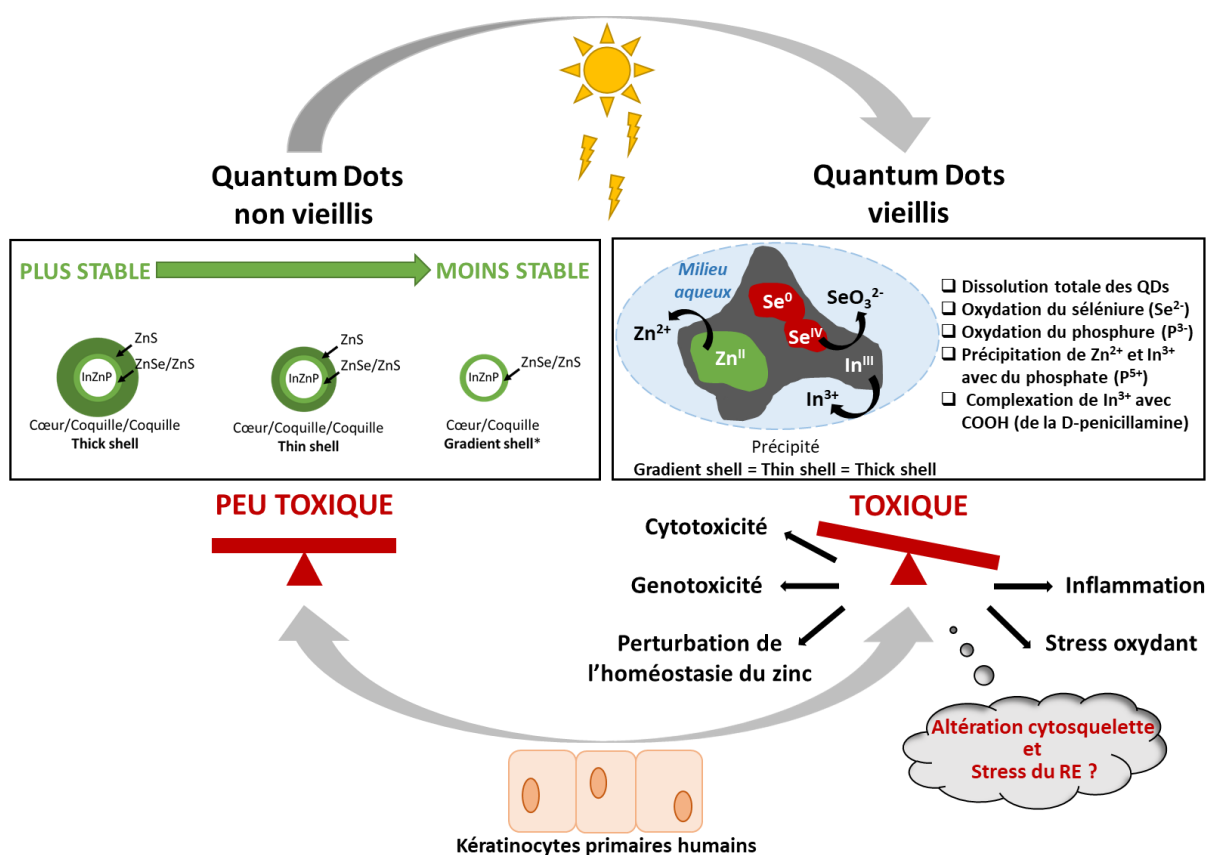


Figure 48 : Schéma bilan des travaux de thèse.

Par ailleurs, ces travaux soulèvent des questions plus générales en ce qui concerne l'effet des QDs sur la barrière cutanée. Nous avons montré que les QDs vieillis pouvaient avoir des effets délétères sur les kératinocytes primaires, les cellules de la couche basale de l'épiderme. Même si ce modèle ne permet pas de conclure définitivement quant aux effets des QDs sur la peau, puisque de nombreuses autres cellules sont présentes dans le tissu épidermique, il permet tout de même de se rapprocher de la réalité en comparaison aux études *in vitro* sur des lignées cellulaires animales et immortalisées. Les effets observés laissent penser que si les QDs ou leurs produits de dégradation sont capables d'altérer les fonctions cellulaires des kératinocytes

primaires, ces derniers auront du mal à se différencier correctement. Or, les kératinocytes sont les cellules les plus abondantes de l'épiderme, donc si leur fonction est altérée, il se pourrait que cela entraîne des lésions cutanées irréversibles. L'activation du système immunitaire chez les kératinocytes primaires exposés aux QDs renforce cette idée, qui pourrait conduire au développement de maladies inflammatoires telle que la dermatite de contact (ou eczéma de contact). De plus, ces effets pourraient être aggravés chez des personnes prédisposées génétiquement. Pour en savoir davantage, il serait pertinent, dans un second temps, de tester les effets des QDs sur des modèles de peau plus complexes comme les modèles 3D (ex-vivo, impression 3D...), très utilisés en toxicologie (cf. chapitre 1). Ces modèles de tissus ou d'organes développés de nos jours peuvent être très complets et incluent de nombreuses fonctions cellulaires (pigmentation, vascularisation, immunité), tout en permettant, d'un point de vue éthique, de substituer ou de réduire les tests *in vivo* chez l'animal.

D'un autre côté, afin d'évaluer le risque global des QDs pour la population, il faudrait réaliser un suivi de l'exposition à ces composés, en plus de l'évaluation de la toxicité décrite précédemment. Cependant, cela reste difficile à évaluer puisque l'exposition d'un composé (dose et fréquence) varie en fonction du type de population. Par exemple, dans le cas des écrans de TV QLED, on peut penser que les travailleurs qui manipulent les écrans brisés en fin de vie dans les décharges auront une exposition plus élevée que les consommateurs qui n'ont pas de raison d'être fréquemment en contact avec leur écran de télévision. Toutefois, les travailleurs sont généralement protégés par des équipements de protection individuelle (lunettes, gants, ...), ce qui limite l'exposition s'ils sont correctement portés. A l'inverse, dans les tablettes et smartphones, les consommateurs peuvent être fortement exposés puisque ces écrans tactiles sont régulièrement en contact direct avec la peau. De plus, ces objets facilement transportables sont soumis aux rayons du soleil, ce qui peut accélérer le vieillissement des composants, dont les QDs, et libérer des espèces chimiques dangereuses comme nous l'avons montré dans ces travaux. Cependant, l'inclusion des QDs dans des matrices polymères pour la conception d'écrans réduit l'exposition. Des expériences de vieillissement ont été menées en parallèle de ces travaux de thèse sur ces mêmes QDs préalablement inclus dans des matrices PMMA (polyméthacrylate de méthyle) et montrent une perte de photoluminescence au cours du temps, similaire aux QDs en phase aqueuse [2]. Néanmoins, il se pourrait que la toxicité soit diminuée par la présence de la matrice polymère puisque les échanges d'ions entre les produits de dégradation et cette dernière seront moins aisés qu'en solution aqueuse.

L'estimation de la fréquence d'exposition peut donc fortement varier d'une population à l'autre, de même que la dose d'exposition (un écran en fin de vie et/ou brisé libérera sans doute plus d'éléments qu'un écran neuf et intègre). De plus, le secret de fabrication des grandes entreprises, rend l'estimation de la dose d'exposition encore plus difficile. Les concentrations en QDs utilisées dans cette étude ont ainsi été choisies en accord avec la littérature, sur une gamme de concentrations assez large pour pouvoir observer des effets et les comparer entre les différents QDs (toxicité à des doses plus ou moins élevées).

L'étude réalisée au cours de ces trois ans de thèse est encourageante pour la suite, en ce qui concerne la conception de nanomatériaux plus sûrs pour la santé et l'environnement. L'inclusion des QDs étudiés dans ces travaux, dans des matrices polymères (PMMA) montre une augmentation de la stabilité de ces derniers. D'autres nouvelles formulations prometteuses de QDs sont en cours d'étude au laboratoire afin d'améliorer davantage cette stabilité, avec notamment des QDs double coquille d'InZnP/ZnSe/ZnS recouverts d'une couche supplémentaire d'alumine [2]. Cette technique a déjà fait ses preuves sur des QDs de CdSe/CdS soumis à un éclairage LED intense pendant 24 h et où aucune dégradation n'a été observée [4]. Cependant, la toxicité de l'alumine dans la littérature n'a pas été référencée. Le développement de projets pluridisciplinaires ainsi que les collaborations entre ces différentes disciplines sont donc indispensables pour obtenir une expertise approfondie sur ce type de sujet.

## **Références :**

- [1] A. Tarantini et al., « Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation », *NanoImpact*, vol. 14, p. 100168, févr. 2019, doi: 10.1016/j.impact.2019.100168.
- [2] K. D. Wegner et al., « Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity », *Front. Chem.*, vol. 7, p. 466, juin 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00466.
- [3] S. Ečimović et al., « Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei* », *Chemosphere*, vol. 212, p. 307-318, déc. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.095.
- [4] Z. Li, W. Yao, L. Kong, Y. Zhao, et L. Li, « General Method for the Synthesis of Ultrastable Core/Shell Quantum Dots by Aluminum Doping », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no 39, p. 12430-12433, oct. 2015, doi: 10.1021/jacs.5b05462.



# **Annexes**





## **Annexe 1 : Article Frontiers in Chemistry**





# Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity

Karl David Wegner<sup>1†</sup>, Fanny Dussert<sup>2</sup>, Delphine Truffier-Boutry<sup>3</sup>, Anass Benayad<sup>3</sup>, David Beal<sup>2</sup>, Lucia Mattera<sup>1</sup>, Wai Li Ling<sup>4</sup>, Marie Carrière<sup>2\*</sup> and Peter Reiss<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Vladimir Lesnyak,  
Dresden University of  
Technology, Germany

### Reviewed by:

Hongbo Li,  
Beijing Institute of Technology, China  
Aliaksei Dubavik,  
ITMO University, Russia

### \*Correspondence:

Karl David Wegner  
wegner.karldavid@gmail.com  
Marie Carrière  
marie.carriere@cea.fr  
Peter Reiss  
peter.reiss@cea.fr

### † Present Address:

Karl David Wegner,  
Biophotonics (BAM-1.2), BAM Federal  
Institute for Materials Research and  
Testing, Berlin, Germany

### Specialty section:

This article was submitted to  
Nanoscience,  
a section of the journal  
Frontiers in Chemistry

Received: 22 February 2019

Accepted: 12 June 2019

Published: 27 June 2019

### Citation:

Wegner KD, Dussert F,  
Truffier-Boutry D, Benayad A, Beal D,  
Mattera L, Ling WL, Carrière M and  
Reiss P (2019) Influence of the  
Core/Shell Structure of Indium  
Phosphide Based Quantum Dots on  
Their Photostability and Cytotoxicity.  
*Front. Chem.* 7:466.  
doi: 10.3389/fchem.2019.00466

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, STEP, Grenoble, France, <sup>2</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, CIBEST, Grenoble, France, <sup>3</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA-LITEN L2N, Grenoble, France, <sup>4</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, IBS, Grenoble, France

With the goal to improve their photostability, InP-based QDs are passivated with three types of inorganic shells, namely (i) a gradient ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub> shell, (ii) an additional ZnS shell on top of the gradient shell with two different thicknesses (core/shell/shell, CSS), (iii) an alumina coating on top of ZnS. All three systems have photoluminescence quantum yields (PLQY) > 50% and similar PL decay times (64–67 ns). To assess their photostability they are incorporated into a transparent poly (methyl methacrylate) (PMMA) matrix and exposed to continuous irradiation with simulated sunlight in a climate chamber. The alumina coated core/shell system exhibits the highest stability in terms of PLQY retention as well as the lowest shift of the PL maximum and lowest increase of the PL linewidth, followed by the CSS QDs and finally the gradient shell system. By means of XPS studies we identify the degradation of the ZnS outer layer and concomitant oxidation of the emissive InZnP core as the main origins of degradation in the gradient structure. These modifications do not occur in the case of the alumina-capped sample, which exhibits excellent chemical stability. The gradient shell and CSS systems could be transferred to the aqueous phase using surface ligand exchange with penicillamine. Cytotoxicity studies on human primary keratinocytes revealed that exposure for 24 h to 6.25–100 nM of QDs did not affect cell viability. However, a trend toward reduced cell proliferation is observed for higher concentrations of gradient shell and CSS QDs with a thin ZnS shell, while CSS QDs with a thicker ZnS shell do not exhibit any impact.

**Keywords:** quantum dots, photostability, cytotoxicity, indium phosphide, core/shell structure, alumina coating

## INTRODUCTION

In the quest for toxic-heavy-metal-free quantum dots (QDs), indium phosphide has been shown to be a valid alternative to cadmium-based materials (Reiss et al., 2016; Allocca et al., 2019). The chemical synthesis of InP QDs and their core/shell structures has been strongly developed in the past decade with the goal to bring the optical properties to a level comparable with CdSe based QDs (Cossairt, 2016; Tamang et al., 2016). Concerning the core synthesis, it has been established that the addition of zinc, in form of carboxylate (e.g., stearate, undecylenate, oleate) improves

both the size distribution and hence the emission linewidth and the emission efficiency (Li and Reiss, 2008; Xu et al., 2008; Ung et al., 2010b; Stein et al., 2016). Nonetheless, for achieving high photoluminescence quantum yields (PLQY) and enhanced photostability the precise engineering of core/shell heterostructures is a prerequisite, and ideally, the InP or InZnP core should be covered by a thick shell of a large band gap, chemically stable semiconductor such as ZnS (Reiss et al., 2009). The synthesis of InP/ZnS nanocrystals in a single-step one-pot method by adding a sulfur source (dodecanethiol, DDT) during the core synthesis leads to an alloy structure capped with a thin ZnS shell (Huang et al., 2010). Due to the large lattice mismatch of 7.7% between zinc blende InP and ZnS it is challenging to obtain a thick shell. ZnSe has a lower mismatch (3.3%) and several works reported the growth of either pure ZnSe or graded  $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$  shells on InP or InZnP (Lim et al., 2011; Tessier et al., 2015; Pietra et al., 2016; Chandrasekaran et al., 2017). However, ZnSe provides a weaker carrier confinement than ZnS due to the smaller band gap and is more sensitive to oxidation than ZnS (Toufanian et al., 2018). Therefore, it has been suggested to add a thicker outer ZnS shell on a graded intermediate  $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$  shell (Lim et al., 2013; Ramasamy et al., 2017; Wang et al., 2017). The latter acts as a lattice adapter between the core and the outer shell leading to a core/shell/shell (CSS) system, as already demonstrated in the case of II-VI semiconductors (Reiss et al., 2003; Talapin et al., 2004). Li et al. proposed another way to enhance the photostability of CdSe- or  $\text{CuInS}_2$ -based QDs by generating an alumina coating on their surface (Li et al., 2015; Yan et al., 2016). In this case, the nanocrystal surface is treated with an appropriate aluminum precursor (e.g., aluminum isopropoxide), which transforms to alumina via oxidation. The different above-mentioned strategies for the surface passivation of InP and InZnP QDs are summarized in **Figure 1**.

The goal of the present work is to investigate the impact of the different core/shell systems discussed—core/gradient shell and CSS structures with different thickness of the outer ZnS shell and a newly developed alumina coating—on the photostability and cytotoxicity behavior of InZnP QDs. Aging experiments were carried out in a controlled and reproducible manner by integrating the QDs into a solid polymer matrix (PMMA) and irradiating them with simulated solar light in a climatic chamber. Finally, the cytotoxicity of the obtained QDs was assessed using human primary keratinocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Indium acetate (99.99%), zinc acetate (99.9%), myristic acid (>99%), tris (trimethylsilyl)phosphine (95%,  $(\text{TMS})_3\text{P}$ ), 1-octadecene (90%, ODE), trioctylphosphine (97%, TOP), sulfur (99.99%), selenium (99.99%), dimethylformamide (DMF), poly (methyl methacrylate) (PMMA,  $M_w \sim 350,000$  GPC), aluminum isopropoxide (Al (IPA)<sub>3</sub> 98%), toluene, methanol, chloroform, acetone, hexane, D-penicillamine, tetramethylammonium hydroxide (TMAOH), phosphate-buffered saline solution (1xPBS), and tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride solution 0.5 M (TCEP) were purchased from Sigma-Aldrich.

Zinc stearate (90%,  $\text{ZnSt}_2$ ) was acquired from Riedel de Haën. Oleic acid (70%) came from Fisher Chemicals. All chemicals were used as received without any further purification, unless stated otherwise.

### Zinc Ethylxanthate

Zinc ethylxanthate was prepared according to the procedure reported in Protiere and Reiss (2006).

### Preparation of Indium-Myristate

Indium acetate (6.9 mmol), myristic acid (21.4 mmol), and ODE (15 mL) were mixed in a 50 mL three neck flask. The solution was stirred and degassed under vacuum for 3 h at 120°C. After cooling down to room temperature the precipitated indium-myristate was washed with ca. 150 mL of dry hexane before drying under vacuum.

### Preparation of Zinc-Oleate

Zinc acetate (5 mmol), oleic acid (10 mmol), and 9.35 mL ODE were mixed in a 50 mL three neck flask. The solution was stirred and degassed under vacuum at 120°C for 1 h. After cooling down to room temperature the flask was backfilled with Ar and the mixture was stored in the glove box.

### Preparation of TOP-Se and TOP-S

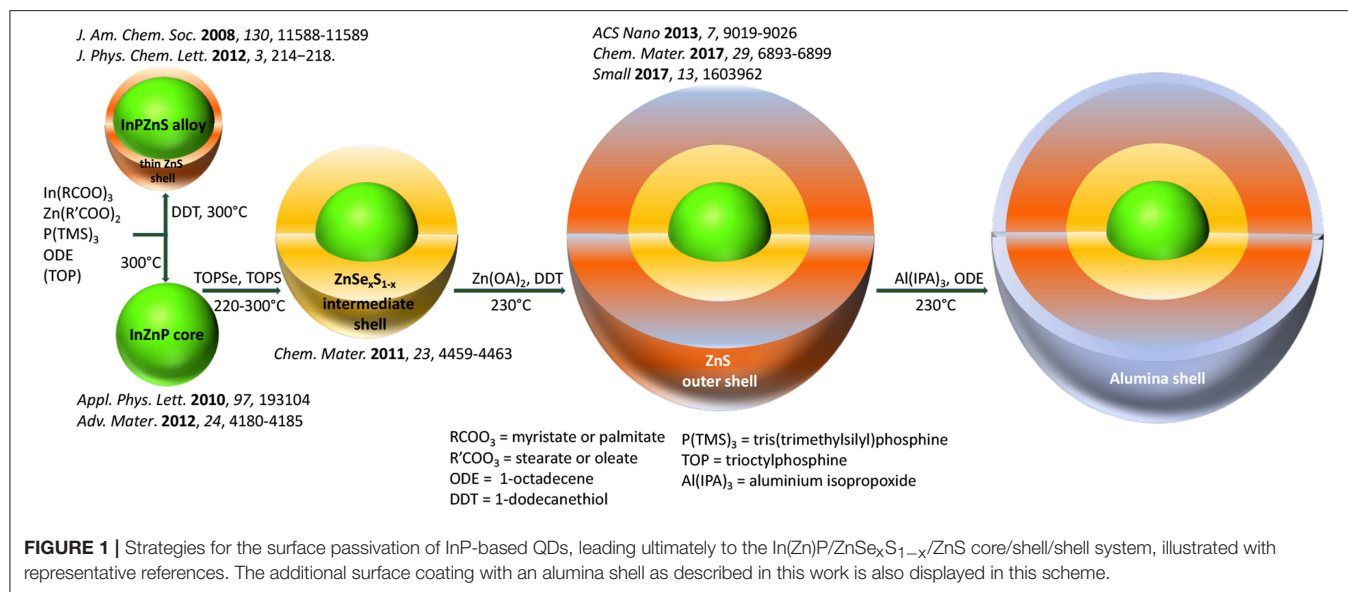
For a 0.4 M TOP-Se stock solution, 2 mmol of selenium powder were dissolved in 5 mL of trioctylphosphine (TOP) for 24 h. The preparation of a 0.4 M TOP-S stock solution was prepared similarly using elemental sulfur.

### Synthesis of InZnP Core Nanocrystals

Indium-myristate (0.1 mmol),  $\text{ZnSt}_2$  (0.2 mmol), and 8.5 mL ODE were mixed in a 50 mL three-neck flask and degassed for 1 h. The flask was backfilled with Ar and the reaction mixture was rapidly heated to 300°C in a molten salt bath. At 100°C 0.1 mmol  $(\text{TMS})_3\text{P}$ , dissolved in 1 mL ODE, was swiftly injected. After 20 min the reaction was quenched by removing the salt bath and letting cool down to room temperature.

### Synthesis of InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub> Core/Gradient Shell Nanocrystals

The InZnP core was prepared as mentioned before but instead of cooling down to room temperature the mixture was kept at 220°C. 2.5 mL of the 0.4 M zinc-oleate (1 mmol) stock solution was added dropwise followed by the swift injection of 0.444 mL of TOP-Se (0.2 mmol) stock solution mixed with 0.5 mL ODE and 1.57 mL of TOP-S (0.7 mmol) stock solution. The reaction mixture was heated to 300°C using a heating mantle with a heating ramp of 10°C per minute. The overall shell growth time was ca. 30 min and the reaction was quenched by cooling down to room temperature. The NCs were purified three times by a precipitation (1:1 v/v mixture of methanol/chloroform and acetone) and redispersion (chloroform) cycle and finally stored in hexane.



### Synthesis of InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub>/ZnS Core/Shell/Shell Nanocrystals of Variable ZnS Shell Thickness

The synthesis of the InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub> NCs was performed as described above but instead of cooling down to room temperature the mixture was kept at a temperature of 230°C using a heating mantle. In order to prepare the second (thin) ZnS shell, a mixture of 0.1 mmol zinc ethylxanthate dissolved in 100 μL DMF and 1 mL toluene was added to 0.8 mmol ZnSt<sub>2</sub> dissolved in 3 mL ODE and injected into the reaction mixture using a syringe pump with a pump rate of 8 mL/h. After 30 min of shell growth the reaction was quenched by cooling down to room temperature and the NCs purified as described above for the gradient shell. To grow a thick ZnS shell the amount of zinc ethylxanthate and zinc stearate solution was doubled and the shell growth time was extended to 60 min before quenching the reaction by cooling down to room temperature.

### Synthesis of InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub>/ZnS-Alumina

InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub> NCs synthesis was performed as described above and the mixture was kept at 230°C after gradient shell growth for 30 min. With a syringe pump, a shell mixture used for the preparation of a thin second ZnS shell was injected over the course of 30 min (0.1 mmol zinc ethylxanthate dissolved in 100 μL DMF and 1 mL toluene was mixed with 0.8 mmol ZnSt<sub>2</sub> dissolved in 3 mL ODE). When the injection of shell mixture started, 1 mL of a solution prepared by dissolving 1.12 mmol Al(IPA)<sub>3</sub> in 3 mL ODE at 40°C was slowly injected. At 10 and 20 min of the shell growth another 1-mL volume of the Al-mixture was injected. The mixture was kept for a total of 60 min at 230°C before cooling down to room temperature and purifying as mentioned before.

### Embedding InP-Based QDs in PMMA

To prepare a 30wt % PMMA solution, 3 g of PMMA were dissolved in 7 mL chloroform, stirred for 1 h and ultrasonicated several times in between for 2 min. The QD solutions had a concentration of approximately of 20 mg/mL and in order

to prepare a PMMA disc with 0.4 wt% ( $\sim 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>), ca. 12 mg (620 μL) InP-based NCs were added to the PMMA solution. The mixture was stirred for another hour and ultrasonicated in between until the QDs were homogeneously distributed. 1.5 mL of the QD-PMMA solution was filled in a Teflon mold (diameter 20 mm) and kept for 3 days in the dark to enable the slow evaporation of chloroform. The dried PMMA discs were checked to ensure the absence of any bubbles, which can appear in case the chloroform evaporates too fast. They were then unmolded and cut using a gauge in order to have the same geometry and volume for all samples (disc diameter: 15 mm, thickness: 1 mm).

### Phase Transfer Using Penicillamine

The InZnP QDs with different shells (except for alumina coating) were rendered water-soluble via ligand exchange using D-penicillamine. Therefore, a 0.2 M solution of D-penicillamine was prepared in 1 mL of degassed MilliQ water. After addition of 200 μL TCEP the pH was adjusted to 9 with TMAOH (25 wt% in methanol) solution. After thorough degassing, 0.5 mL of the ligand solution was added to 1 mL degassed colloidal solution of QDs dissolved in chloroform with a concentration of ca. 3–5 μM. The biphasic mixture was stirred vigorously for 45 min at room temperature. The mixture was quickly centrifuged to obtain a clear phase separation. The upper layer containing the QDs in the aqueous phase was separated from the organic phase and purified from excess ligands using a NAP<sup>TM</sup> 10 size exclusion column (Sephadex<sup>TM</sup> G-25 DNA Grade from GE Healthcare). The column was equilibrated with a 1X PBS buffer, which was further used as eluent and storage buffer. The transferred QD samples were stored at 4°C.

## Characterization

### Photophysical Characterization

Absorbance measurements were performed using a Hewlett Packard 8452A spectrometer and the emission spectra were

recorded using a Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon equipped with a 150 W xenon lamp for steady-state measurements and a NanoLED laser diode from Horiba with a wavelength of 350 nm and 1 MHz repetition for time-resolved measurements. Decay curves were fitted using Decay Analysis software from Horiba Scientist and intensity averaged decay times calculated according to Equation 1.

$$\tau < int > = \frac{\sum_i A_i^* \tau_i^2}{\sum_i A_i^* \tau_i} \quad (1)$$

In Equation 1  $A_i$  is the amplitude of the respective decay time  $\tau_i$ . Photoluminescence quantum yield measurements were performed at room temperature using an integration sphere, Hamamatsu Quantaaurus Absolute PL quantum yield spectrometer.

### Structural Characterization

Powder X-ray diffraction was performed using a Panalytical X'Pert diffractometer equipped with copper anode ( $\lambda_{K\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$ ,  $\lambda_{K\alpha 2} = 1.5444 \text{ \AA}$ ) and an X'Celerator 1D detector. The elemental composition was analyzed using a Zeiss Ultra 55+ scanning electron microscope equipped with an EDX probe. The XRD and EDX samples were prepared by drop-casting a concentrated NCs dispersion either on a disoriented silicon substrate or on a cleaned silicon substrate. Transmission electron microscopy (TEM) was performed at cryogenic temperature on a FEI Polara microscope operating at 300 kV and images were recorded on a Gatan K2 camera. For sample preparation, around 4  $\mu\text{L}$  of a diluted QD dispersion was applied onto a 400-mesh copper TEM grid covered with a homemade carbon film and the solvent was allowed to evaporate.

### XPS Studies

Chemical characterization by XPS was carried out using a Versaprobe II ULVAC-PHI spectrometer. A monochromatic beam (X-ray source Al- $K_{\alpha}$  1486.6 eV) of 100  $\mu\text{m}$  diameter and 97 W power was focused on the surface of the samples. Survey spectra were measured over a spectral range of 0–1200 eV to identify the elements present in the material using a pass energy of 117 eV which corresponds to a resolution of 1.6 eV. High-resolution spectral analyses were performed using a pass energy of 23 eV which corresponds to a resolution of 0.5 eV. All XPS measurements were carried out in an ultra-high vacuum chamber ( $7.10^{-8}$  mbar).

All XPS spectra binding energies were corrected using the C 1s line of alkyl groups of PMMA at 285.0 eV. Curve fitting and background subtraction were accomplished using Casa XPS software. The spectra curve fitting was performed using Voigt function, convolution product of Gaussian (80%) and Lorentzian (20%) distributions.

### Aging Tests in a Climatic Chamber

The QD-PMMA disks were placed in a Q-SUN Xe-1 Xenon arc test chamber (Q-LAB) providing full sunlight spectrum and continuously irradiated up to 32 h. Weathering conditions were adapted from the ISO norm 4892-2:2006, developed for studying the aging of plastics. The irradiance and temperature were fixed

at 1.44 W/m<sup>2</sup> (measured at 420 nm) and 40°C, respectively, with no humidity control. PL measurements were performed after an irradiance time of 6, 12, 24, and 32 h.

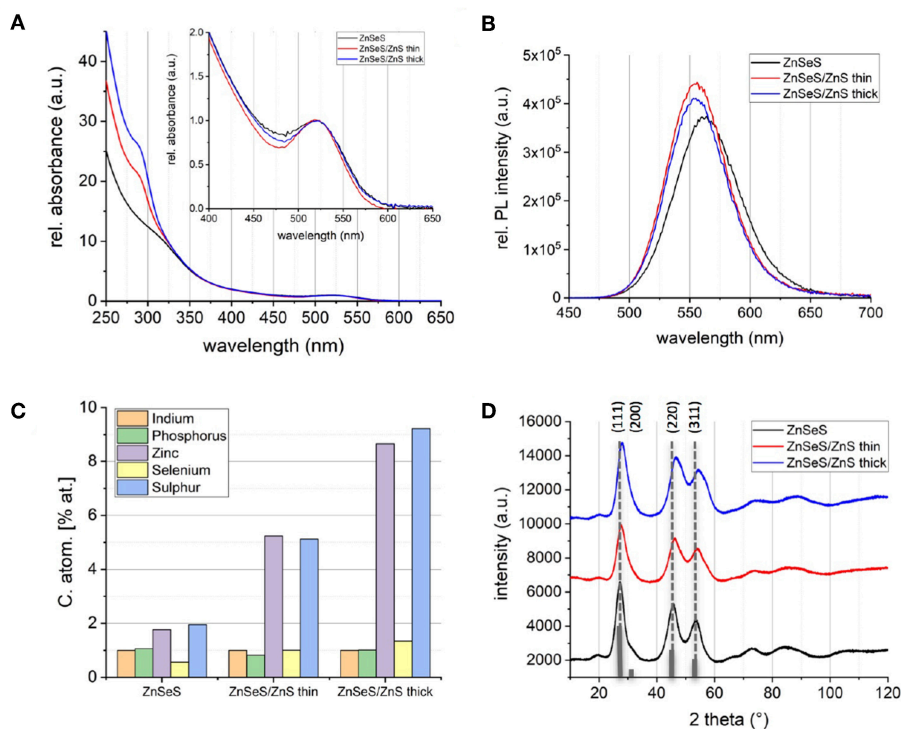
### Toxicity Testing

Human skin samples were obtained following breast surgery from healthy female donors with their informed consent (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France). Keratinocytes were isolated as previously described (Mouret et al., 2006). They were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in keratinocyte serum-free medium (KSF-M) supplemented with 1.5 ng/ml EGF, 25  $\mu\text{g/ml}$  bovine pituitary extract, 75  $\mu\text{g/ml}$  primocin. For all experiments, cells were used at passages 1 or 2. They were seeded in 96-well plates at 5,000 cells per well. When they reached 60% of confluence, they were exposed for 24 h to 6.25–100 nM of QDs. Exposure medium was then sampled and used to assess the release of lactate dehydrogenase (LDH) from cells (LDH assay kit, Sigma-Aldrich), which is a marker of cell membrane integrity, i.e., cell viability. The ability of these cells to proliferate was evaluated by quantifying the incorporation of 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) in their DNA (BrdU assay kit, Roche). Both assays were performed following manufacturer's instructions. Triton X100 (0.1%) was used as positive control.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization of the Different Core/Shell Systems

**Figure 2** shows the UV-vis absorption and photoluminescence (PL) spectra as well as EDX data of InZnP/ZnSe<sub>x</sub>S<sub>1-x</sub> core/gradient shell QDs before and after growth of an additional ZnS shell. In contrast to literature methods, the monomolecular precursor zinc ethylxanthate has been applied for ZnS growth. As expected, the absorption spectra show an enhanced absorbance below 350 nm with increasing ZnS shell thickness. The EDX data (**Figure 2C**) also confirms unambiguously the successful growth of the thin and thick ZnS shells on the core/gradient shell system (**Figures 4C,D**). The same core diameter ( $2.67 \pm 0.32$  nm from TEM measurements) was used for all samples. In accordance with the elemental increase determined from EDX and TEM data, the thicknesses of the shells are around 2 monolayers (gradient shell), 3 monolayers (thin ZnS shell) and 4–5 monolayers (thick ZnS shell). Due to the fact that the gradient shell already provides a very good surface passivation, the additional ZnS growth only slightly improves the PL intensity (PLQY: 50.9% gradient shell, 56.5% CSS thin, 63.6% CSS thick). A small blue shift of the PL maximum with increasing shell thickness (cf. **Table S1**, up to 9 nm for the thick ZnS shell) likely originates from the strain exerted on the core due to the smaller lattice parameter of ZnS. This hypothesis is confirmed by powder X-ray analyses, showing a shift of the diffraction peaks characteristic of InZnP to wider angles upon ZnS shell growth (cf. **Figure 2D**). Time-resolved PL studies (**Figure S1**, **Table S2**) reveal similar averaged decay times on the order of 65–67 ns before and after ZnS shell growth, however, the shortest lifetime is constantly decreasing with



**FIGURE 2 |** Normalized absorbance spectra **(A)** and absorbance corrected PL spectra **(B)** of InZnP QDs with ZnSeS (black), ZnSeS/ZnS thin (red), and ZnSeS/ZnS thick shell (blue). **(C)** Indium normalized composition determined with EDX. **(D)** Powder X-ray diffractograms (Cu-K $\alpha$ ); the reference pattern of bulk zinc blende InP (JCPDS file #32-0452) is added as gray bars.

increasing ZnS shell thickness, suggesting a smaller contribution of surface trap states (Wegner et al., 2019).

As an additional surface passivation step, coating with an alumina layer was explored. While this treatment has been shown to yield a significant stability enhancement of CdSe and CuInS<sub>2</sub>-based NCs (Li et al., 2015; Yan et al., 2016), it has not yet been applied to indium phosphide based QDs. To induce the formation of the alumina coating, we added a well-defined amount of aluminum isopropoxide during the growth of the (thin) ZnS shell on the gradient shell (cf. Experimental Section). While the absorption and PL spectra remain essentially unchanged with respect to the CSS system (Figure S2) and a high PL QY is maintained (48%), aluminum treatment induces a higher value of the averaged PL decay time (82.8 ns, cf. Table S3). EDX analysis shows that a significant amount of aluminum has been incorporated into the QDs with an In:Al ratio of 1:9. Such a high ratio is indeed required for forming, as hypothesized, a monolayer of alumina on an In(Zn)P core already passivated with a gradient and a thin ZnS shell.

## Photostability in PMMA

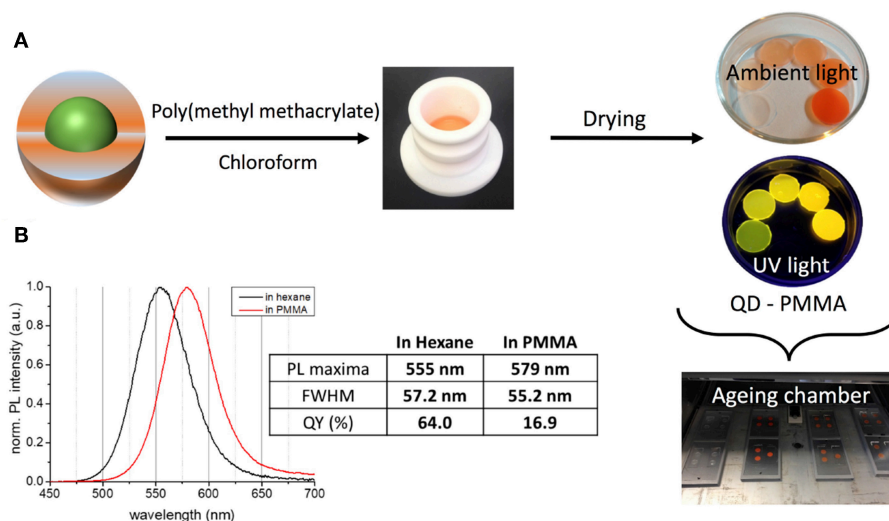
For assessing the photostability under controlled conditions, the QDs were first integrated into a PMMA matrix. The main advantages of PMMA are its optical transparency (Figure S3), stability under irradiation, amorphous character, ease of composites processing, and the mechanical stability of the obtained monolithic materials. Figure 3 depicts the different

steps of composite preparation and aging experiments. By optimizing the PMMA concentration in chloroform (30 wt%) and slow drying, homogeneous composites without air-bubbles could be obtained, suitable for optical measurements. A QD loading of 0.4 wt% resulted in the best compromise of film homogeneity and PL QY (cf. Table S4).

Incorporation into the PMMA matrix leads to a significant bathochromic shift of the PL emission maximum with increasing QD concentration in the composite (cf. Figure 3, Figure S4), accompanied by a small reduction of the PL line width. For the gradient shell and CSS system this shift accounts for 26 and 24 nm (97 meV/93 meV), respectively, while it is less pronounced in the case of the aluminum treated sample (14 nm, 56 meV). At the same time, a significant decrease of the PLQY is observed with the retained QY following the order CSS (16.9%, decrease: 73%) > aluminum treated (10.1%, decrease: 79%) > gradient shell (7.6%, decrease: 85%). Similar effects have been observed in other studies on QD incorporation into a PMMA matrix via physical mixing of both components (Zvaigzne et al., 2015). We attribute both phenomena (PL shift and QY decrease) to the fact that in the thick QD-polymer composite radiative or non-radiative energy or charge transfer processes take place favored by the close proximity of the QDs and their size distribution.

As already studied in close-packed InP-based QD films without polymer matrix (Ung et al., 2010a), in principle three processes can occur: (i) resonance photon reabsorption; (ii) Förster resonance energy transfer; (iii) direct excited charge





**FIGURE 3 | (A)** Processing of the QDs for aging experiments using a PMMA matrix and different concentrations of QDs. **(B)** Comparison of the PL properties of InZnP/ZnSeS/ZnS (thick shell) QDs in colloidal solution (hexane) and after embedding in the PMMA matrix.

carrier transfer from one QD to another. Due to the expected increased spatial separation of the QDs in the polymer as compared to close-packed films, process (i) could be favored here. However, it has been shown in many literature examples that the physical mixing of QDs with the polymer matrix can induce phase segregation and aggregation of the QDs (Ghimire et al., 2018). Therefore, processes (ii) and (iii) can also take place in the present case. The identification of the predominant mechanisms requires additional studies which go beyond the scope of the present work.

During 32 h of continuous irradiation with simulated solar light in an aging chamber at 40°C, the gradient shell system exhibits a hypsochromic shift of the PL maximum of 55 meV, while the position of the other two samples is essentially stable (Figure 4A). Nonetheless, all samples show an increase of the emission linewidth, which is most pronounced for the gradient shell, followed by the thick shell and the aluminum treated sample (Figure 4B). The evolution of the PLQY confirms this last sample to be the most photostable one: as visible from the comparison of the relative QY loss under irradiation (Figure 4D), the gradient shell and CSS systems present identical behavior, while the aluminum treated sample maintains a higher fraction of the initial PL intensity. Intriguingly, all studied samples exhibit a very similar degradation kinetics displaying a fast PL loss during the first 6 h of irradiation before reaching a regime exhibiting a much slower slope and eventually a plateau for extended durations. To confirm the absence of influences arising from potential aging effects of the PMMA matrix the latter has been submitted to identical irradiation experiments on its own (i.e., without QDs) (Figure S5).

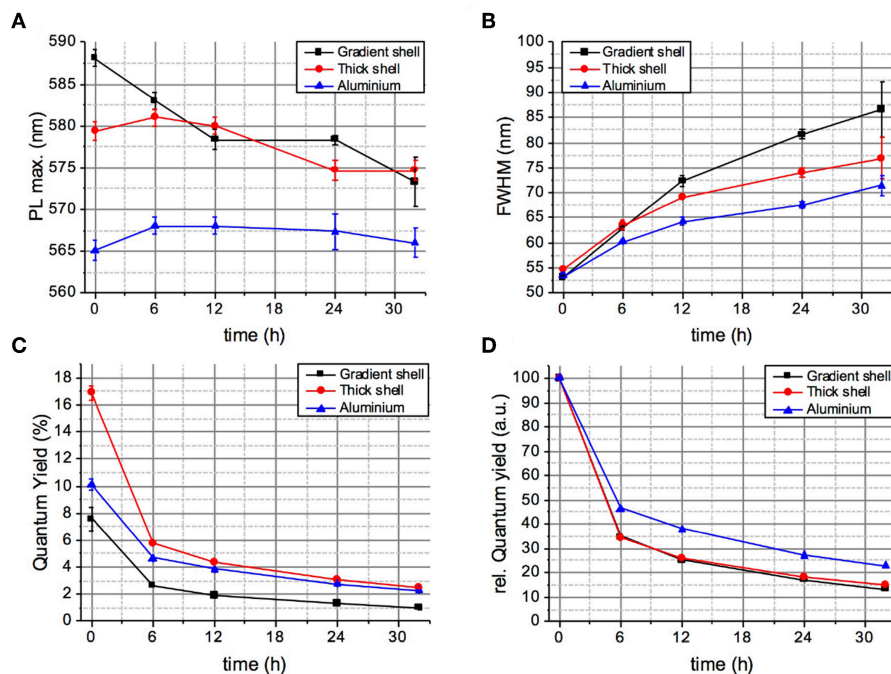
Noteworthy, the general trends of PL intensity evolution of the three systems are similar when keeping the composites at room temperature in the dark (cf. Figure S6), while no evolution of the optical properties is observed for samples kept in the colloidal state either in organic solvent or in PBS buffer after

aqueous phase transfer (vide infra). In the PMMA matrix, the QY gradually decreases over time for the CSS and gradient shell systems, while it remains stable for the aluminum treated sample. In contrast to the case of solar irradiation, no fast QY loss during the first hours is observed, which clearly confirms that this fast degradation is light induced. As visible from the evolution of the normalized PL spectra with irradiation duration (Figure S7), in all three samples the contribution of trap-state emission in the 650–750 nm range markedly increases over time. One possible explanation for the activation of trap states and the observed PL decrease in the first 6 h of irradiation is light-induced rearrangement of the nanocrystal surface (Saba et al., 2013). This process, leading ultimately to photocharging and charge trapping, is influenced in the present case by interaction of the QD surface with the polymer matrix.

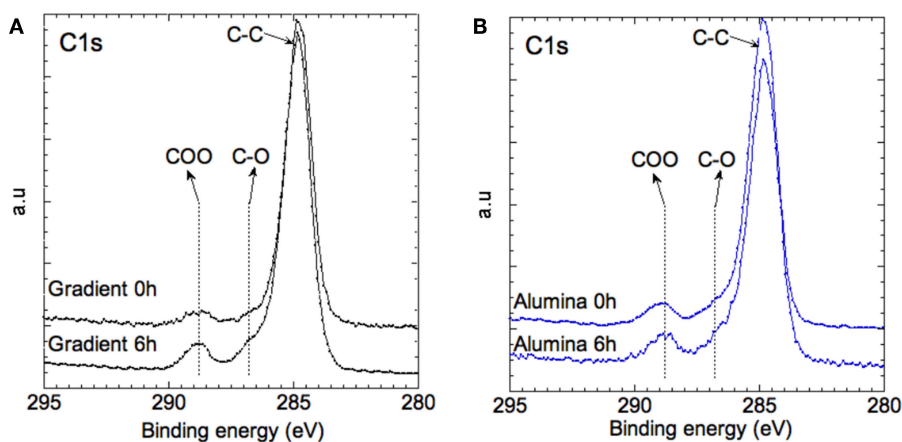
## XPS Analysis

To probe the change of surface chemistry of QDs as well as PMMA stability over aging, we performed XPS analyses for which the probed depth is about 5 nm. Two samples were studied before and after 6 h of irradiation: InZnP/ZnSeS gradient shell QDs, most affected by the aging, and aluminum treated CSS QDs, least affected, both embedded in the PMMA matrix. Figure 5 shows the C1s core level of the pristine and irradiated samples. The main feature of the spectra is that the signatures of PMMA are preserved after 6 h of irradiation, for instance the C-C (285.0 eV), C-O (286.7 eV), and COO (288.7 eV) signals, indicating that PMMA remains stable during the selected aging time.

The valence change of zinc was studied through the analyses of the Zn 2p core peak and Zn L<sub>3</sub>M<sub>45</sub>M<sub>45</sub> Auger lines (Figure 6). The Zn 2p signal shows a main peak at 1022.7 eV assigned to the +II valence state of zinc. The binding energy of Zn 2p<sub>3/2</sub> does not change during aging in the case of the aluminum treated sample, while a slight shift (+0.3 eV) to higher binding



**FIGURE 4** | Evolution of the PL maximum wavelength (A), linewidth (B), absolute PLQY (C), and relative PLQY (D) of the QD-PMMA composites during 32 h of continuous aging (irradiation with a solar simulator at 40°C).



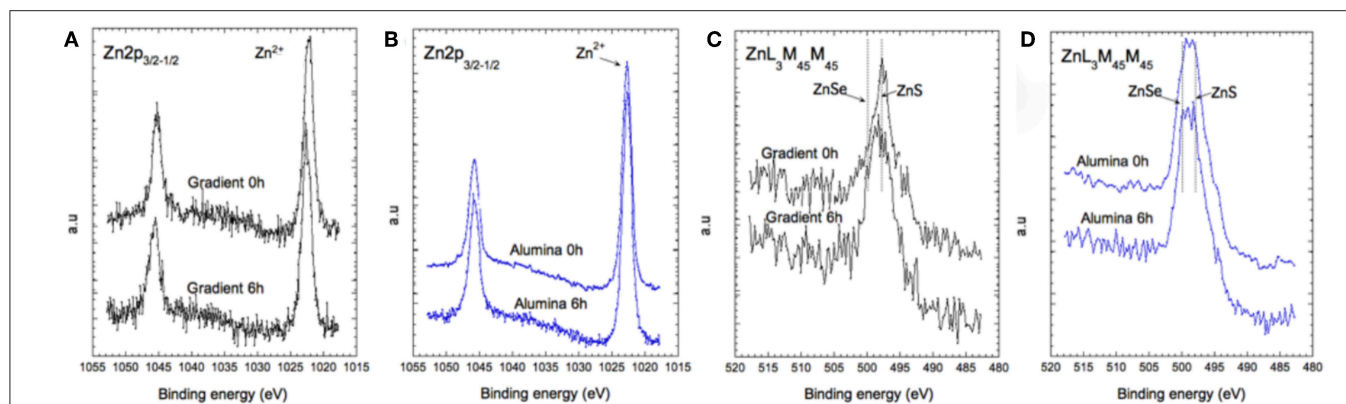
**FIGURE 5** | XPS spectra of the C1s core level of (A) the gradient shell sample and (B) the aluminum treated sample at 0 and 6 h of aging.

energies is observed for the gradient QDs after 6 h of irradiation. To further investigate the chemical environment of the zinc atoms, analysis of the Zn  $L_3M_{45}M_{45}$  Auger peaks provides detailed information, which can be extracted from the shapes, intensities, and locations of the Auger lines involving deep Zn  $2p_{3/2}$  ( $L_3$ ) and shallow Zn  $3d_{5/2-3/2}$  ( $M_{45}$ ) core levels. The Auger line arises from the three nearly degenerated levels 1D, 3P, and 1G, and two extreme levels 1S and 3F constituting the higher and lower energy shoulders of the Auger line (inset of **Figure 6**). As a first approximation, the main peak of each chemical group can be represented by the 1D, 3P,

and 1G triad (nX) symbolized by a dashed line (Lee et al., 2014). With these information, the Wagner parameter can be defined (Wagner, 1972):

$$\alpha = E_b(\text{Zn}2p_{3/2}) + E_K(\text{Zn LMM})$$

where  $E_k$  is the kinetic energy of the core-valence-valence Auger transition electron, and  $E_b$  the binding energy of the  $\text{Zn}2p_{3/2}$  core electron referred to the Fermi energy.



**FIGURE 6** | XPS spectra of the Zn 2p core level (A,B) and of the Auger transition Zn  $L_3M_{45}M_{45}$  (C,D) for the gradient shell sample and the aluminum treated sample at 0 and at 6 h of aging.

Materials with similar Wagner parameters have closely similar extra-atomic relaxation arising from multiplet coupling in the final states, i.e., the extra-atomic polarization energy and the local electronic structure of the material. Hence, we can distinguish at least three families of zinc-ligand species for both types of samples (gradient shell and aluminum treated), since we can extract at least three Wagner parameters:  $\alpha_1$  at 2009.6 eV,  $\alpha_2$  at 2011.1 eV and  $\alpha_3$  at 2013.1 eV. They can be assigned to zinc in ZnSe, ZnS, and Zn-Zn chemical environment, respectively. At this stage, the contribution of the ZnSe and ZnS phases is difficult to quantify from the spectral signature. However, it appears that in the case of the aluminum treated QDs the zinc related environment remains stable over time. In the case of the gradient shell QDs, the ZnS related bonds are dominant in the pristine material and decrease after 6 h of aging, while the ZnLMM spectral shape becomes similar to that recorded in the case of aluminum treated QDs.

**Figures 7A,B** reports the Se 3d core level of both systems. In the case of the gradient shell, the spectra show one doublet at 54.1–55.0 eV (associated to spin-orbit coupling), signature of  $Se^{2-}$  ions in ZnSe. In the case of the aluminum treated QDs, we observe two doublets at 54.1–55.0 and 54.9–55.8 eV associated with ZnSe and  $ZnSe_xS_{(1-x)}$ , respectively. These differences are unexpected, as the core and gradient shell were synthesized in the same manner for both systems. On the other hand, as the additional growth steps in the case of the alumina-capped sample imply prolonged heating to 230°C, a more pronounced interdiffusion of the ZnSe and ZnS phases may take place giving rise to the mixed  $ZnSe_xS_{(1-x)}$  phase. The S 2p doublet (**Figure 7D**) at 162–164 eV is the signature of  $S^{2-}$  ions in ZnS environment. The ZnS:ZnSe ratio remains stable during aging (cf. **Table S5**). For the gradient shell, the presence of oxidized sulfur ( $-SO_4$ ) is observed (**Figure 7C**) whose concentration increases slightly after aging.

At a first approximation, the In  $3d_{5/2}$  peak recorded at the surface centered at 445.4 eV can be assigned to  $In^{3+}$  ions in  $In_2O_3$  and/or  $In(OH)_3$ . The presence of In (S, Se, P) cannot be excluded since the P 2p core level peak (not shown) exhibits two contributions, a major one around 134 eV

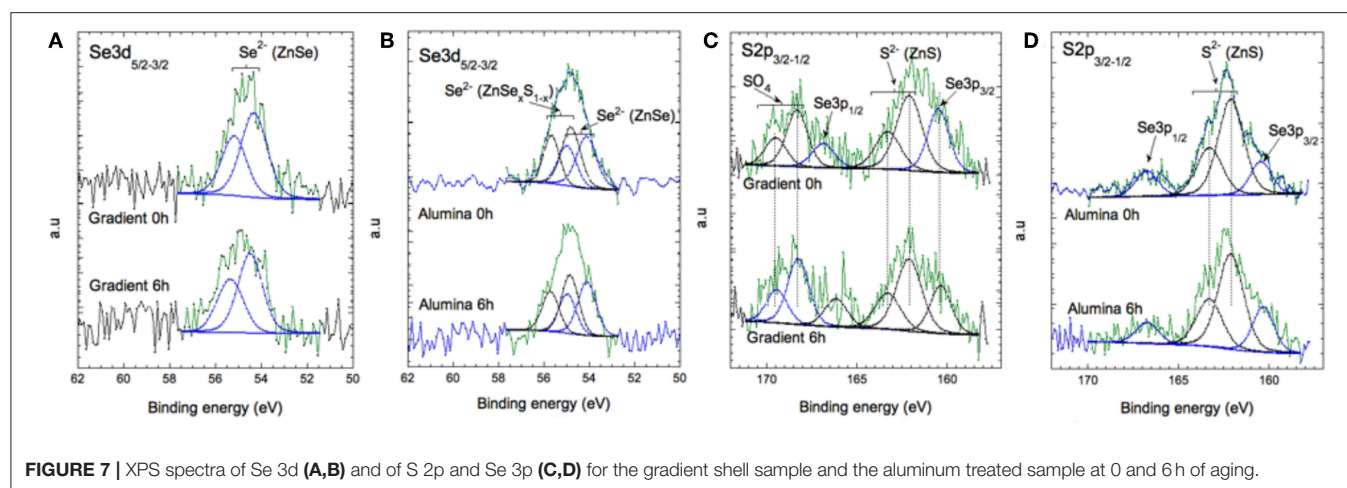
attributed to phosphate groups ( $InPO_x$ ) and a low intensity peak around 130 eV assigned to In-P bonds (**Figure 8**). Oxidation of the core/shell interface in InP-based QDs occurring during the synthesis under similar experimental conditions has been reported by Delpech and coworkers (Virieux et al., 2012). It has been attributed to the *in situ* generation of minute amounts of water due to side reactions of the fatty acid ligands (e.g., myristate, stearate).

In the case of the aluminum treated sample, the ratio between both indium species remains quasi-stable whereas in the case of the gradient system significant changes are observed (**Figures 8A,B**).

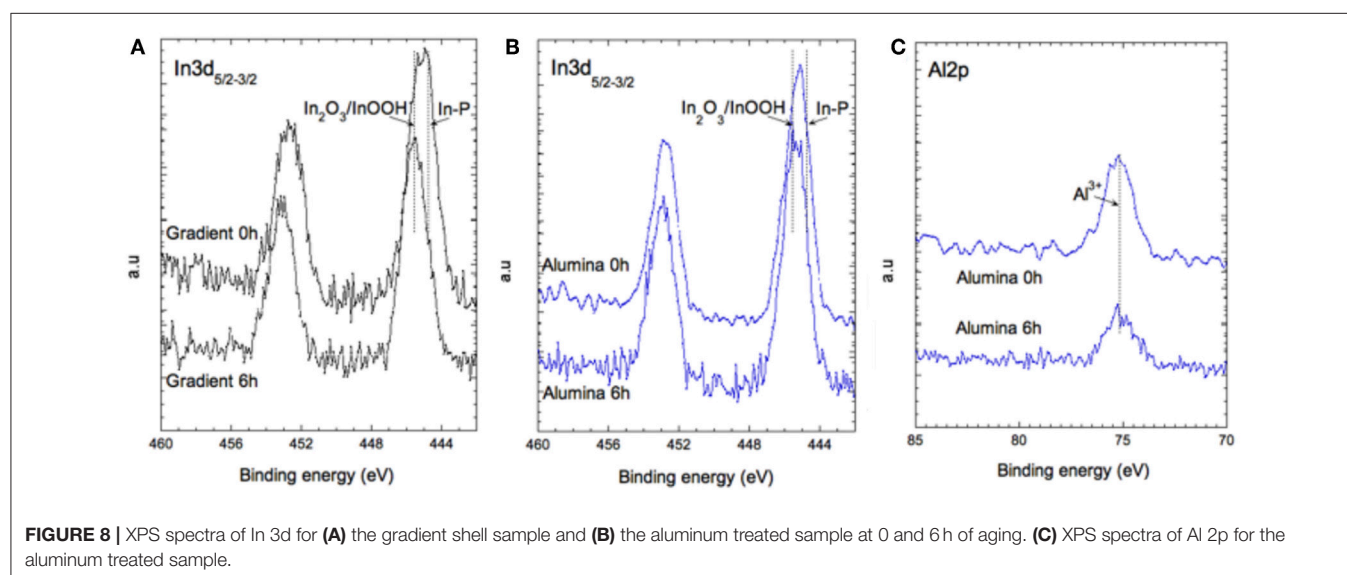
The Al 2p core level is the signature of  $Al^{3+}$  like in  $Al_2O_3$ . It stays the same after 6 h of aging, confirming that the aluminum coating is very stable and does not degrade under irradiation (**Figure 8C**). Taken together, the presented XPS results fully underpin the stability differences of the two systems expected from the photophysical studies. In the case of the gradient shell, the initial ZnS outer layer already shows distinct signs of oxidation right from the start ( $-SO_4$  species), which are not detectable in the aluminum treated sample. Furthermore, during the aging process the degradation of the gradient shell sample continues, as visible by the XPS spectral changes, in particular the decrease of the signals characteristic for ZnS related bonds and increase of the oxidized indium component. The latter implies a reduction of the emissive core size, which is supposed to be at the origin of the observed hypsochromic shift of the PL maximum (cf. **Figure 4A**).

## Cytotoxicity Studies

Aqueous phase transfer of the QDs was achieved by surface ligand exchange with zwitterionic penicillamine (**Figure 9**) (Tamang et al., 2011; Mattera et al., 2016). In this procedure, the QDs in chloroform are brought into intimate contact with an aqueous solution of penicillamine. The pH of the aqueous phase is adjusted in the basic range (around 9), to favor the deprotonation of the thiol moiety leading to efficient binding to the ZnS surface of the QDs. In the case of the alumina-coated system, however, this approach was not successful. Other types



**FIGURE 7** | XPS spectra of Se 3d (A,B) and of S 2p and Se 3p (C,D) for the gradient shell sample and the aluminum treated sample at 0 and 6h of aging.



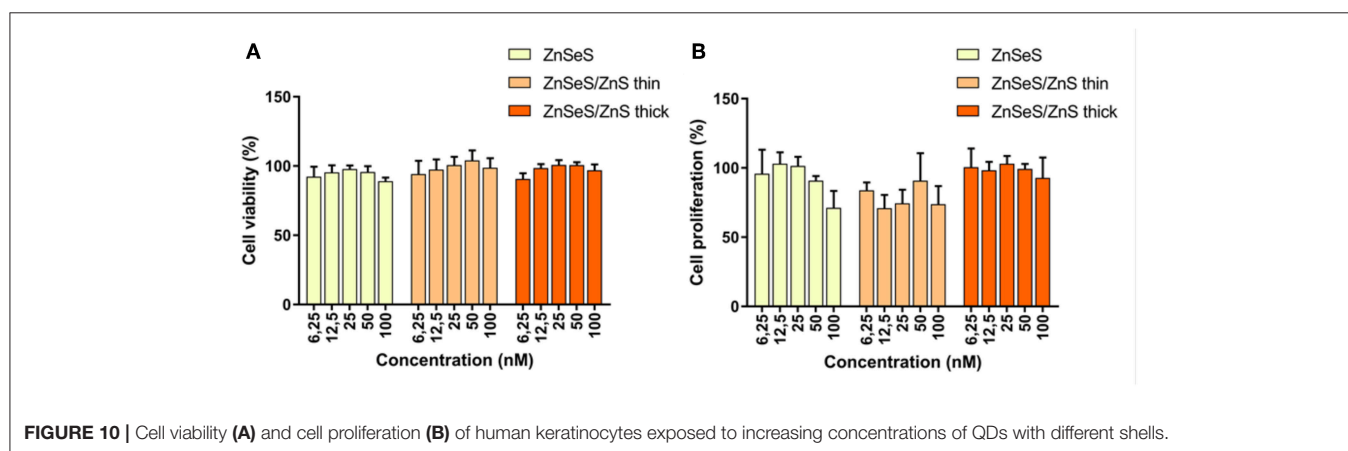
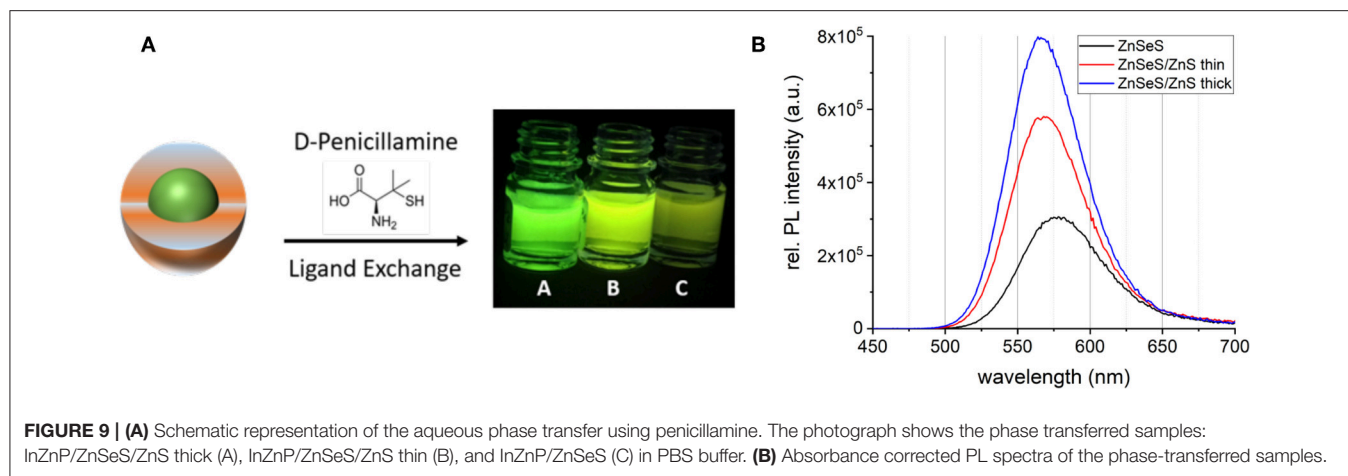
**FIGURE 8** | XPS spectra of In 3d for (A) the gradient shell sample and (B) the aluminum treated sample at 0 and 6h of aging. (C) XPS spectra of Al 2p for the aluminum treated sample.

of surface chemistries have to be developed there, which are the subject of ongoing research. Therefore, in the remaining part of this article we will focus on the core/shell systems without aluminum treatment.

While the absorbance properties are not affected by the phase transfer, the PL peaks exhibit a bathochromic shift of around 10–15 nm accompanied by a slight line broadening (Table S6). The PL intensity strongly depends on the shell thickness of the QDs as seen in the photograph in Figure 9A and in the spectra in Figure 9B. As generally observed in phase transfer methods applying direct surface ligand exchange, the PLQY significantly decreases. This decrease is particularly pronounced for the gradient shell sample (QY: 6.0%) whereas the systems with additional ZnS shells exhibit enhanced PL conservation (QY: 15.5% CSS thin; 17.1% CSS thick). The gradient shell sample shows a significant decrease in the average decay time after phase transfer and a concomitant increase of the amplitude of the shortest lifetime (Figure S8, Table S7). All three systems exhibit an increase of the latter, albeit the trend of the contribution

of the short lifetime component is maintained in the order gradient shell > CSS thin > CSS thick, as in the samples before phase transfer. All in all, these results indicate that surface trap states induced by the ligand exchange reaction are at the origin of the PLQY decrease. As expected this detrimental effect can be reduced by increasing the shell thickness. Dynamic light scattering (DLS) measurements (Figure S9) confirm the absence of larger-sized aggregates. The hydrodynamic diameters of the samples extracted from DLS are consistent with the values obtained from TEM analysis (Figure S10). However, the precise determination of the QD sizes is challenging due to the low contrast of the ZnS shell in TEM and the small diameters in the 4–6 nm range.

Since the QDs are synthesized in liquid phase with no risk of aerosolisation, the most probable exposure route for humans is through skin contact (Reiss et al., 2016). Impact of these QDs was assessed *in vitro* on skin cells, i.e., primary keratinocytes isolated from human donors. As shown in Figure 10A, exposure to 6.5–100 nM of QDs for 24 h do not



cause any leakage of lactate dehydrogenase from cells, i.e., do not affect cell membrane integrity, which is classically used as a proxy for cell viability. BrdU, an analog of the nucleoside thymidine which is incorporated into DNA during replication, was used as an indicator of QD impact on cell proliferation. A trend toward reduced cell proliferation is observed in cells exposed to QDs (**Figure 10B**). This trend is observed in cells exposed to QDs with a gradient shell and CSS with a thin shell, but not to CSS with a thick shell. This shows that the thick shell not only facilitates the phase transfer and preserves best the photophysical properties but is also beneficial from a cytotoxicity point of view. These features combined with the compact size of the penicillamine-capped CSS QDs make them particularly interesting for further applications in biosensing.

## CONCLUSIONS

With the goal to improve the photostability of InP-based QDs, we have synthesized three different types of core/shell structures. The first one uses a  $\text{ZnSe}_x\text{S}_{1-x}$  gradient shell as reported by Lim et al. (2011). In the second, CSS system, additional growth of a ZnS shell of controlled thickness on top of the gradient

shell has been undertaken, using the monomolecular precursor zinc ethylxanthate (Protiere and Reiss, 2006). Finally, in the third system alumina coating was performed on top of the ZnS shell. When incorporated into a PMMA matrix and submitted to continuous irradiation in a climate chamber, the three systems exhibit distinctly different behavior. While all of them show a marked drop of QY within the first 6 h of irradiation, the aluminum treated sample retains most of the initial PL intensity. The gradient shell and CSS systems show a minor but continuous loss of QY also in the dark, which is attributed to the interaction of the PMMA matrix with the Zn-based shell. It has been shown that PMMA-type polymers can act as efficient sorbents for Zn (II) ion removal (Jakóbk-Kolon et al., 2017). To the contrary, the aluminum treated sample is fully stable in the dark.

XPS studies revealed that upon irradiation the degradation of the ZnS outer layer and oxidation of the In(Zn)P core are at the origin of the observed decrease of PL intensity and hypsochromic shift of the PL maximum. XPS also confirmed the formation of an  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -type layer in the case of the aluminum treated sample, which effectively protects against degradation. The chemical stability of the alumina capped sample being thus demonstrated, the observed decrease of PLQY upon continuous irradiation is ascribed to light-induced surface reconstruction. The modification of the configuration of surface

atoms and capping ligands can introduce defect states favoring photocharging of the QDs and charge carrier trapping. Similar processes are also at work in the case of the gradient and CSS systems, in addition to photo-oxidation. These detrimental effects could likely be overcome by increasing the inorganic shell thickness, providing a more efficient separation of the emissive core and the environment.

With the gradient shell and CSS systems phase transfer was achieved using surface ligand exchange with penicillamine and a clear correlation between the retained PLQY and shell thickness was observed. Cytotoxicity studies indicate that the different types of QDs do not influence the cell viability of human keratinocytes. On the other hand, a trend of reduced cell proliferation is observed for cells exposed to higher concentrations of gradient shell and CSS QDs with a thin ZnS outer shell. This trend is not visible for the CSS QDs with a thicker ZnS shell, confirming both the necessity and advantageous features of thicker shells protecting InP-based QDs. Ongoing studies concern the aqueous phase transfer of alumina-coated QDs, either via encapsulation with ambipolar macromolecules (e.g., phospholipids) or through the identification of appropriate bifunctional molecules for ligand exchange. Furthermore, with the goal to reduce PL losses during the QD incorporation in the matrix, different types of suitable polymers (e.g., polystyrene, polydimethylsiloxane, or block copolymers) deserve attention as well as approaches preventing from undesired phase-segregation of the QDs and the polymer by introducing specific interactions between both components (Ghimire et al., 2018).

Concluding, the presented results contribute to the better understanding of the degradation mechanisms of core/shell QDs and to the development of InP-based QD heterostructures combining enhanced chemical and photostability, bringing them closer to the requirements of real-life applications.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

## REFERENCES

- Allocca, M., Mattera, L., Bauduin, A., Miedziak, B., Moros, M., De Trizio, L., et al. (2019). An integrated multilevel analysis profiling biosafety and toxicity induced by indium- and cadmium-based quantum dots *in vivo*. *Environ. Sci. Technol.* 53, 3938–3947. doi: 10.1021/acs.est.9b00373
- Chandrasekaran, V., Tessier, M. D., Dupont, D., Geiregat, P., Hens, Z., and Brainis, E. (2017). Nearly blinking-free, high-purity single-photon emission by colloidal InP/ZnSe quantum dots. *Nano Lett.* 17, 6104–6109. doi: 10.1021/acs.nanolett.7b02634
- Cossairt, B. M. (2016). Shining light on indium phosphide quantum dots: understanding the interplay among precursor conversion, nucleation, and growth. *Chem. Mater.* 28, 7181–7189. doi: 10.1021/acs.chemmater.6b03408
- Ghimire, S., Sivasdas, A., Yuyama, K.-I., Takano, Y., Francis, R., and Biju, V. (2018). Quantum dot–polymer conjugates for stable luminescent displays. *Nanoscale* 10, 13368–13374. doi: 10.1039/C8NR01501E

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC and PR conceived and designed the study. KW performed the synthetic work and data analysis with assistance of PR and MC. AB performed the XPS studies and analysis. DT-B carried out the aging experiments and assisted in the XPS analysis. FD and DB performed cytotoxicity studies. LM helped with QD phase transfer. WL performed transmission electron microscopy. PR wrote the manuscript with assistance of KW and MC. All authors contributed to its finalization.

## FUNDING

This work is a contribution to the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) funded by the French Government's Investissements d'Avenir ANR program, through the A\*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). The authors thank the French National Research agency ANR for financial support (grants NEUTRINOS, ANR-16-CE09-0015-03 and FLUO, ANR-18-CE09-0039-01). We thank the CEA DRF Impulsion program (Cryo-ME\_NP) for partial financial support of this work. This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The IBS electron microscope facility is supported by the Auvergne-Rhône-Alpes Region, the fonds FEDER, the Fondation Recherche Médicale (FRM), C GIS-IBISA.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the electron microscopy platform, especially Dr. G. Schoehn and Dr. M. Bacia.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00466/full#supplementary-material>

- Huang, K., Demadrille, R., Silly, M. G., Sirotti, F., Reiss, P., and Renault, O. (2010). Internal structure of InP/ZnS nanocrystals unraveled by high-resolution soft X-ray photoelectron spectroscopy. *ACS Nano* 4, 4799–4805. doi: 10.1021/nn100581t
- Jakóbk-Kolon, A., Milewski, A., Zdybał, D., Mitko, K., Laskowska, E., Mielanczyk, A., et al. (2017). Zinc sorption on modified waste poly (methyl methacrylate). *Materials* 10:755. doi: 10.3390/ma10070755
- Lee, E., Benayad, A., Shin, T., Lee, H., Ko, S. D.-S., Kim, T. S., et al. (2014). Nanocrystalline ZnON; High mobility and low band gap semiconductor material for high performance switch transistor and image sensor application. *Sci. Rep.* 4:4948. doi: 10.1038/srep06897
- Li, L., and Reiss, P. (2008). One-pot synthesis of highly luminescent InP/ZnS nanocrystals without precursor injection. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11588–11589. doi: 10.1021/ja803687e
- Li, Z., Yao, W., Kong, L., Zhao, Y., and Li, L. (2015). General method for the synthesis of ultrastable core/shell quantum dots by aluminum doping. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 12430–12433. doi: 10.1021/jacs.5b05462

- Lim, J., Bae, W. K., Lee, D., Nam, M. K., Jung, J., Lee, C., et al. (2011). InP@ZnSe<sub>S</sub>, Core@Composition gradient shell quantum dots with enhanced stability. *Chem. Mater.* 23, 4459–4463. doi: 10.1021/cm201550w
- Lim, J., Park, M., Bae, W. K., Lee, D., Lee, S., Lee, C., et al. (2013). Highly efficient cadmium-free quantum dot light-emitting diodes enabled by the direct formation of excitons within InP@ZnSeS quantum dots. *ACS Nano* 7, 9019–9026. doi: 10.1021/nn403594j
- Mattera, L., Bhuckory, S., Wegner, K. D., Qiu, X., Agnese, F., Lincheneau, C., et al. (2016). Compact quantum dot-antibody conjugates for FRET immunoassays with subnanomolar detection limits. *Nanoscale* 8, 11275–11283. doi: 10.1039/C6NR03261C
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., and Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 13765–13770. doi: 10.1073/pnas.0604213103
- Pietra, F., De Trizio, L., Hoekstra, A. W., Renaud, N., Prato, M., Grozema, F. C., et al. (2016). Tuning the lattice parameter of InxZnyP for highly luminescent lattice-matched core/shell quantum dots. *ACS Nano* 10:4754. doi: 10.1021/acsnano.6b01266
- Protiere, M., and Reiss, P. (2006). Facile synthesis of monodisperse ZnS capped CdS nanocrystals exhibiting efficient blue emission. *Nanoscale Res. Lett.* 1, 62–67. doi: 10.1007/s11671-006-9001-0
- Ramasamy, P., Kim, N., Kang, Y.-S., Ramirez, O., and Lee, J.-S. (2017). Tunable, bright, and narrow-band luminescence from colloidal indium phosphide quantum dots. *Chem. Mater.* 29, 6893–6899. doi: 10.1021/acs.chemmater.7b02204
- Reiss, P., Carayon, S., Bleuse, J., and Pron, A. (2003). Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies. *Synth. Met.* 139, 649–652. doi: 10.1016/S0379-6779(03)00335-7
- Reiss, P., Carrière, M., Lincheneau, C., Vaure, L., and Tamang, S. (2016). Synthesis of semiconductor nanocrystals, focusing on nontoxic and earth-abundant materials. *Chem. Rev.* 116, 10731–10819. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00116
- Reiss, P., Protiere, M., and Li, L. (2009). Core/shell semiconductor nanocrystals. *Small* 5, 154–168. doi: 10.1002/sml.200800841
- Saba, M., Aresti, M., Quochi, F., Marceddu, M., Loi, M. A., Huang, J., et al. (2013). Light-induced charged and trap states in colloidal nanocrystals detected by variable pulse rate photoluminescence spectroscopy. *ACS Nano* 7, 229–238. doi: 10.1021/nn305031k
- Stein, J. L., Mader, E. A., and Cossairt, B. M. (2016). Luminescent InP quantum dots with tunable emission by post-synthetic modification with lewis acids. *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1315–1320. doi: 10.1021/acs.jpcllett.6b00177
- Talpin, D. V., Mekis, I., Gotzinger, S., Kornowski, A., Benson, O., and Weller, H. (2004). CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* 108, 18826–18831. doi: 10.1021/jp046481g
- Tamang, S., Beaune, G., Texier, L., and Reiss, P. (2011). Aqueous phase transfer of InP/ZnS nanocrystals conserving fluorescence and high colloidal stability. *ACS Nano* 5, 9392–9402. doi: 10.1021/nn203598c
- Tamang, S., Lincheneau, C., Hermans, Y., Jeong, S., and Reiss, P. (2016). Chemistry of InP nanocrystal syntheses. *Chem. Mater.* 28, 2491–2506. doi: 10.1021/acs.chemmater.5b05044
- Tessier, M. D., Dupont, D., De Nolf, K., De Roo, J., and Hens, Z. (2015). Economic and size-tunable synthesis of InP/ZnE (E = S, Se) colloidal quantum dots. *Chem. Mater.* 27, 4893–4898. doi: 10.1021/acs.chemmater.5b02138
- Toufanian, R., Piryatinski, A., Mahler, A. H., Iyer, R., Hollingsworth, J. A., and Dennis, A. M. (2018). Bandgap engineering of indium phosphide-based core/shell heterostructures through shell composition and thickness. *Front. Chem.* 6:567. doi: 10.3389/fchem.2018.00567
- Ung, T. D. T., Pham, T. T., Nguyen, Q. L., Li, L., and Reiss, P. (2010a). Comparative photoluminescence study of close-packed and colloidal InP/ZnS quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* 96:073102. doi: 10.1063/1.3291049
- Ung, T. D. T., Reiss, P., and Nguyen, Q. L. (2010b). Luminescence properties of In(Zn)P alloy core/ZnS shell quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* 97:193104. doi: 10.1063/1.3515417
- Virieux, H., Le Troedec, M., Cros-Gagneux, A., Ojo, W.-S., Delpech, F., Nayral, C., et al. (2012). InP/ZnS nanocrystals: coupling NMR and XPS for fine surface and interface description. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19701–19708. doi: 10.1021/ja307124m
- Wagner, C. D. (1972). Auger lines in x-ray photoelectron spectrometry. *Anal. Chem.* 44, 967–973. doi: 10.1021/ac60314a015
- Wang, H. C., Zhang, H., Chen, H. Y., Yeh, H. C., Tseng, M. R., Chung, R. J., et al. (2017). Cadmium-free InP/ZnSeS/ZnS heterostructure-based quantum dot light-emitting diodes with a ZnMgO electron transport layer and a brightness of over 10 000 cd m<sup>-2</sup>. *Small* 13:1603962. doi: 10.1002/sml.201603962
- Wegner, K. D., Pouget, S., Ling, W. L., Carrière, M., and Reiss, P. (2019). Gallium – a versatile element for tuning the photoluminescence properties of InP quantum dots. *Chem. Commun.* 55, 1663–1666. doi: 10.1039/C8CC09740B
- Xu, S., Ziegler, J., and Nann, T. (2008). Rapid synthesis of highly luminescent InP and InP/ZnS nanocrystals. *J. Mater. Chem.* 18, 2653–2656. doi: 10.1039/b803263g
- Yan, L., Li, Z., Sun, M., Shen, G., and Li, L. (2016). Stable and flexible CuInS<sub>2</sub>/ZnS:Al-TiO<sub>2</sub> film for solar-light-driven photodegradation of soil fumigant. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 20048–20056. doi: 10.1021/acsami.6b05587
- Zvaigzne, M., Martynov, I., Samokhvalov, P., Mochalov, K., and Chistyakov, A. (2015). Influence of surface ligands on the luminescent properties of cadmium selenide quantum dots in a polymethylmethacrylate matrix. *Phys. Procedia* 73, 150–155. doi: 10.1016/j.phpro.2015.09.140

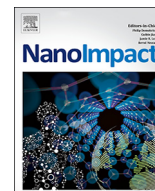
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Wegner, Dussert, Truffier-Boutry, Benayad, Beal, Mattera, Ling, Carrière and Reiss. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Annexe 2 : Article NanoImpact**







## Physicochemical alterations and toxicity of InP alloyed quantum dots aged in environmental conditions: A safer by design evaluation

Adeline Tarantini<sup>a,1</sup>, K. David Wegner<sup>b,1</sup>, Fanny Dussert<sup>a</sup>, Géraldine Sarret<sup>c</sup>, David Beal<sup>a</sup>, Lucia Mattera<sup>b</sup>, Christophe Lincheneau<sup>b</sup>, Olivier Proux<sup>d,e</sup>, Delphine Truffier-Boutry<sup>f</sup>, Christine Moriscot<sup>i</sup>, Benoit Gallet<sup>g</sup>, P.-H. Jouneau<sup>h</sup>, Peter Reiss<sup>b</sup>, Marie Carrière<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Grenoble Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-SyMMES, CIBEST, 38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Univ. Grenoble Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-SyMMES, STEP, 38000 Grenoble, France

<sup>c</sup> ISTerre (Institut des Sciences de la Terre), Univ. Grenoble Alpes, CNRS, IRD, IFFSTAR, Univ. Savoie Mont Blanc, 38000 Grenoble, France

<sup>d</sup> BM30B/FAME beamline, ESRF, 38043 Grenoble, France

<sup>e</sup> Observatoire des Sciences de l'Univers de Grenoble, 38000 Grenoble, France

<sup>f</sup> CEA-LITEN L2N, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

<sup>g</sup> CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France

<sup>h</sup> Univ. Grenoble Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC-MEM, LEMMA, 38000 Grenoble, France

<sup>i</sup> Integrated Structural Biology Grenoble (ISBG) CNRS, CEA, Univ. Grenoble-Alpes, EMBL, 71 rue des Martyrs, F-38042, Grenoble, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Quantum dot  
Semiconductor nanocrystal  
Toxicity  
Keratinocyte  
EXAFS

### ABSTRACT

Due to their unique optical properties, quantum dots (QDs) are used in a number of optoelectronic devices and are forecasted to be used in the near future for biomedical applications. The most popular QD composition consists of cadmium selenide (CdSe) or cadmium telluride (CdTe), which has been shown to pose health risks due to the release of toxic cadmium (Cd) ions. Due to similar optical properties but lower intrinsic toxicity, indium phosphide (InP) QDs have been proposed as a safer alternative. Nevertheless, investigations regarding their safety and possible toxicological effects are still in their infancy.

The fate and toxicity of seven different water-dispersible indium (In)-based QDs, either pristine or after ageing in a climatic chamber, was evaluated. The core of these QDs was composed of indium, zinc and phosphorus (InZnP) or indium, zinc, phosphorus and sulfur (InZnPS). They were assessed either as core-only or as core-shell QDs, for which the core was capped with a shell of zinc, selenium and sulfur (Zn(Se,S)). Their surface was functionalized using either penicillamine or glutathione.

In their pristine form, these QDs showed essentially no cytotoxicity. The particular case of InZnPS QD showed that core-shell QDs were less cytotoxic than core-only QDs. Moreover, surface functionalization with either penicillamine or glutathione did not appreciably influence cytotoxicity but affected QD stability. These QDs did not lead to over-accumulation of reactive oxygen species in exposed cells, or to any oxidative damage to cellular DNA. However, accelerated weathering in a climatic chamber led to QD precipitation and degradation, together with significant cytotoxic effects. Ageing led to dissociation of In–P and Zn–S bonds, and to complexation of In and Zn ions with carboxylate and/or phosphate moieties.

These results show that InZnP and InZnPS alloyed QDs are safer alternatives to CdSe QDs. They underline the

**Abbreviations:** BrdU, bromodeoxyuridine; DDT, 1-dodecanethiol; EDS, energy dispersive X-ray spectroscopy probe; ESRF, European Synchrotron Radiation Facility; GSH, Glutathione; H2-DCF-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DHR123, dihydrorhodamine 123; HAADF, high angle annular dark field; IARC, International agency for research in cancer; LCF, linear combination fit; LDH, lactate dehydrogenase; MMS, methane methyl sulfonate; MPA, mercaptopropionic acid; NC, Semiconductor nanocrystal; ODE, 1-octadecene; PL, photoluminescence; QD, Quantum dot; QY, Quantum yield; ROS, Reactive oxygen species; SEM, scanning electron microscope; STEM, scanning-transmission electron microscopy; TCEP, tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; TMAOH, tetramethylammonium hydroxide; (TMS)<sub>3</sub>P, tris(trimethylsilyl)phosphine; TOP, trioctylphosphine; XAS, X-ray absorption spectroscopy

\* Corresponding author at: INAC-SyMMES/CIBEST, 17 rue des Martyrs, 38000 Grenoble, France.

**E-mail addresses:** [adeline.tarantini@cea.fr](mailto:adeline.tarantini@cea.fr) (A. Tarantini), [Karl-david.wegner@cea.fr](mailto:Karl-david.wegner@cea.fr) (K.D. Wegner), [fanny.dussert@cea.fr](mailto:fanny.dussert@cea.fr) (F. Dussert), [geraldine.sarret@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:geraldine.sarret@univ-grenoble-alpes.fr) (G. Sarret), [david.beal@cea.fr](mailto:david.beal@cea.fr) (D. Beal), [lucia.mattera@cea.fr](mailto:lucia.mattera@cea.fr) (L. Mattera), [christophe.lincheneau@cea.fr](mailto:christophe.lincheneau@cea.fr) (C. Lincheneau), [proux@esrf.fr](mailto:proux@esrf.fr) (O. Proux), [delphine.boutry@cea.fr](mailto:delphine.boutry@cea.fr) (D. Truffier-Boutry), [christine.moriscot@ibs.fr](mailto:christine.moriscot@ibs.fr) (C. Moriscot), [benoit.gallet@ibs.fr](mailto:benoit.gallet@ibs.fr) (B. Gallet), [pierre-henri.jouneau@cea.fr](mailto:pierre-henri.jouneau@cea.fr) (P.-H. Jouneau), [peter.reiss@cea.fr](mailto:peter.reiss@cea.fr) (P. Reiss), [marie.carriere@cea.fr](mailto:marie.carriere@cea.fr) (M. Carrière).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100168>

Received 19 December 2018; Received in revised form 10 May 2019; Accepted 10 May 2019

Available online 12 May 2019

2452-0748/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

necessity to preserve as much as possible the structural integrity of QDs, for instance by developing more robust shells, in order to ensure their safety for future applications.

## 1. Introduction

Colloidal semiconductor nanocrystals, also termed quantum dots (QDs), possess unique optical properties including size-tunable absorbance and emission, narrow emission bands, high photoluminescence quantum yield (QY) and resistance to photobleaching (Alivisatos, 1996). This makes them attractive for a wide range of applications, such as biosensing and imaging (Wegner and Hildebrandt, 2015), in photovoltaics and light-emitting devices including light-emitting diodes, TVs and displays (Reiss et al., 2016). The most popular QD composition consist of II-VI QDs such as cadmium selenide (CdSe) and cadmium telluride (CdTe), which display the highest quantum yields and can be synthesized with a high degree of monodispersity (Wegner and Hildebrandt, 2015). However, these heavy metal containing QDs have been shown to be toxic in human and environmental models (Bottrill and Green, 2011; Rocha et al., 2017). The main reasons explaining their toxicity is the leakage of Cd ions during QD degradation, which results in the generation of reactive oxygen species (ROS) (Kauffer et al., 2014). QD degradation is triggered via surface oxidation by molecular oxygen from air and under UV irradiation, or in intracellular acidic compartments such as lysosomes (Corazzari et al., 2013; Derfus et al., 2004; Kirchner et al., 2005). Capping CdSe or CdTe cores with a shell of zinc sulfide (ZnS) not only improves their photophysical properties but also reduces their degradation and thus their toxicity (Bottrill and Green, 2011). However, cadmium (Cd) compounds are classified as carcinogenic to humans (Group 1) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 1993), and their use in electrical and electronic equipment has been restricted in the European Union through the Restriction of Hazardous Substances (RoHS) directive (Directive 2011/65/EU of the European Parliament).

Recently, the concept of safer-by-design has been applied to nanoscience and nanotechnology with first reports published in the literature a little more than ten years ago (Schwarz-Plaschg et al., 2017). The core of this concept is the integration of safety considerations in the design of nanomaterials or nano-enabled products, to make sure that these products will have a low risk potential from their production until their end-of-life (Bastus and Puentes, 2018; Kraegeloh et al., 2018; Lin et al., 2018). In this context, a safer-by-design concept for QDs would include: i) replacement of potentially toxic elements like Cd by less toxic chemical elements, ii) enhancement of the structural stability limiting the release of chemical elements, and iii) prevention of toxic intermediates such as ROS during utilization.

In the literature, several alternative QD compositions have been proposed, which can be used to follow the safer-by-design concept of Cd-free QDs. Among them, the most promising candidates are III/IV and I/III/VI QDs based on indium (In), including indium phosphide (InP) and copper-indium-sulfur ( $\text{CuInS}_2$ ) QDs (Reiss et al., 2016). Thereby, InP QDs are the first nanocrystals that made the transition from laboratory bench into a commercial application, namely in the generation of TV screens (Reiss et al., 2016). Their potential was further shown for medical applications, owing to their ability to quickly, efficiently and specifically target sentinel lymph nodes when subcutaneously injected in mice or rats, without causing overt toxicity (Helle et al., 2012; Lin et al., 2015; Pons et al., 2010; Yaghini et al., 2018; Yaghini et al., 2016). InP is classified as probably carcinogenic to humans by the IARC (IARC, 2006), and InP QDs have been shown to be toxic in some in vitro studies (Chibli et al., 2011; Soenen et al., 2014). Their toxicity was shown to be dependent on the cell line (Chibli et al., 2011), and to be correlated with ROS accumulation in exposed cells (Chibli et al., 2011; Soenen et al., 2014). Nevertheless, InP QDs are less

toxic than CdSe QDs due to the lower toxicity of In ions released from QDs, compared to Cd ions (Brunetti et al., 2013). An advantage of InP QDs in comparison to Cd-based QDs is the covalent nature of the bond between In and phosphorous (P), which makes them more stable in comparison to the ionic bond of CdSe (Bharali et al., 2005). The passivation of the InP QDs with a semiconductor shell, such as ZnS or zinc selenide (ZnSe), improves their photoluminescence and their long-term stability as the core will be protected from oxidative degradation (Reiss et al., 2016). An important characteristic for a core/shell material is their lattice mismatch. The lattice mismatch for InP/ZnS is around 7%, but is only 3.3% for InP/ZnSe (Reiss et al., 2016). A gradient shell of a ZnSe rich layer close to the InP core, combined with a ZnS layer on the outside, have shown to result in improved photophysical properties and photostability (Lim et al., 2011). These more stable QDs would eventually be less toxic than InP/ZnS QDs. Finally, the quantum yield of InP QDs can be improved by alloying their core with zinc (Zn) and/or sulfur (S), leading to highly fluorescent indium-zinc-phosphorus (InZnP) or indium-zinc-phosphorus-sulfur InZnPS QDs (Huang et al., 2010; Ung et al., 2010). These QDs would have improved optical properties compared to InP/ZnS QDs, and consequently smaller quantities would be necessary to achieve the same brightness. Physical, chemical and toxicological properties of these emerging QDs have been well characterized in their pristine state. However, these QDs are intended to be integrated into electronic devices (Reiss et al., 2016), therefore they will be exposed to daylight under normal conditions of use and potentially at the end of their lifecycle if they are not properly recycled. Therefore, to take into account the whole life cycle of these products, their physicochemical transformation and toxicity should be also assessed after exposing them to UV light, in environmental conditions.

In accordance with these safer-by-design principles, we synthesized some In-based QDs with modified chemistry in order to minimize their hazard. QDs with a core composed of InZnP or InZnPS were prepared and further studied as core-only QDs or as core-shell QDs where the cores were capped with a gradient shell composed of zinc, sulfur and selenium (Zn(Se,S)). The intrinsic hydrophobic QDs were rendered water-soluble using a ligand exchange reaction with either D-penicillamine (Pen) or L-glutathione (GSH). Pen was chosen because the obtained QDs are very compact, which is beneficial in biosensing applications (Mattera et al., 2016), while GSH was chosen because it is a well-documented antioxidant (for review, see (Calabrese et al., 2017)), which would reduce the oxidative stress induced by the QDs, as reported by others (Chibli et al., 2011; Soenen et al., 2014). The toxicity of these In-based QDs was evaluated on primary keratinocytes isolated from skin explants from human donors, and compared to the toxicity of Cd-based QDs. These QDs were then weathered in environmental conditions, consisting of exposure to whole spectrum sunlight for 64 h, as suggested in the ISO norms 4892-1 (2000) and 4892-2 (2013) dedicated to accelerated weathering of plastic. This norm was chosen since QDs are aimed at being embedded in plastic matrixes before being incorporated in optoelectronic devices (Litvin et al., 2017). Toxicity of aged vs. pristine QDs was compared. Finally, the their transformation products of these QDs upon ageing were identified using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

D-Penicillamine (Pen), L-glutathione reduced (GSH) > 98.0%, tetramethylammonium hydroxide (TMAOH), phosphate-buffered saline

solution (1xPBS), tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride solution 0.5 M (TCEP), indium acetate (99.99%), myristic acid (> 99%), tris(trimethylsilyl)phosphine (95%, (TMS)<sub>3</sub>P), 1-octadecene (90%, ODE), 1-dodecanethiol (97%, DDT), trioctylphosphine (97%, TOP), sulfur (99.99%), selenium (99.99%), methanol, chloroform and hexane were purchased from Sigma-Aldrich. Zinc stearate (90%, ZnSt<sub>2</sub>) was acquired from Riedel de Haen and oleic acid (70%) came from Fisher Chemicals. All chemicals were used as received without any further purification, unless stated otherwise. Cell culture medium and serum were purchased from Thermo Fisher Scientific. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were > 99% pure. CdSe/ZnS QDs were purchased from Thermofisher Scientific (Qdot ITK carboxyl quantum dots).

## 2.2. QD synthesis and characterization

For preparation of indium-myristate, indium acetate (6.9 mmol), myristic acid (21.4 mmol) and ODE (15 mL) were mixed in a 50 mL three neck flask. The solution was stirred and degassed under vacuum for 3 h at 120 °C. After cooling to room temperature, the precipitated indium-myristate was washed with ca. 150 mL dry hexane before drying under vacuum and storing in the glove box. For preparation of zinc oleate (0.4 M), zinc acetate (5 mmol), 10 mmol oleic acid and 9.35 mL ODE were mixed in a 50 mL three neck flask. The mixture was heated under vacuum to 120 °C and stirred for 1 h to remove water and oxygen. Then the flask was backfilled with argon (Ar) and the solution was cooled down to room temperature. At around 70 °C, the solution was transferred to vial and flushed with Ar before storing it in a glove box. For a 0.4 M TOP-selenium (TOP-Se) stock solution, 2 mmol of selenium powder was dissolved in 5 mL trioctylphosphine (TOP) for 24 h. The preparation of a 0.4 M TOP-sulfur (TOP-S) stock solution was done similarly using elemental sulfur.

Then, InZnP and InZnPS QD cores were prepared as follows. For InZnP QDs, indium-myristate (0.1 mmol), ZnSt<sub>2</sub> (0.1 mmol) and 7.5 mL ODE were mixed in a 50 mL three-neck flask and degassed for 1 h. The flask was backfilled with Ar and the reaction mixture was rapidly heated to 300 °C in a molten salt bath. At ca. 100 °C 0.1 mmol (TMS)<sub>3</sub>P dissolved in 1 mL ODE was swiftly injected. After 20 min, the reaction was quenched by removing the salt bath and let cool down to room temperature. The QDs were purified by precipitating (1:1 v/v mixture of methanol/chloroform and acetone) and re-dispersing (chloroform) three times, and finally stored in hexane. The InZnPS core was prepared similarly including the addition of 0.1 mmol DDT in the initial reaction mixture.

Gradient shells were then grown on the surface of InZnP and InZnPS QD cores. After the synthesis of the cores, the solution was cooled down to 220 °C to stop the growth. 2.5 mL of the 0.4 M zinc-oleate (1 mmol) stock solution was added dropwise followed by the swift injection of 0.444 mL of TOP-Se (0.2 mmol) stock solution dissolved in 0.5 mL ODE and 1.57 mL of TOP-S (0.7 mmol) stock solution. The reaction mixture was heated to 300 °C using a heating mantle with a temperature rate of 10 °C per minute. The overall shell growth time was 20 min. The reaction was stopped by cooling down to room temperature. The same purification cycle was performed as described for the core synthesis.

## 2.3. Phase transfer

Both InP and CdSe (Qdot ITK carboxyl, Thermofisher) QDs were then transferred in aqueous solution, via phase transfer using either Pen or GSH. A 0.2 M solution of Pen was prepared by dissolving 30 mg of Pen in 1 mL of degassed MilliQ water. After addition of 200 µL of TCEP, the pH was adjusted to 9 with TMAOH (25 wt% in methanol) solution. The solution was degassed again, and 500 µL added to 1 mL of degassed colloidal solution of InP core or InP core/shell in chloroform with an approximate concentration of 3–5 µM. The biphasic mixture was stirred vigorously for 45 min at room temperature. The mixture was quickly

centrifuged to obtain a clear phase separation. The upper layer containing the QDs in the aqueous phase was separated from the organic phase and purified from excess ligands using a NAP™10 size exclusion column (Sephadex™ G-25 DNA Grade from GE Healthcare). The column was equilibrated with PBS buffer, which was further used as eluent and storage buffer. The transferred QD samples were stored at 4 °C. For the phase transfer using GSH, 0.26 mM GSH was dissolved in 300 µL TMAOH and added to a 1 µM QD solution in chloroform. The solution was stirred overnight at room temperature. The phase-transferred QDs were extracted from the organic solution using 200 µL PBS buffer with 250 mM NaCl. After centrifugation at 4300 × g for 1 min, the organic layer was separated from the aqueous phase. In order to purify the QDs from the excess of ligands, they were precipitated with 300 mL ethanol and centrifugation for 1 min at 4300 × g. The clear supernatant was discarded and the QDs redispersed with 200 µL 1 × PBS buffer with 250 mM NaCl. This cycle was repeated three times before the final precipitate was redispersed in 1 × PBS. The QDs were stored at 4 °C in the dark; they were stable for at least one year.

## 2.4. Photophysical and structural characterization of InP QDs

Absorbance measurements were performed using Hewlett Packard 8452A spectrophotometer whereas the emission spectra were recorded using a Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon equipped with a 150 W xenon lamp for steady-state measurements and a NanoLED laser diode from Horiba with a wavelength of 350 nm and 1 MHz repetition for time-resolved measurements. Decay curves were fitted using Decay Analysis software from Horiba Scientist. Photoluminescence quantum yield measurements were performed at room temperature using an integration sphere, Hamamatsu Quantaaurus Absolute PL quantum yield spectrometer or by relative fluorescence measurements using Fluorescein 27 in 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) (QY = 93%) as standard. The hydrodynamic diameter of the water-dispersible InZnP and InZnPS QDs was measured by dynamic light scattering (Malvern Zeta Sizer NanoZS).

## 2.5. Electron microscopy

For pristine QD structural characterization, the elemental composition was analyzed using a Zeiss Ultra 55+ scanning electron microscope (SEM) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscopy probe (EDS). Samples for EDS were prepared by drop-casting a concentrated dispersion of QDs on a cleaned silicon substrate.

For imaging and EDS analysis of QDs and aged QDs, a drop of QD suspension was deposited on copper grids coated with lacey carbon films, allowed to dry at room temperature, then by scanning-transmission electron microscopy (STEM) using a high angle annular dark field (HAADF) detector, on a FEI/Tecnaï OSIRIS microscope operating at 200 kV. The chemical composition of regions of interest was then analyzed by EDS using the same microscope and configuration. For imaging of cells via transmission electron microscopy (TEM), after exposure to QDs, cells were rinsed with 0.1 M PHEM buffer (30 mM PIPES, 12.5 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 7), then fixed for 30 min at room temperature in 4% paraformaldehyde, 0.4% glutaraldehyde prepared in 0.2 M PHEM to which was added culture medium (V:V). They were then fixed for another 30 min at room temperature in 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M PHEM. Cells were rinsed three times in 0.1 M PHEM and post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>), 1.5% potassium ferrocyanide in 0.1 M PHEM buffer for 1 h at room temperature. After 3 washes in water, they were post-stained using 0.5% uranyl acetate in 30% ethanol for 30 min at room temperature, in the dark. Cells were then dehydrated in graded ethanol series, and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were cut on a Leica UC7 ultra-microtome and collected on Formvar carbon coated copper grids. Images were recorded on a Tecnaï G2 Spirit BioTwin (FEI) transmission electron microscope (TEM), operating at 120 kV, using an

ORIU SC1000 CCD camera (Gatan). For EDS analysis, samples were carbon-coated, then imaged by STEM (HAADF) detector, on a FEI/Tecna OSIRIS microscope operating at 200 kV. The chemical composition of regions of interest was then analyzed by EDS using the same microscope and configuration.

## 2.6. Weathering in the QSUN climatic chamber

Samples were exposed to UV lamps in a Q-SUN Xe-1 xenon arc test chamber (Q-LAB), providing full sunlight spectrum. Weathering conditions were adapted from the ISO norms 4892-1 (2000) and 4892-2 (2013), developed for studying the ageing of plastics. The irradiance and temperature were fixed at  $1.44 \text{ W/m}^2$  (measured at 420 nm) and  $40^\circ\text{C}$ , respectively, with no humidity control. QD suspensions were diluted in PBS at the final concentration of  $1 \mu\text{M}$  (in 1 mL), deposited in rectangular standard quartz cuvettes ( $48 \text{ mm} \times 12.5 \text{ mm} \times 12.5 \text{ mm}$ , pathlength 10 mm) closed with polytetrafluoroethylene (PTFE) stopper, then irradiated for 64 h under agitation.

## 2.7. Cell culture and exposure

Human skin samples were obtained following breast surgery from healthy female donors with their informed consent (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. In particular, work was performed in agreement with article L1245-2 of the French Public Health Code on the use of surgical wastes for research purposes (<https://www.legifrance.gouv.fr>). All donors were Caucasian (20–40 years old), and their skin phototype was between I and II according to the Fitzpatrick classification scale (Fitzpatrick, 1988). Keratinocytes were isolated from these whole skin samples, as previously described (Mouret et al., 2006). They were grown in keratinocyte serum-free medium (KSF-M) supplemented with  $1.5 \text{ ng/mL}$  epidermal growth factor (EGF),  $25 \mu\text{g/mL}$  bovine pituitary extract,  $75 \mu\text{g/mL}$  primocin and then cultured at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . For all experiments, cells were used at passages 1–3.

Cells were seeded in 96-well plates (cytotoxicity, proliferation and oxidative stress assays, 5000 cells per well), 24-well plates (comet assay, 62,500 cells per well), 4 chamber Labteks (electron microscopy, 35,000 cells per well) or  $75 \text{ cm}^2$  flasks (X-ray absorption spectroscopy, 1.5 million cells per flask). When they reached 60% of confluence, they were exposed for 24 h to 6.25–200 nM (cytotoxicity and cell proliferation), 12.5–100 nM (oxidative stress) or 50 nM (comet assay, X-ray absorption spectroscopy, electron microscopy) of either pristine or aged QDs.

## 2.8. X-ray absorption spectroscopy

Pristine and aged QDs ( $1 \mu\text{M}$  and approximately  $10 \mu\text{M}$ , respectively), as well as keratinocytes exposed to 50 nM of pristine or aged QDs were analyzed by X-ray absorption spectroscopy (XAS). A drop of pristine or aged QDs was directly deposited on the sample holder. Regarding cell samples, they were rinsed twice with PBS, then harvested using trypsin, centrifuged and suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5, to which 10% of glycerol was added. This cell suspension was deposited on the dedicated sample holder. Both types of samples were immediately frozen by immersion in liquid nitrogen. Indium speciation was analyzed by In K-edge (27.94 keV) extended X-Ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy on FAME (BM30B) beamline (Proux et al., 2005) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France), operating in multi-bunch mode (150 to 200 mA). Spectra were recorded at 15–20 K using a liquid He cryostat. The beamline is equipped with a Si(220) monochromator (Proux et al., 2006). Spectra were recorded in fluorescence mode using a 30-element Ge detector. Three to seven spectra of 40 min each were averaged, depending on the signal. Data were normalized and treated

using the Demeter software package (Ravel and Newville, 2005). Spectra for the pristine QDs were treated by shell fitting using ARTEMIS software (Ravel and Newville, 2005). In-O, In-P and In-S paths were calculated using FEFF code, based on the structure of In phosphate dehydrate (Sugiyama et al., 1999), InP and InS (Wyckoff, 1963), respectively. Spectra for the aged QDs and cells exposed to pristine and aged QDs were treated by linear combination fitting (LCF) using Demeter/ATHENA (Ravel and Newville, 2005) using the pristine QDs, In acetate and In phosphate as reference spectra.

In addition, aged QDs were studied by Zn K-edge EXAFS spectroscopy on the same beamline and in the same conditions and setup. EXAFS spectra were treated by LCFs using ZnS (bulk and nano), provided by M. Le Bars (Le Bars et al., 2018), several Zn phosphate minerals including hopeite ( $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Zn phosphate dihydrate ( $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and Zn-reacted hydroxylapatite containing  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  Zn prepared at pH 6, described in Panfili et al. (2005), Zn-GSH (10 mM Zn, 100 mM GSH, pH 4.5), and Zn complexed to malate in solution as proxy for Zn-carboxylate (Zn-COOH) complexes. All the standard spectra were recorded at 15 K except Zn phosphate dihydrate and Zn-reacted hydroxylapatite which were recorded at room temperature. The temperature has a great influence on the amplitude of ZnS spectrum (Gilbert et al., 2004), much less on more disordered phases like Zn phosphate, as shown for hopeite in Fig. S1. For the two spectra recorded at room temperature, an amplitude factor of 1.15 was used to correct for the temperature effect, based on hopeite data (Fig. S1).

## 2.9. Toxicity assessment

Cytotoxicity and cell proliferation were assessed on the same 96-well plate seeded with keratinocytes, exposed to QDs for 24 h. Exposure medium was sampled for lactate dehydrogenase (LDH) quantification, and bromodeoxyuridine (BrdU) assay was performed on cells. In these assays, triton X100 (1%) was used as positive control. Released LDH was quantified using LDH assay (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of each exposure medium was deposited on a clean 96-well plate, then 100  $\mu\text{L}$  of LDH assay solution (LDH assay substrate/cofactor/dye, V:V:V) was added to each well, and incubated for 30 min at room temperature, in the dark. Assay reaction was stopped by adding 10  $\mu\text{L}$  of hydrochloric acid (HCl) 1 N to each well, then absorbance at 490 nm was measured using a Spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device) and corrected by subtraction of absorbance at 690 nm. Cell proliferation was quantified using 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) assay (Roche), using manufacturer's instructions. After exposure to QDs and removal of exposure medium, 100  $\mu\text{L}$  of the BrdU solution, diluted to the tenth in cell culture medium, was added in each well and incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . This labeling medium was then removed, and cells were rinsed and incubated with Fix/denat solution for 30 min, then with an anti-BrdU-peroxidase antibody diluted to the hundredth in antibody dilution solution. After incubation for 45 min at room temperature, cells were rinsed three times with PBS, 100  $\mu\text{L}$  of substrate solution was added to each well and incubated for 30 min at room temperature, in the dark. Absorbance at 370 nm was then measured using a Spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device) and corrected by subtraction of absorbance at 492 nm. The whole experiment was repeated three to five times independently, on keratinocytes from different donors, with  $n = 3$  in each independent experiment. Independently of these two experiments, cytotoxicity was evaluated by measuring cell metabolic activity, using WST-1 assay (Roche). Cells were exposed for 24 h to 100  $\mu\text{L}$  of QDs, then QDs were removed and 100  $\mu\text{L}$  of WST-1 as added to each well. After 45 min of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , absorbance at 450 nm was measured using a Spectramax M2 spectrofluorimeter (Molecular Device) and corrected by subtraction of absorbance at 650 nm.

Reactive oxygen species were quantified using H2-DCF-DA and dihydrorhodamine 123 (DHR123) reagents (Thermo-Fisher Scientific).

Cell culture medium was removed and 100  $\mu$ L of a 25  $\mu$ M H2-DCF-DA or of a 1  $\mu$ M DHR123 solution was added to each well. After 40 min of incubation at 37  $^{\circ}$ C in the CO<sub>2</sub> incubator, the H2-DCF-DA (or DHR123) solution was replaced by QD suspensions. Fluorescence ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  480/530 nm) was recorded immediately after exposing cells to QDs, then after 2 h, 4 h and 24 h of exposure. *Tert*-butyl-hydroperoxide (100  $\mu$ M) was used as positive control for H2-DCF-DA assay, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M) or KBrO<sub>3</sub> (1 mM) were used as positive control for DHR123 assay. The whole H2-DCF-DA experiment was repeated twice independently, on keratinocytes from different donors, with  $n = 3$  in each independent experiment. For DHR123, the experiment was repeated twice on keratinocytes from the same donor, with  $n = 3$ .

Oxidative damage to DNA was assessed using comet and comet-Fpg assays, which probe strand breaks and alkali-labile sites, and Fpg-sensitive sites including oxidized purines such as 8-oxo-dGuo, respectively, as previously described (Armand et al., 2016). As positive control for alkaline comet assay, cells were exposed to 100  $\mu$ M of methane methyl sulfonate (MMS) for 24 h. As positive control for Fpg-modified comet assays cells were exposed to 1  $\mu$ M of riboflavin for 20 min, followed by irradiation with UVA (10 J/cm<sup>2</sup>). Comets were scored using image analysis Comet IV software (Perceptive Instruments, Suffolk, UK), and median % DNA in tail was calculated for at least 50 comets per slide. Net Fpg sensitive sites (Net Fpg) were calculated as the difference in % DNA in tail between samples with Fpg incubation and samples with buffer incubation ((% DNA in tail from alkaline assay) – (% DNA in tail from Fpg-modified assay)). The whole experiment was repeated three to five times independently, on keratinocytes from different donors

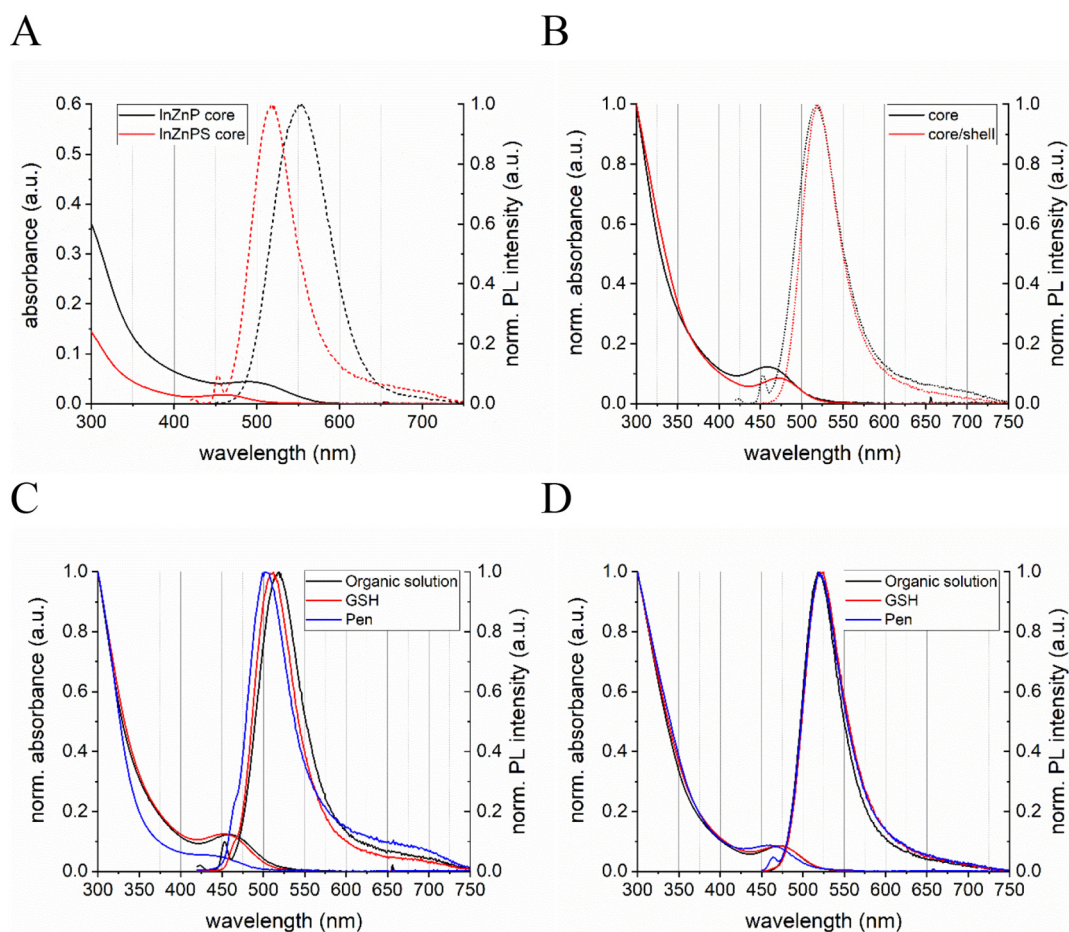
( $n = 3-5$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Synthesis and characterization of the Cd-free quantum dots

In the present study, the long-term stability and toxicity of two types of alloyed InP-based QDs were investigated. Thereby, InP QDs with a core composition of InZnP and InZnPS, passivated by the popular gradient shell composed of Zn(Se,S), was the center of the investigation (Lim et al., 2011). Similarly to CdSe and CdTe QDs (Bottrill and Green, 2011), capping InP cores with a shell of zinc sulfide (ZnS) improves their photophysical properties and reduces their degradation (Lim et al., 2011). Using similar one-pot synthesis method, it was previously shown that addition of sulfur during the core reaction results in InP QDs coated with a thin layer of ZnS. The presence of this layer of ZnS further enhances the photophysical properties and potentially facilitates the phase transfer (Li and Reiss, 2008). But the consequences of this thin ZnS layer on the growth of the gradient shell and for the structural and photophysical properties -and eventually for the cytotoxic potential- of the QDs is currently unknown. Therefore, core only and core/shell systems were prepared and studied.

The photophysical characterization of the two types of InP QD cores (InZnP and InZnPS) are shown in Fig. 1A. The presence of the sulfur precursor during the core synthesis is leading to blue shift of the absorbance and photoluminescence (PL) maximum as well as a linewidth narrowing from 79 nm to 61 nm for the PL of the InZnP and InZnPS



**Fig. 1.** Photophysical properties of InZnP and InZnPS QDs. Absorbance and normalized PL spectra of InZnP and InZnPS core QDs (A). Comparison of the normalized absorbance and PL spectra of InZnP core and InZnPS QDs with a gradient shell of Zn(Se,S) (B). Comparison of the normalized absorbance and PL spectra of the InZnPS core (C) and InZnPS core/shell QDs (D) before the aqueous phase transfer (organic solution, black) and after using the ligands L-glutathione (GSH, red) and D-Penicillamine (Pen, blue).

core, respectively (Table S1). However, the InZnP core shows, with 15%, a nearly twice as high QY in comparison to the core prepared in presence of the sulfur precursor. After the epitaxial growth of the gradient Zn(Se,S) shell on the InZnP core, the absorbance of the 1st excitonic peak shows a redshift of 12 nm whereas the PL maximum did not change (see Fig. 1B and Table S2). The shell growth has a stronger influence on the photophysical properties for the InZnP core as the 1st excitonic peak shows a redshift of 40 nm and the PL maximum is shifted by 17 nm (Fig. S2 and Table S3). These photophysical differences between both cores indicates that the Zn(Se,S) shell thickness is lower in the case of InZnP (Tamang et al., 2016).

To use either the core or the core/shell QDs for the envisaged toxicological evaluations, they needed to be made water-dispersible. Strong differences between those two core materials could be observed during the phase transfer from the organic solution to aqueous solution using either D-penicillamine (Pen) or L-glutathione (GSH) as hydrophilic surface ligands. Whereas the InZnP core material can be transferred using both ligands, InZnP core could not be transferred using Pen, because the core disintegrated during the process. As shown in Fig. 1C, the phase transfer led to a slight blue shift of the InZnP core for the absorbance and PL maxima, which could in principle indicate a slight size reduction due to the removal of surface atoms. Interestingly, using GSH for the phase transfer of InZnP cores led to a PL redshift of around 42 nm with no change in the 1st excitonic maxima (Fig. S3 and Table S4). Spectral shifts are also observed for the core/shell systems as a function of their composition and phase transfer ligand used (see below). We attribute these shifts to contributions from the quantum confined Stark effect and solvatochromatic effects experienced by the QDs when changing their dielectric surrounding composed of the surface ligands and the solvent (Thuy et al., 2007). For both core materials,

the PL QY dropped dramatically below 1% after the transfer. After the shell growth both core types could be transferred to aqueous solution either using Pen or GSH. The InZnP core with the gradient Zn(Se,S) shell showed only small changes in the absorbance and PL maxima when transferred using GSH or Pen (Fig. 1D and Table S5) whereas the InZnP-based core/shell QDs exhibited a 22 nm blue shift of the excitonic peak when using Pen, a 6 nm shift with GSH (see Fig. S4 and Table S6).

The samples were further analyzed regarding their structural properties. After the phase transfer using different surface ligands, we investigated the influence on their hydrodynamic radius. As shown in Fig. S5 and in Table S7 and S8, a marked size difference of around 2 nm is observed between the alloyed InZnP core and core/shell QDs corresponding to a gradient shell thickness of approximately 3 monolayers. The size difference between the core and core/shell QDs is smaller in the case of InZnP (around 0.7 nm), in accordance with a shell thickness of one monolayer.

### 3.2. Toxicity of alloyed InP QDs

Due to their photophysical properties, InP QDs would possibly interfere with classically-used toxicity assays. Therefore, optical interference was assessed by measuring absorbance emission at the wavelengths that are typically used in toxicity assays (Fig. S6). The lowest interference was found at the wavelength used in LDH assay. Chemical interference of QDs with the chemical reactions taking place in LDH assay was then assessed; it was shown to be minor (Table S9). Therefore, LDH assay was chosen for cytotoxicity assessment. Following our initial hypotheses, we compared the toxicity of core-only vs. core-shell QDs, with a core composed of InZnP vs. a core composed of

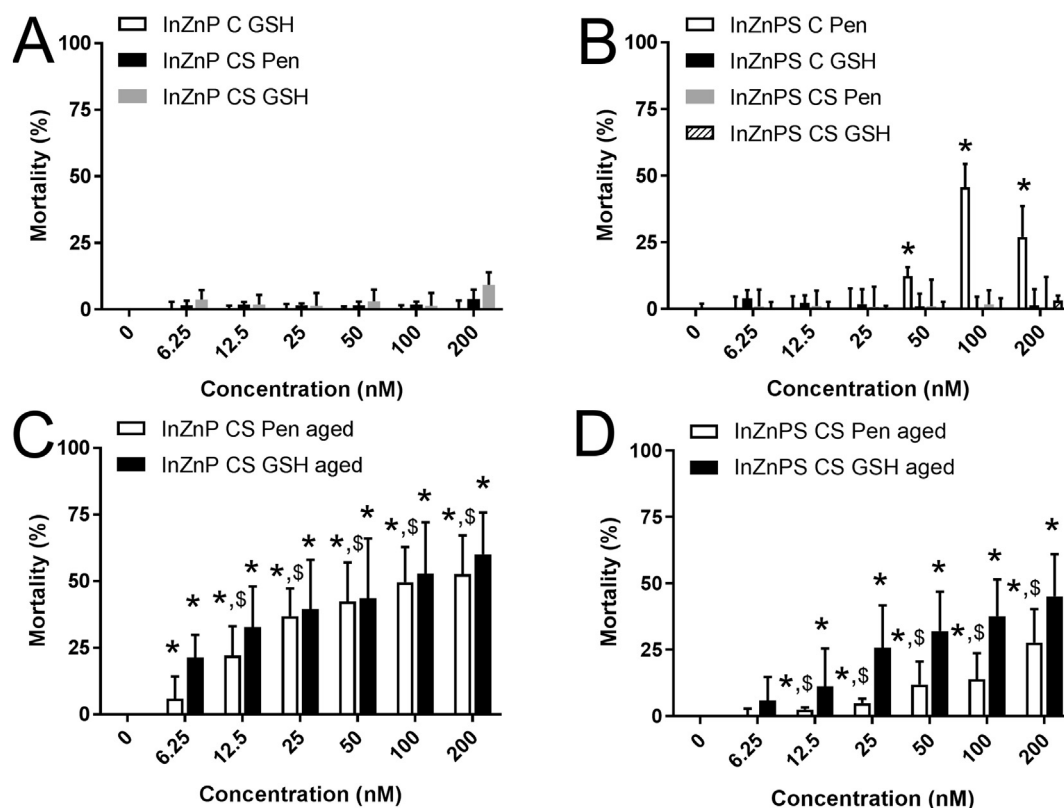


Fig. 2. Cytotoxicity of InZnP and InZnP S QDs, assessed via the lactate dehydrogenase assay. Cells were exposed to pristine QDs (A-B) or QDs exposed to simulated sunlight (aged, C-D), with a core of InZnP (A, C) or InZnP S (B, D). C: core only, CS: core-shell structure; Pen, GSH: penicillamine or glutathione, respectively, was used as surface ligand. Triton X-100 (1%) was used as positive control. Results are expressed as % relative to the control (unexposed cells). Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 3 to 6 independent experiments, performed on keratinocytes from different donors, with 3 replicates per experiment, statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control, \$: InZnP vs. InZnP S.

InZnP, and coated with Pen vs. coated with GSH (Fig. 2A-B). Among the core-only QDs, since InZnP QD could not be transferred to aqueous phase in Pen, we compared the toxicity of InZnP with GSH as surface ligand to that of InZnP with either GSH or Pen as surface ligand. Only the core-only QD with a core composed of InZnP and with Pen as surface ligand significantly altered cell viability. None of the other core-only QDs, and none of the tested core-shell QDs showed significant cytotoxicity in their pristine state. WST-1 assay, which measures cell metabolic activity and is also classically used to assess cytotoxicity confirmed these results (Fig. 3). For comparison, exposure to 100 nM or 200 nM of pristine CdSe/ZnS QDs caused the mortality of 27% and 41% of the cells, respectively (Fig. S7).

Then, toxicity of these QDs was assessed after ageing for 64 h in a climatic chamber. After exposure to simulated sunlight, all core-shell QDs showed significant cytotoxicity (Fig. 2C-D). Comparing the core-shell QDs with respect to their core composition, cells exposed to aged InZnP-based QDs showed a lower mortality rate than cells exposed to QDs with InZnP core. No significant differences was observed between QDs coated with either Pen or GSH (Fig. 2C-D). The toxicity of aged CdSe QDs was similar, with 36 to 66% of mortality in cells exposed to 12.5 to 200 nM of aged CdSe QDs (Fig. S7).

Although they did not induce any cytotoxicity, all pristine QDs significantly decreased cell proliferation, with no significant difference between pristine QDs with a core of InZnP or InZnP, or with Pen or GSH as surface ligand (Fig. 4A-B). Decreased cell proliferation results from cell cycle arrest. Since one of the causes of cell cycle arrest is DNA alteration, the impact of pristine QDs on DNA integrity was evaluated. The occurrence of DNA strand breaks, alkali-labile sites and Fpg-sensitive sites such as 8-oxo-dGuo was explored using the Comet assay, in its alkaline and Fpg-modified versions. The investigation using core-only and core-shell InZnP QDs coated with Pen revealed no DNA strand-breaks and/or alkali-labile sites (Fig. 4C). Neither did they increase the level of oxidized purines (Fig. 4D) and the intracellular level of reactive oxygen species, as assessed via 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2-DCF-DA) (Fig. 4E-F for times 0 to 24 h and Fig. S8 for times 0 to 4 h of exposure) and via dihydrorhodamine 123 (DHR123) (Fig. S9) assays. Interference of QDs with these two assays was assessed, it was significant for some QDs in DHR123 assay, but only minor interference was found with H2-DCF-DA (Table S10).

### 3.3. Physicochemical transformation of In-based QDs after accelerated weathering in a climatic chamber

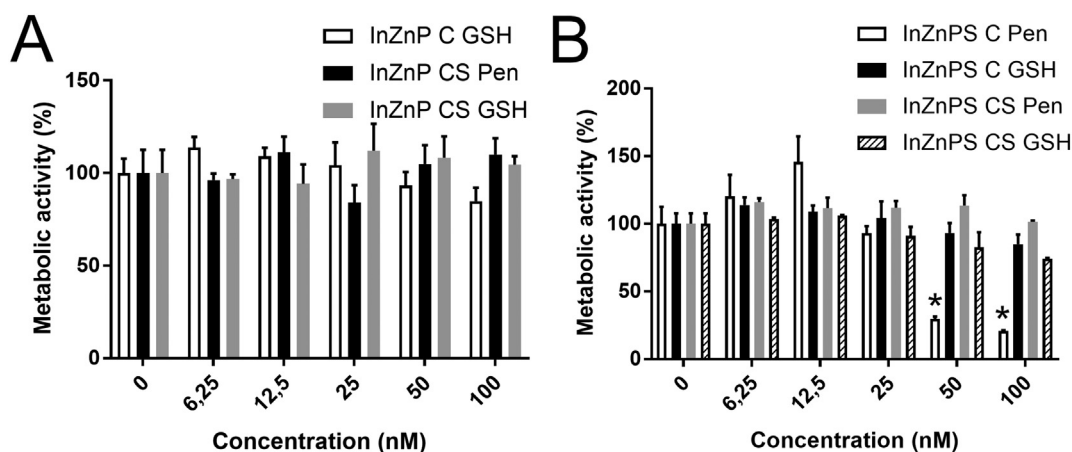
Since QDs exposed to simulated sunlight were much more toxic than

pristine QDs, their physical and chemical transformation upon irradiation was characterized. Visual observation showed a gradual precipitation of the QD suspension, which was still fluorescent, followed by a progressive loss of the fluorescence leading finally to a red-purple transformation product. When imaged by TEM, pristine QDs appeared as nanoparticles with 3–5 nm diameter (Fig. 5A), while aged QDs appeared as large precipitates with heterogeneous structure (Fig. 5B-C). Some areas in these precipitates were composed of In, P, Zn, O and S, while Se and S precipitated separately, as probed by EDS analysis (Fig. 5D-I).

Irradiation with simulated sunlight resulted in a marked change in In speciation, as assessed by EXAFS at the In K-edge. In pristine QDs, In was mainly bound to P atoms, with a main peak of the Fourier transformed spectra at  $R + \Delta R = 2 \text{ \AA}$  (Fig. 6A-B). The local structure differed slightly from the structure of bulk indium phosphide, in which In is bound to 4 atoms of P at 2.54 Å (Wyckoff, 1963). A minor contribution of O and S was found for the InZnP and InZnP core-shell QDs, respectively (Table 1). The presence of S in the In coordination shell is consistent with previous observations on InZnP QDs, and is due to the presence of a mixed layer at the core-shell boundary (Cho et al., 2016). The presence of O may arise from the persistence of a minor amount of In precursor after purification in this particular sample. When analyzing aged QDs, whatever their initial composition, the first peak of the Fourier-transformed spectra was at  $R + \Delta R = 1.65 \text{ \AA}$ . This is consistent with coordination of In with O-containing ligands (Fig. 6C-D). Regarding Zn, a drastic change in speciation was also observed. For pristine QDs, the main peak of the Fourier transformed spectrum was at  $R + \Delta R = 1.95 \text{ \AA}$  (Fig. 7), suggesting that Zn was bound to S and possibly Se and P atoms. For aged QDs, the position of the main peak was characteristic of O ligands, and spectra were reproduced by 100% Zn phosphate compounds (the proportions of each species are given in the legend of Fig. 7). The In and Zn EXAFS data suggest complete dissolution of QDs during ageing, the binding of In to COOH and phosphate moieties, and of Zn to phosphate moieties. Pen and CO<sub>2</sub> from air were the only conveyer of –COOH moieties, while phosphate was present in the buffer (PBS) in which QDs were initially dispersed.

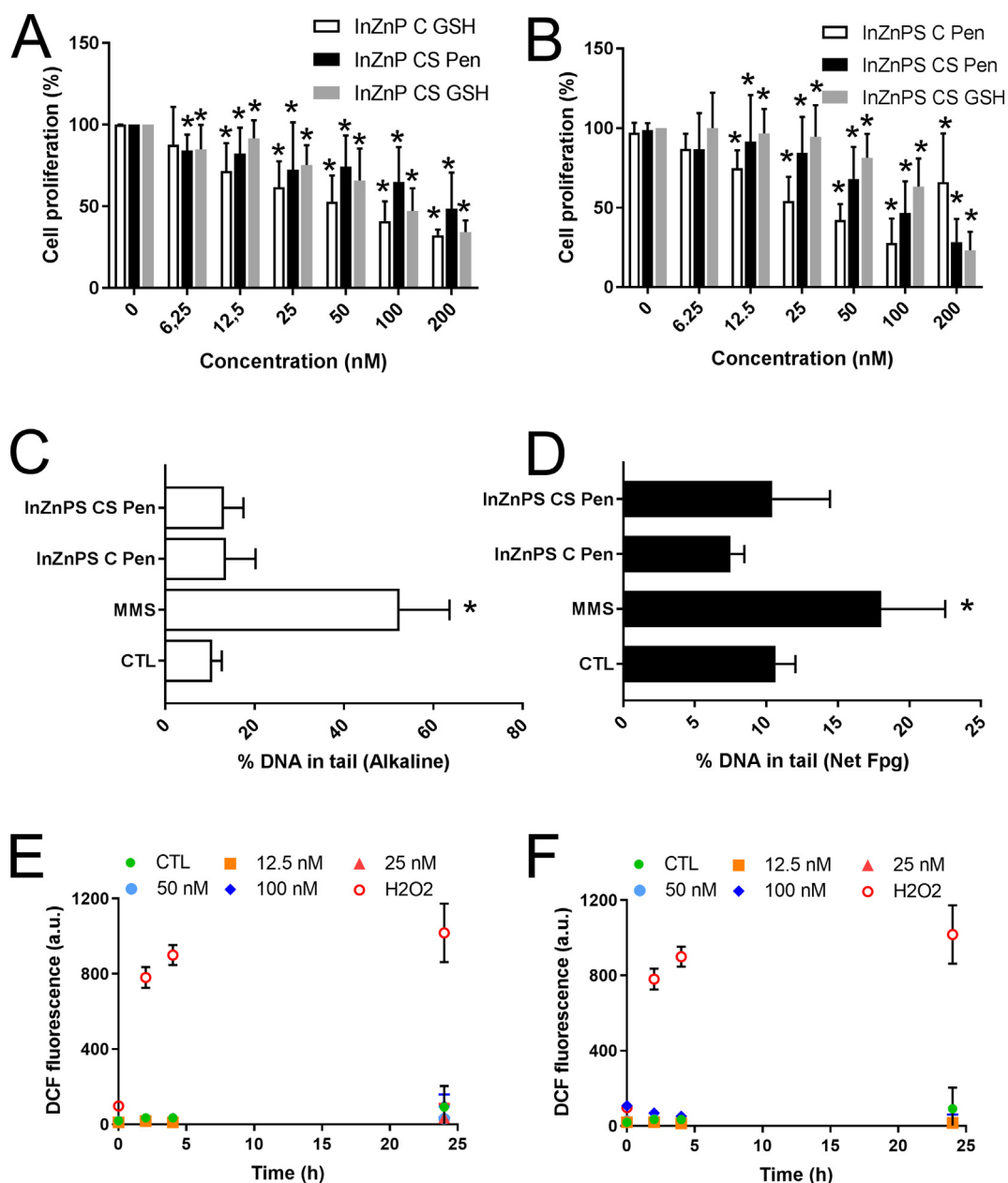
### 3.4. Intracellular distribution

Intracellular accumulation of pristine QDs could not be identified via TEM, because these QDs were too small to be distinguished from cytoplasmic components. Therefore, cells exposed to pristine QDs looked like control cells, with a typical morphology of human primary keratinocytes (Fig. 8A). Conversely, electron-dense precipitates were



**Fig. 3.** Cytotoxicity of InZnP and InZnP QDs, assessed via the WST-1. Cells were exposed to pristine QDs with a core of InZnP (A) or InZnP (B). C: core only, CS: core-shell structure, Pen, GSH: penicillamine or glutathione, respectively, was used as surface ligand. Triton X-100 (1%) was used as positive control. Results are expressed as % relative to the control (unexposed cells). Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 2 independent experiments, performed on keratinocytes from the same donor, with 3 replicates per experiment, statistical significance:  $p < 0.05$ , \*: exposed vs. control.





**Fig. 4.** Impact of sub-lethal concentrations of pristine QDs on cell proliferation, DNA integrity and intracellular level of reactive oxygen species. BrdU proliferation assay on cells were exposed to pristine QDs with a core of InZnP (A) or InZnPS (B). DNA integrity assessed via comet assay, in the alkaline version (C) or the Fpg-modified version (D). Intracellular level of reactive oxygen species assessed via DCFH-DA assay, on keratinocytes exposed to InZnP CS Pen (E) or InZnPS CS Pen (F). C: core only, CS: core-shell structure, Pen: penicillamine was used as surface ligand, GSH: glutathione was used as surface ligand. Tert-butyl hydroperoxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 100  $\mu\text{M}$ , was used as positive control. Graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of 3 to 5 independent experiments, performed on keratinocytes from different donors, with 3 replicates per experiment ( $n = 3$ ), except for E and F where graphs represent mean  $\pm$  standard deviation of a single experiment with 5 independent replicates ( $n = 5$ ). Statistical significance  $^*p < 0.05$ , exposed vs. control.

observed in the cytoplasm of cells exposed to aged QDs, sometimes as large as 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 8B, stars). No clear confinement in cytoplasmic vesicles surrounded by a membrane could be identified. These precipitates were not observed in the cell nucleus nor in mitochondria or any other organelles, but they were often observed close to the nuclear membrane. STEM observation (Fig. 8C), coupled to EDS analysis (Fig. 8D-E) of one of these electron-dense regions revealed that it contained In, P, Zn, Se and S, and that In co-precipitated with P, Zn and O while Se and S co-precipitated independently.

In cells exposed to pristine QDs In speciation did not change further, except in cells exposed to the core-only InZnP QD coated with GSH. Under this condition, a partial dissolution was observed with the

formation of In-COOH and In-phosphate species (Fig. 6C-D, Table 2). In cells exposed to aged QDs, In speciation was unchanged, considering an uncertainty of  $\pm 10\%$  on the percentages.

#### 4. Discussion

We explored the potential of alloyed InP QDs as safer alternatives to Cd-based QDs, using a safer-by-design strategy which combined i) replacement of Cd by In, ii) covering of InP core with a gradient shell composed of Zn(Se,S), iii) alloying of the InP core with either Zn or Zn and S, in order to improve their optical properties and their chemical stability. The main result of this work is that the cytotoxicity of pristine

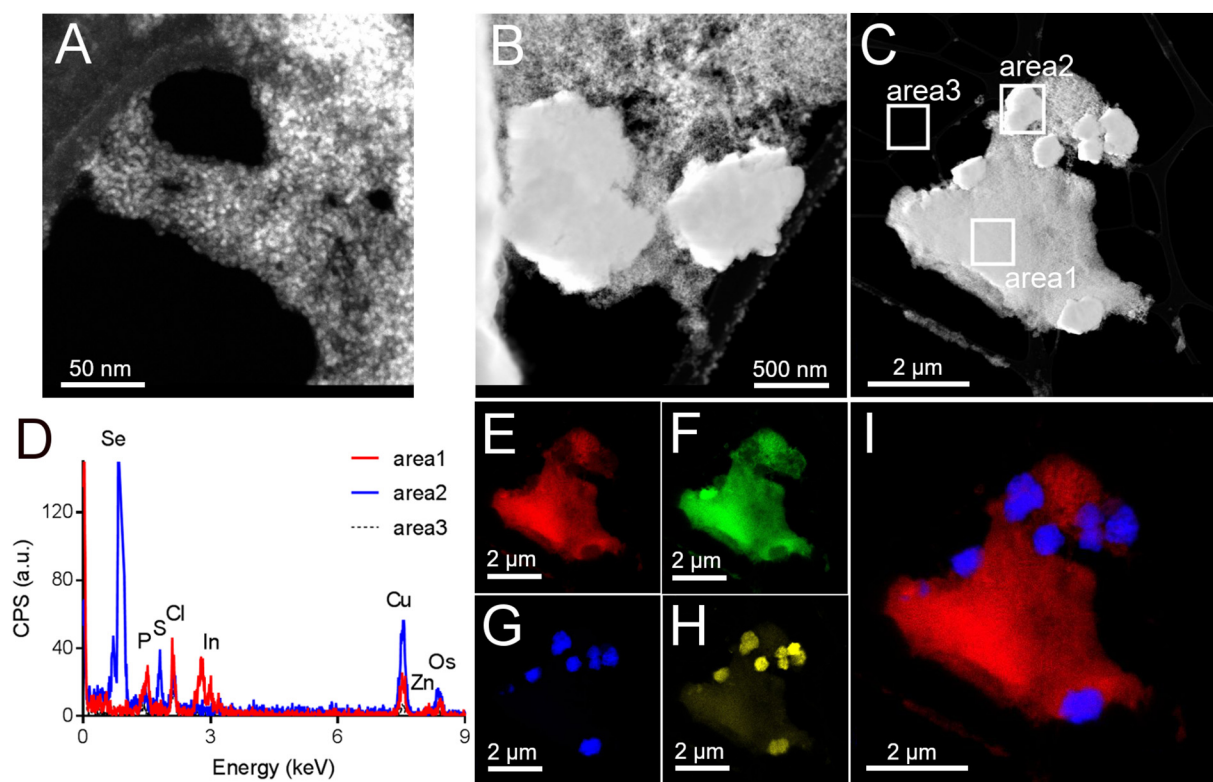


Fig. 5. TEM and STEM imaging, EDS analysis of pristine and aged core-shell InZnPS/Zn(Se,S) QDs. Pristine (A) and aged (B) QDs were imaged by TEM, then aged QDs were imaged by STEM (C) and analyzed by EDS (D-I). D: EDS spectra of areas 1, 2 and 3 as highlighted in C. Reconstruction of the distribution of In (E), P (F), Se (G), S (H); distribution of both In and Se (I).

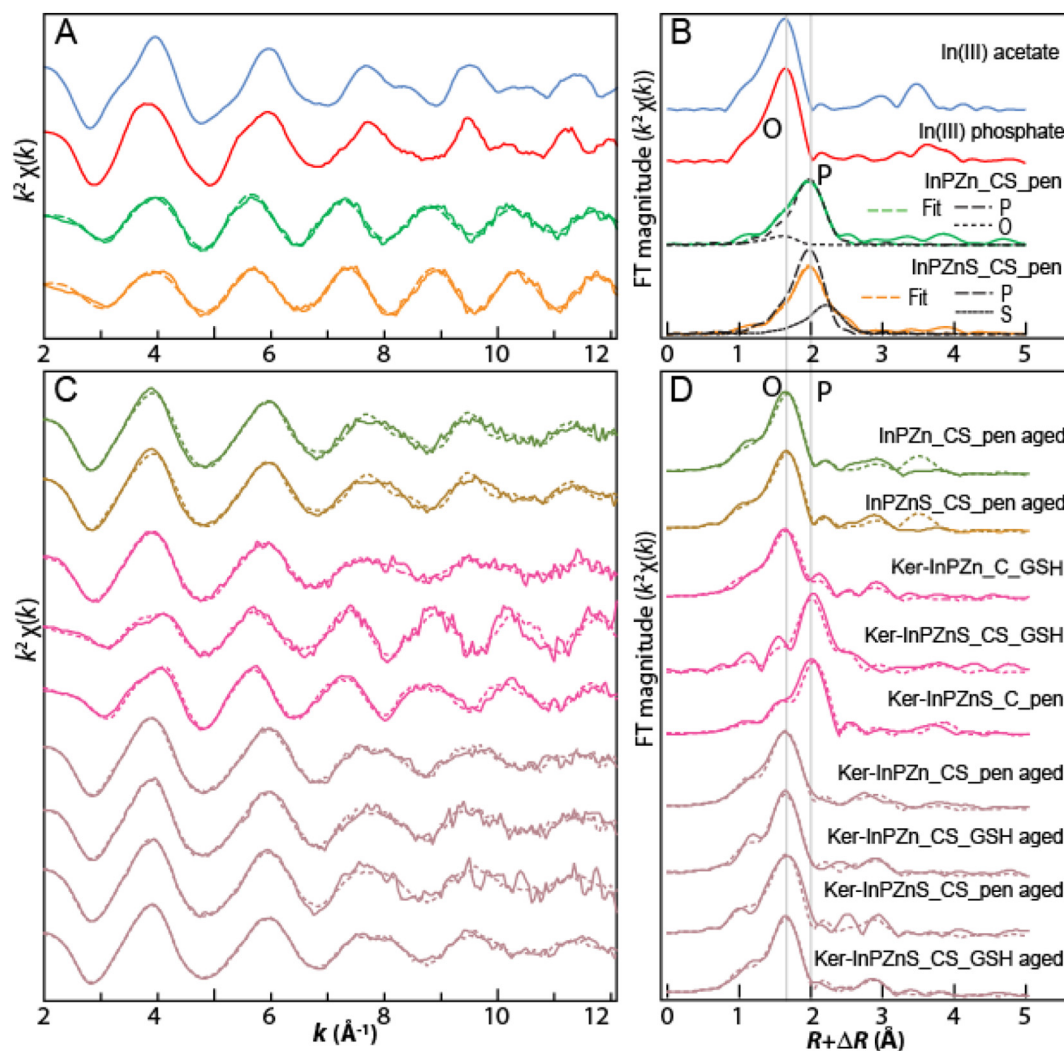
QDs used in this study, regardless of their composition and structure, is lower than the cytotoxicity of CdSe/ZnS QDs. It is also lower than the cytotoxicity reported by others for InP/ZnS QDs, *in vivo* and *in vitro* (Lin et al., 2015; Yaghini et al., 2018; Yaghini et al., 2016; Chibli et al., 2011; Soenen et al., 2014; Brunetti et al., 2013). Conversely all aged QDs show some cytotoxicity. It is important to note that, in their pristine form, both core-only and core-shell QDs are very stable in exposure medium when coated with Pen or GSH. They show no significant agglomeration, whereas aged QDs agglomerate and would consequently immediately settle and interact with cell monolayers for longer periods of time. This would drastically change the effective exposure concentration, which is certainly much higher for cells exposed to aged QDs than for pristine QDs. Consequently, toxicity of pristine vs. aged QDs cannot be directly compared and are discussed separately.

Among pristine QDs, only InZnPS-C-Pen shows cytotoxicity. Conversely, InZnPS-C-GSH (i.e., the QD with the same core composition but different surface coating) and InZnPS-CS-Pen (its core-shell counterpart) are not cytotoxic. This suggests that the presence of a shell reduces the toxicity of this QD, and that surface functionalization does not appreciably influence the cytotoxicity. Noteworthy, ligand exchange of core-only InZnP QDs using Pen is not possible, because these QDs readily degrade during this process. Conversely, core-only InZnPS QDs, in which alloying the core with S results in the formation of a thin, protective layer of ZnS on top of the core (Li and Reiss, 2008), can be transferred with Pen without degrading, i.e. are more chemically stable. Both core-only InZnP and InZnPS can be transferred using GSH, which result in stable and non-cytotoxic suspensions. This suggests that using GSH for ligand exchange leads to a better stabilization of the QD core than Pen, at least in the case of core-only QDs. This behavior can be explained by the chemical nature of GSH, which is, compared to Pen, a more complex molecule containing one amino and two carboxy-groups. The bigger size and different structure with a potential better binding towards the QD surface will support QD integrity during the ligand

exchange and afterwards. Regarding core-shell QDs, they can be transferred using both Pen and GSH, and are all stable and non-cytotoxic. Therefore, coating InZnP and InZnPS core with a layer of Zn(Se,S) prevents their degradation, similar to coating CdSe and InP QDs with a shell of ZnS, which protects them from degradation (Chibli et al., 2011; Lim et al., 2011).

Conversely, ageing leads to a drastic chemical transformation of these QDs, including loss of the structure of QD core and Zn(Se,S) gradient shell. This leads to the precipitation of In(III) and Zn(II) with phosphate and carboxylate moieties which are provided, respectively, by the PBS buffer and by Pen and dissolution of CO<sub>2</sub> from air in the aged QD suspension. Although the speciation of Se has not been studied here, EDS analysis shows that Se and S co-precipitate, and the red-purple color of QD precipitate which is observed after 64 h of ageing certainly originates from this co-precipitation. Oxidative degradation of CdSe/ZnS core/shell QDs has been largely documented. It relies on chemical oxidation of Se and S from the surface of QDs, which first produces lattice structural defects, then leads to the release of soluble and toxic Cd, Se, Zn and S ions (Mancini et al., 2008). Our hypothesis is that the degradation of InP QDs follows the same stages. The gradual degradation of the InZnP and InZnPS structures based on the oxidation of core and shell elements can be monitored by the fluorescence quenching and the subsequent release of In(III) and Zn(II) ions, complexing quickly with available oxygen-rich ligands, i.e. phosphates and carboxylates.

All aged QDs significantly affect cell viability. The degradation products of these QDs (such as In-phosphate and/or -carboxylate, Zn-phosphate and selenium sulfur co-precipitates for core-shell QDs) accumulate in cells and may explain their toxicity. The toxicity of indium, either as In ions or as In-containing particles, has been rarely reported. It has been shown to depend on the cell type (Huaux et al., 2018). Moreover, several studies suggest that it may depend on In speciation, particularly on the potential of In-containing particles to dissolve and



**Fig. 6.** EXAFS analysis of QDs and keratinocytes exposed to QDs, at the In K-edge. Analysis by shell fitting of pristine QDs with InZnP and InZnPS core and Zn(Se,S) shell, coated with Pen (structural parameters are presented in Table 1), and comparison of the spectra with two reference compounds having O as first neighboring atom (A-B). Analysis by linear combination fitting of aged QDs and keratinocytes exposed to pristine and aged QDs (LCF results are presented in Table 2) (C-D). Data are presented as  $k^2$ -weighted EXAFS spectra (A, C) and Fourier transforms (B, D).

**Table 1**

First shell structural parameters for the pristine QDs obtained by shell fittings of the EXAFS spectra, at the In K-edge<sup>a</sup>.

	Atom	R (Å)	N	$\sigma^2$ (Å <sup>2</sup> )	R factor
InZnP-CS-Pen	O	2.15	0.6	0.0022	0.016
	P	2.49	3.4	0.0022	
InZnPS-CS-Pen	P	2.47	3.1	0.0010	0.011
	S	2.74	0.9	0.0010	

<sup>a</sup> N: number of atoms, R: interatomic distance,  $\sigma^2$ : Debye-Waller factor, R factor: residual between fit and experiment. Fits performed in the  $k$  range [2.3–13.5 Å<sup>-1</sup>], and R range [0.8–2.7 Å].

release In ions. For instance, InCl<sub>3</sub> is not cytotoxic, but it has been shown to be genotoxic via the generation of ROS (Lin et al., 2013). Indium-tin-oxide NPs (ITO), consisting of 90% In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and 10% SnO, are cyto- and genotoxic at high concentration, and these effects are correlated with oxidative stress and release of In ions from particles (Bomhard, 2016). Accordingly, InP was shown to be significantly more toxic than ITO, due to the higher solubilization and release of In ions from InP, compared to ITO (Bomhard, 2016; Gwinn et al., 2015). The cellular impacts of zinc are well documented. Zn is an essential trace element, which is crucial for the structure and function of many

proteins, and thereby is necessary for a plethora of cellular functions (Jarosz et al., 2017; Sharif et al., 2012). It has been shown to alleviate the cellular toxicity of a number of toxicants, including non-essential metals, mainly because it activates the expression of metallothioneins and acts as an antioxidant (Rahman et al., 2019). Its antioxidant potency relies primarily on activation of some antioxidant proteins such as superoxide dismutase and catalase, on replacement of oxidant metals such as iron and copper in some metal-binding sites in cells and on antagonizing transition-metal catalyzed reactions (Jarosz et al., 2017). Nevertheless, at higher doses Zn provided as Zn(II) ion or as Zn-containing NPs such as ZnO-NPs, is cytotoxic (Beyersmann and Haase, 2001; Vandebriel and De Jong, 2012). In skin cells, ZnO-NPs cause mitochondrial dysfunction and ROS production, p53 pathway activation, cell cycle perturbation and eventually apoptosis (Vandebriel and De Jong, 2012). Therefore, the release of In(III) and Zn(II) during the degradation of QDs may explain the cytotoxicity of aged QDs. It may also explain why pristine QDs, which are chemically more stable, show essentially no cytotoxicity. However, the behavior of two pristine QDs does not conform to this hypothesis. InZnPS core QD coated with Pen shows significant cytotoxicity, while EXAFS analysis shows no major change in In speciation, i.e. no major degradation of this QD. One hypothesis could be that low-grade degradation occurs, via interaction of QDs or their surface ligand with intracellular components, which would

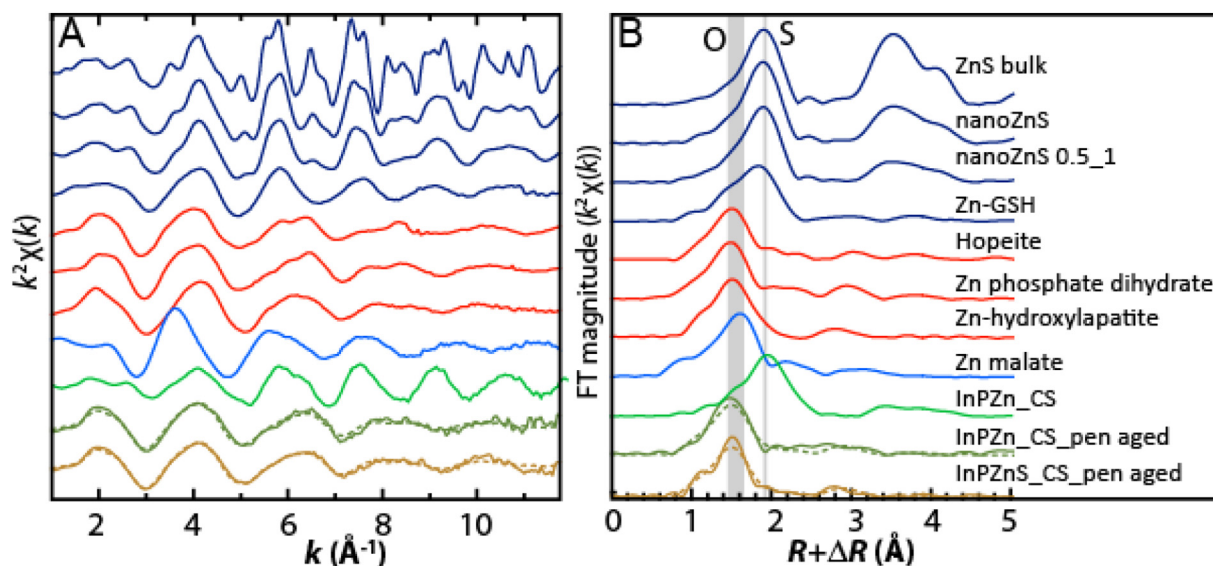


Fig. 7. EXAFS analysis of QDs at the Zn K-edge. EXAFS spectra (A) and Fourier transforms (B) for Zn reference compounds, pristine and aged QDs. Peak positions characteristic of O and S neighboring atoms are indicated by grey lines in B. Spectra for aged InZnP and InZnPS QDs were both reproduced by a combination of 50% Zn phosphate dihydrate and 50% Zn-hydroxyapatite (dashed lines in A and B, with R-factors, residual between fit and experiment of 0.07 and 0.04, respectively).

lead to the release of a small amount of toxic ions from QDs, as already suggested by Soenen et al. (Soenen et al., 2014). This small amount would be sufficient to cause cell death but would not be detected by EXAFS (the limit of detection of a specific chemical species using this technique is 10%). Low-grade degradation, not-observed via EXAFS, would also explain the cell cycle disturbance, leading to decreased proliferation of cells exposed to pristine QDs. Moreover, InZnP core-only QD coated with GSH are not stable, i.e. EXAFS analysis shows that

it degrades inside cells, while it is not cytotoxic. This could suggest that In(III) and Zn(II) are scavenged by GSH, due to the high affinity for metals of its thiol group.

Finally, although InP/ZnS QDs have been shown to generate ROS ex cellulo (Chibli et al., 2011) and their toxicity has been related to oxidative stress (Soenen et al., 2014), InZnPS QDs, both core-only and core-shell and coated with Pen do not induce any oxidative stress. This divergence could be explained by the different QDs used in those

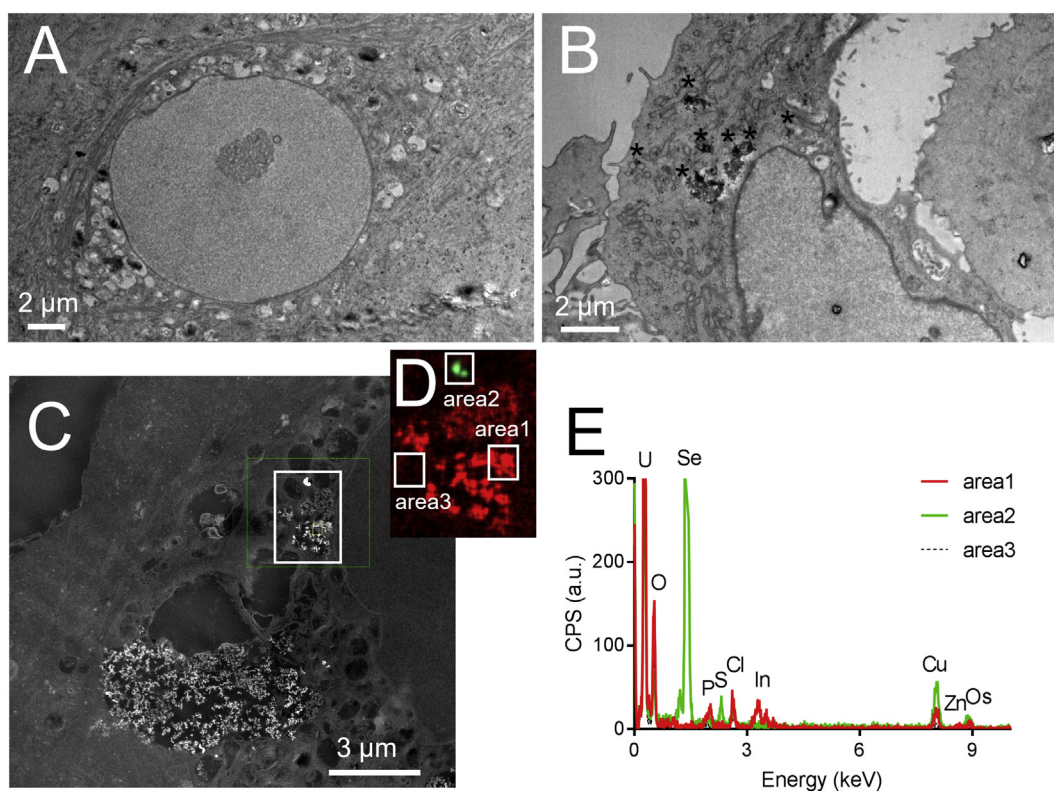


Fig. 8. TEM observation of keratinocytes exposed to InZnPS CS Pen QDs. Control cells (A) and cells exposed to aged InZnPS CS Pen (B, \*: In-rich agglomerates). A region containing In-rich agglomerates was imaged using STEM, in HAADF mode (C), and analyzed via EDS. Reconstruction of In (red) and Se (green) chemical element distribution in the square highlighted in C (D). EDS spectra of the areas 1, 2 and 3 depicted in D (E).

**Table 2**  
Results of the linear combination fits for the In K-edge EXAFS spectra<sup>a</sup>.

	k range	In species (molar %)			Sum	R-factor <sup>b</sup>
		In in pristine QD <sup>a</sup>	In acetate	In phosphate		
<b>QDs</b>						
Aged InZnP CS Pen	2.4–12		52	44	96	0.06
Aged InZnPS CS Pen	2.4–12		53	44	97	0.05
<b>Keratinocytes</b>						
InZnP C GSH	2.4–12	21	42	31	94	0.08
InZnPS CS GSH	2.4–12	100			100	0.18
InZnPS C Pen	2.4–12	100			100	0.08
Aged InZnP CS Pen	2.4–12		53	37	90	0.09
Aged InZnP CS GSH	2.4–12		45	48	93	0.08
Aged InZnPS CS Pen	2.4–12		43	53	96	0.13
Aged InZnPS CS GSH	2.4–12		54	37	91	0.05

<sup>a</sup> For pristine QDs, InZnP and InZnPS were used for samples exposed to InZnP and InZnPS QD, respectively.

<sup>b</sup> Fit quality criterion provided by ATHENA (R factor =  $\Sigma[k^2 \chi_{\text{exp}} - k^2 \chi_{\text{fit}}]^2 / \Sigma[k^2 \chi_{\text{exp}}]^2$ ).

studies, which were InP/ZnS QDs coated with mercaptopropionic acid (MPA) (Chibli et al., 2011; Soenen et al., 2014), while the QDs used in the present study are InZnP(S)/Zn(Se,S) QDs coated with Pen or GSH. Cytotoxicity studies reported here suggest that GSH (containing one thiol, one amino and two carboxy-groups) would provide better stabilization to QDs than Pen (containing one thiol, one amino and one carboxy-groups). MPA is even less complex than Pen, with only one thiol and one carboxy-group. One hypothesis would be that QDs used in the present studies are more stable, and therefore less toxic, than QDs functionalized with MPA. Moreover, for core-shell QDs, the presence of Se reduces the lattice mismatch between the core and the shell of these QDs, also enhancing their stability. Another hypothesis would be that primary human keratinocytes show better resistance to ROS, and more generally to QDs, than the cell lines used in these previous studies, for instance via a more active ROS scavenging activity. This would be in line with the different sensitivities towards QDs observed by Chibli et al. in different cell lines (Chibli et al., 2011).

## 5. Conclusion

In this study, a strong contrast was observed between the toxicity of pristine QDs, that were essentially non-toxic, and the toxicity of aged QDs, which proved to be all toxic. A key point turned out to be the secondary products created during the degradation, which showed a stronger toxic effect than pristine QDs. The presence of the Zn(Se,S) gradient shell efficiently protected the core of QDs from degradation, and therefore reduced their toxicity. Regarding core-only QDs, alloying the core with S facilitated transfer to aqueous solution due to the presence of a thin protective layer of ZnS. In this condition, QD cores were more stable when coated with GSH compared to Pen, therefore GSH ligand increased the safety of these QDs. This study highlights the importance of characterizing QD physico-chemical transformation under realistic lifecycle scenarios, i.e. long-term accelerated weathering in a climatic chamber, since it would have toxicological implications. The use of InP-based materials in the new generation of electronics makes it important to design safer InP compositions, anticipating secondary products which might be released in the environment upon degradation. Although this study was performed with primary human keratinocytes, which are the most relevant possible model of skin cells, it would be important to complement this study with data from *in vivo* experiments, since *in vitro* models do not reproduce the complexity of the skin. Finally, future studies should focus on the physicochemical transformation and effects of QDs contained in products that are already on the market. In these products, QDs are included in polymer matrices, which limit QD degradation and release of toxic substances, and therefore human and environmental exposure.

## Acknowledgements

The authors thank ESRF and CRG committees for the provision of beamtime on FAME beamline (BM30B), and R. Soulas for imaging on TEM OSIRIS, supported and managed by Agence Nationale de la Recherche (ANR), program 'Investissements d'Avenir', reference ANR-10-EQPX-39.

## Funding

This work is a contribution to the Labex Serenade (ANR-11-LABX-0064) funded by the French Government's "Investissements d'Avenir" ANR program, through the A\*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). It was supported by the French National Research agency ANR (grant NEUTRINOS, ANR-16-CE09-0015-03), CNRS and Communauté Université Grenoble Alpes (ComUE, PEPS project SABYDE), and the French Environment and Energy Management Agency (ADEME). This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscope facility is supported by the Auvergne Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the fonds FEDER and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA)

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100168>.

## References

- Lin S, Yu T, Yu Z, Hu X, Yin D. Nanomaterials Safer-by-Design: An Environmental Safety Perspective. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla). 2018;30(17):e1705691.
- Alivisatos, A.P., 1996. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271 (5251), 933–937.
- Armand, L., Tarantini, A., Beal, D., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Sorieul, S., et al., 2016. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 10 (7), 913–923.
- Bastus, N.G., Puentes, V., 2018. Nanosafety: towards safer nanoparticles by design. *Curr. Med. Chem.* 25 (35), 4587–4601.
- Beyersmann, D., Haase, H., 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 14 (3–4), 331–341.
- Bharali, D.J., Lucey, D.W., Jayakumar, H., Pudavar, H.E., Prasad, P.N., 2005. Folate-receptor-mediated delivery of InP quantum dots for bioimaging using confocal and two-

- photon microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (32), 11364–11371.
- Bomhard, E.M., 2016. The toxicology of indium tin oxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 282–294.
- Bottrill, M., Green, M., 2011. Some aspects of quantum dot toxicity. *Chem. Commun. (Camb.)* 47 (25), 7039–7050.
- Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengio, R., Galeone, A., Malvindi, M.A., Vecchio, G., et al., 2013. InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. *Nanoscale* 5 (1), 307–317.
- Calabrese, G., Morgan, B., Riemer, J., 2017. Mitochondrial glutathione: regulation and functions. *Antioxid. Redox Signal.* 27 (15), 1162–1177.
- Chibli, H., Carlini, L., Park, S., Dimitrijevic, N.M., Nadeau, J.L., 2011. Cytotoxicity of InP/ZnS quantum dots related to reactive oxygen species generation. *Nanoscale* 3 (6), 2552–2559.
- Cho, D.Y., Xi, L., Boothroyd, C., Kardynal, B., Lam, Y.M., 2016. The role of ion exchange in the passivation of in(Zn)P nanocrystals with ZnS. *Sci. Rep.* 6, 22818.
- Corazzari, I., Gilardino, A., Dalmazzo, S., Fubini, B., Lovisolo, D., 2013. Localization of CdSe/ZnS quantum dots in the lysosomal acidic compartment of cultured neurons and its impact on viability: potential role of ion release. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 27 (2), 752–759.
- Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N., 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4 (1), 11–18.
- Fitzpatrick, T.B., 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124 (6), 869–871.
- Gilbert, B., Huang, F., Zhang, H.Z., Waychunas, G.A., Banfield, J.F., 2004. Nanoparticles: strained and stiff. *Science* 305 (5684), 651–654.
- Gwinn, W.M., Qu, W., Bousquet, R.W., Price, H., Shines, C.J., Taylor, G.J., et al., 2015. Macrophage solubilization and cytotoxicity of indium-containing particles as in vitro correlates to pulmonary toxicity in vivo. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 144 (1), 17–26.
- Helle, M., Cassette, E., Bezdetnaya, L., Pons, T., Leroux, A., Plenat, F., et al., 2012. Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model. *PLoS One* 7 (8), e44433.
- Huang, K., Demadrille, R., Silly, M.G., Sirotti, F., Reiss, P., Renault, O., 2010. Internal structure of InP/ZnS nanocrystals unraveled by high-resolution soft X-ray photoelectron spectroscopy. *ACS Nano* 4 (8), 4799–4805.
- Huax, F., De Gussem, V., Lebrun, A., Yakoub, Y., Palmi-Pallag, M., Ibouraadaten, S., et al., 2018. New interplay between interstitial and alveolar macrophages explains pulmonary alveolar proteinosis (PAP) induced by indium tin oxide particles. *Arch. Toxicol.* 92 (4), 1349–1361.
- IARC, 1993. Cadmium and Cadmium Compounds. *IRARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 58. pp. 119–237.
- IARC, 2006. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. In: *IRARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 86. pp. 1–294.
- Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Mlyniec, K., Librowski, T., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-kappa B signaling. *Inflammopharmacology* 25 (1), 11–24.
- Kauffer, F.A., Merlin, C., Balan, L., Schneider, R., 2014. Incidence of the core composition on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots. *J. Hazard. Mater.* 268, 246–255.
- Kirchner, C., Liedl, T., Kuder, S., Pellegrino, T., Munoz Javier, A., Gaub, H.E., et al., 2005. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* 5 (2), 331–338.
- Kraegeloh, A., Suarez-Merino, B., Sluijters, T., Micheletti, C., 2018. Implementation of safe-by-Design for Nanomaterial Development and Safe Innovation: why we need a comprehensive approach. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 8 (4).
- Le Bars, M., Legros, S., Levard, C., Chaurand, P., Tella, M., Rovezzi, M., et al., 2018. Drastic change in zinc speciation during anaerobic digestion and composting: instability of nanosized zinc sulfide. *Environ. Sci. Technol.* 52 (22), 12987–12996.
- Li, L., Reiss, P., 2008. One-pot synthesis of highly luminescent InP/ZnS nanocrystals without precursor injection. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (35), 11588–11589.
- Lim, J., Bae, W.K., Lee, D., Nam, M.K., Jung, J., Lee, C., et al., 2011. InP@ZnSe<sub>s</sub> core@composition gradient shell quantum dots with enhanced stability. *Chem. Mater.* 23 (20), 4459–4463.
- Lin, R.H., Yang, M.L., Li, Y.C., Chang, H.M., Kuan, Y.H., 2013. Indium chloride-induced micronuclei via reactive oxygen species in Chinese hamster lung fibroblast V79 cells. *Environ. Toxicol.* 28 (10), 595–600.
- Lin, G., Ouyang, Q., Hu, R., Ding, Z., Tian, J., Yin, F., et al., 2015. In vivo toxicity assessment of non-cadmium quantum dots in BALB/c mice. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 11 (2), 341–350.
- Litvin AP, Martynenko IV, Purcell-Milton F, Baranov AV, Fedorov AV, Gun'ko YK. Colloidal quantum dots for optoelectronics. *J. Mater. Chem. A*. 2017;5(26):13252–75.
- Mancini, M.C., Kairdolf, B.A., Smith, A.M., Nie, S., 2008. Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (33), 10836–10837.
- Mattera, L., Bhuckory, S., Wegner, K.D., Qiu, X., Agnese, F., Linceneau, C., et al., 2016. Compact quantum dot-antibody conjugates for FRET immunoassays with sub-nanomolar detection limits. *Nanoscale* 8 (21), 11275–11283.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., Douki, T., 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (37), 13765–13770.
- Panfili, F.R., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., et al., 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69 (9), 2265–2284.
- Pons, T., Pic, E., Lequeux, N., Cassette, E., Bezdetnaya, L., Guillemin, F., et al., 2010. Cadmium-free CuInS<sub>2</sub>/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS Nano* 4 (5), 2531–2538.
- Proux, O., Biquard, X., Lahera, E., Menthonnex, J.J., Prat, A., Ulrich, O., et al., 2005. FAME: a new beamline for X-ray absorption investigations of very-diluted systems of environmental, material and biological interests. *Phys. Scr. T115*, 970–973.
- Proux, O., Nassif, V., Prat, A., Ulrich, O., Lahera, E., Biquard, X., et al., 2006. Feedback system of a liquid-nitrogen-cooled double-crystal monochromator: design and performances. *J. Synchrotron Radiat.* 13, 59–68.
- Rahman, M.M., Hossain, K.F.B., Banik, S., Sikder, M.T., Akter, M., Bondad, S.E.C., et al., 2019. Selenium and zinc protections against metal-(loids)-induced toxicity and disease manifestations: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168, 146–163.
- Ravel, B., Neville, M., 2005. ATHENA and ARTEMIS: interactive graphical data analysis using IFEFFIT. *Phys. Scr. T115*, 1007–1010.
- Reiss, P., Carriere, M., Linceneau, C., Vaure, L., Tamang, S., 2016. Synthesis of semiconductor nanocrystals, focusing on nontoxic and earth-abundant materials. *Chem. Rev.* 116 (18), 10731–10819.
- Rocha, T.L., Mestre, N.C., Saboia-Morais, S.M., Bebianno, M.J., 2017. Environmental behaviour and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: a review. *Environ. Int.* 98, 1–17.
- Schwarz-Plaschg, C., Kallhoff, A., Eisenberger, I., 2017. Making nanomaterials safer by design? *Nanoethics* 11, 277–281.
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., Fenech, M., 2012. The role of zinc in genomic stability. *Mutat. Res.* 733 (1–2), 111–121.
- Soenen, S.J., Manshian, B.B., Aubert, T., Himmelreich, U., Demeester, J., De Smedt, S.C., et al., 2014. Cytotoxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging. *Chem. Res. Toxicol.* 27 (6), 1050–1059.
- Sugiyama, K., Yu, J.H., Hiraga, K., Terasaki, O., 1999. Monoclinic InPO<sub>4</sub> center dot 2H<sub>2</sub>O. *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications* 55, 279–281.
- Tamang, S., Linceneau, C., Hermans, Y., Jeong, S., Reiss, P., 2016. Chemistry of InP nanocrystal syntheses. *Chem. Mater.* 28 (8), 2491–2506.
- Thuy, U.T.D., Liem, N.Q., Thanh, D.X., Protiere, M., Reiss, P., 2007. Optical transitions in polarized CdSe, CdSe/ZnSe, and CdSe/CdS/ZnS quantum dots dispersed in various polar solvents. *Appl. Phys. Lett.* 91 (24).
- Ung, T.D.T., Pham, T.T., Nguyen, Q.L., Li, L., Reiss, P., 2010. Comparative photoluminescence study of close-packed and colloidal InP/ZnS quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* 96 (7), 3.
- Vandebriel, R.J., De Jong, W.H., 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 5, 61–71.
- Wegner, K.D., Hildebrandt, N., 2015. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 44 (14), 4792–4834.
- Wyckoff, R.W.G., 1963. *Crystal Structure*, Second edition. 1. New York Interscience Publishers, pp. 85–237.
- Yaghini, E., Turner, H.D., Le Marois, A.M., Suhling, K., Naasani, I., MacRobert, A.J., 2016. In vivo biodistribution studies and ex vivo lymph node imaging using heavy metal-free quantum dots. *Biomaterials* 104, 182–191.
- Yaghini, E., Turner, H., Pilling, A., Naasani, I., MacRobert, A.J., 2018. In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 14 (8), 2644–2655.



## **Annexe 3 : Résultats de l'analyse protéomique**





**Effets communs des QDs :**

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 8,762379717981657				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	26	8,31	Q9UGI8, P29317, Q7L1Q6, Q9UQB8, Q8WU90, Q9Y6W5, Q9Y5K6, Q9H4M9, Q9NQW6, Q9UH65, Q00341, O95433, Q99959, P61978, O75955, Q9P0L0, P15880, P49207, Q14008, Q07960, Q9UBC2, Q92522, O60749, O60664, P23229, P78344	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	25	7,99	Q9UGI8, P29317, Q7L1Q6, Q9UQB8, Q8WU90, Q9Y6W5, Q9Y5K6, Q9H4M9, Q9NQW6, Q9UH65, Q00341, O95433, P61978, Q99959, Q9P0L0, P15880, P49207, Q14008, Q07960, Q9UBC2, Q92522, O60749, O60664, P23229, P78344	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	22	7,03	Q9P0L0, P15880, Q9UGI8, P29317, Q7L1Q6, P49207, Q8WU90, Q9UQB8, Q9Y6W5, Q14008, Q07960, Q9UBC2, Q92522, Q9UH65, Q9NQW6, Q9H4M9, O60749, Q00341, O60664, O95433, P61978, P78344	0,00
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 6,369584705470202				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	17	5,43	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P78406, P62277, P25398, P52948, P62280, P12270, P62899, Q8N1F7, P62906, P62829, P62701, P46781	0,00
UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	23	7,35	P15880, P08579, P18124, P52597, P46777, P52272, P22626, P42766, P49207, P14866, P62277, P25398, Q9HD33, P62280, P62899, P09012, P62906, P62829, Q9UHB9, P61978, Q6DKI1, P62701, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	16	5,11	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P62495, P62277, P25398, P62280, P62899, P62906, P62829, P15170, P38919, P62701, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	14	4,47	P62280, P15880, P18124, P62899, P46777, P49207, P42766, P62906, P62277, P62829, P25398, Q9UHB9, P62701, P46781	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	17	5,43	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P19525, P62277, P62280, P62899, Q9P2E9, P62906, P62829, Q15637, Q9UHB9, Q6DKI1, P62701, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	16	5,11	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P62277, P25398, P20042, P06730, P62280, P62899, P62906, P62829, P78344, P62701, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	18	5,75	P15880, Q969X6, P18124, Q9H0D6, P46777, P42766, P49207, P62277, P25398, Q2NL82, P62280, P62899, P62906, P62829, Q8TED0, P38919, P62701, P46781	0,00
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	15	4,79	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P62277, P25398, Q9HD33, P62280, P62899, P62906, P62829, Q6DKI1, P62701, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	17	5,43	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P19525, P62277, P25398, P62280, Q7Z222, P62899, Q9P2E9, P12081, P62906, P62829, P62701, P46781	0,03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	9	2,88	P18124, P62899, P46777, P49207, P42766, P62906, P62829, P51116, Q6DKI1	0,03
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003735~structural constituent of ribosome	15	4,79	P15880, P18124, P46777, P49207, P42766, P62277, P25398, Q9HD33, P62280, P62899, P62906, P62829, Q6DKI1, P62701, P46781	0,08
KEGG_PATHWAY	hsa03010:Ribosome	13	4,15	P62280, P15880, P18124, P62899, P46777, P49207, P42766, P62906, P62277, P62829, P25398, P62701, P46781	0,27
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	6	1,92	P62280, P15880, P62277, P25398, P62701, P46781	1,77
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 4,422480749415524				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	19	6,07	P08579, P52597, P52272, P22626, Q8IYB3, Q7L014, P14866, Q9UMS4, Q8WXF1, Q15233, P30876, Q99459, Q13435, P09012, Q05519, Q15393, Q15637, P38919, P61978	0,00
UP_KEYWORDS	Spliceosome	13	4,15	P08579, P52597, P52272, P22626, Q8IYB3, Q9UMS4, Q99459, Q13435, P09012, Q15393, P38919, P61978, Q15637	0,00

Annexes

UP_KEYWORDS	mRNA processing	19	6,07	P08579, Q12849, P52597, Q9H0D6, P52272, P22626, Q8IYB3, Q7L014, Q9UMS4, Q15233, Q99459, Q13435, Q8TCS8, P09012, Q05519, Q15393, Q15637, P38919, P61978	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	11	3,51	P08579, Q13435, Q99459, P52597, P52272, P22626, Q8IYB3, Q9UMS4, Q15393, P61978, P38919	0,01
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	16	5,11	P08579, P52597, P52272, P22626, Q8IYB3, Q7L014, Q9UMS4, Q15233, Q99459, Q13435, P09012, Q05519, Q15393, Q15637, P38919, P61978	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005681~spliceosomal complex	8	2,56	P08579, Q13435, P52272, P22626, Q9BZZ5, P09012, Q15393, Q15637	1,52
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	10	3,19	P08579, Q13435, Q99459, P52272, Q7L014, P09012, Q9UMS4, Q15393, P61978, P38919	9,55
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 4,3766034390643025				
SMART	SM00322:KH	8	2,56	Q96AE4, Q8TCS8, P51116, Q96I24, P51114, Q15637, P61978, Q00341	0,00
INTERPRO	IPR004087:K Homology domain	8	2,56	Q96AE4, Q8TCS8, P51116, Q96I24, P51114, Q15637, P61978, Q00341	0,00
INTERPRO	IPR004088:K Homology domain, type 1	8	2,56	Q96AE4, Q8TCS8, P51116, Q96I24, P51114, Q15637, P61978, Q00341	0,01
UP_SEQ_FEATURE	domain:KH 1	6	1,92	Q96AE4, P51116, Q96I24, P51114, P61978, Q00341	0,05
UP_SEQ_FEATURE	domain:KH 2	6	1,92	Q96AE4, P51116, Q96I24, P51114, P61978, Q00341	0,05
UP_SEQ_FEATURE	domain:KH 3	4	1,28	Q96AE4, Q96I24, P61978, Q00341	2,29
UP_SEQ_FEATURE	domain:KH 4	3	0,96	Q96AE4, Q96I24, Q00341	7,31
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 4,178692887674807				
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	39	12,46	P49748, Q9NX46, Q99536, Q8NE86, O43615, O75964, P09669, O95573, O96008, Q9HD33, Q3SY69, Q9UHV9, Q96EY7, Q8TCS8, P42345, P22695, P49419, Q96Q11, Q16891, Q99623, P47985, Q9Y4W6, Q9H3P7, Q12849, P14406, P49821, O15294, P49411, Q9Y6N5, Q13637, P39748, O95299, Q9H9B4, P38117, P40939, P50213, Q8WWI5, Q16836, Q9P2R7	0,00
UP_KEYWORDS	Transit peptide	23	7,35	P49748, P47985, P14406, Q9NX46, Q12849, P49821, Q8NE86, O43615, Q9Y6N5, P49411, Q9HD33, Q3SY69, Q96EY7, O95299, Q8TCS8, P40939, P50213, Q16836, Q9P2R7, P49419, P22695, Q16891, Q96Q11	0,03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005743~mitochondrial inner membrane	21	6,71	P49748, P47985, Q9Y4W6, P51648, P49821, Q8NE86, O43615, O75964, Q9BPW8, Q9Y6N5, P49411, P09669, Q9HD33, Q96EY7, O95299, Q9H9B4, P40939, Q16836, P22695, Q99623, Q16891	0,10
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	17	5,43	P49748, P47985, P14406, P49821, O43615, Q9Y6N5, P49411, Q9HD33, Q96EY7, O95299, Q8TCS8, P40939, P50213, Q16836, Q9P2R7, P22695, Q96Q11	5,67
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 3,620665342598534				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	19	6,07	P08579, P52597, P52272, P22626, Q8IYB3, Q7L014, P14866, Q9UMS4, Q8WXF1, Q15233, P30876, Q99459, Q13435, P09012, Q05519, Q15393, Q15637, P38919, P61978	0,00
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 2	10	3,19	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, P14866, P09012, P43243, Q8WXF1	0,23
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 1	10	3,19	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, P14866, P09012, P43243, Q8WXF1	0,23
SMART	SM00360:RRM	12	3,83	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, O95104, P14866, P09012, Q05519, P43243, Q8WXF1	0,67
INTERPRO	IPR000504:RNA recognition motif domain	12	3,83	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, O95104, P14866, P09012, Q05519, P43243, Q8WXF1	2,28
INTERPRO	IPR012677:Nucleotide-binding, alpha-beta plait	13	4,15	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, O95104, P22626, P14866, P09012, Q05519, Q9BQ39, P43243, Q8WXF1	2,53

## Annexes

Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 3,0670951910246624				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030529~intracellular ribonucleoprotein complex	12	3,83	P08579, P18124, P52597, P46777, P52272, P22626, P14866, P61978, P38919, P06748, P62701, P46781	0,03
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 2	10	3,19	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, P14866, P09012, P43243, Q8WXF1	0,23
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 1	10	3,19	Q15233, P08579, Q12849, P52597, P52272, P22626, P14866, P09012, P43243, Q8WXF1	0,23
UP_KEYWORDS	Viral nucleoprotein	5	1,60	P08579, P52597, P52272, P14866, P61978	1,06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0019013~viral nucleocapsid	5	1,60	P08579, P52597, P52272, P14866, P61978	1,66
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010467~gene expression	6	1,92	P30876, P52597, P52272, P22626, P14866, P61978	2,83
UP_KEYWORDS	Virion	5	1,60	P08579, P52597, P52272, P14866, P61978	7,15
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 2,8291930348166097				
UP_KEYWORDS	rRNA-binding	5	1,60	P62280, Q96EY7, P46777, P62701, P46781	0,58
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	6	1,92	P62280, P15880, P62277, P25398, P62701, P46781	1,77
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0019843~rRNA binding	5	1,60	P62280, Q96EY7, Q9H7B2, P62701, P46781	8,10
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 2,563658502847738				
SMART	SM00809:Alpha_adaptinC2	4	1,28	O94973, Q10567, O75843, Q9NZ52	0,37
INTERPRO	IPR008152:Clathrin adaptor, alpha/beta/gamma-adaptin, appendage, Ig-like subdomain	4	1,28	O94973, Q10567, O75843, Q9NZ52	0,54
INTERPRO	IPR013041:Coatamer/clathrin adaptor appendage, Ig-like subdomain	4	1,28	O94973, Q10567, O75843, Q9NZ52	1,37
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030117~membrane coat	5	1,60	O43633, O94973, Q10567, O14617, O75843	1,25
INTERPRO	IPR002553:Clathrin/coatamer adaptor, adaptin-like, N-terminal	4	1,28	O94973, Q10567, O14617, O75843	2,20
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008565~protein transporter activity	7	2,24	O60684, Q92973, O94973, Q96P70, Q10567, O14617, O75843	2,78
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030131~clathrin adaptor complex	4	1,28	O94973, Q10567, O75843, Q9NZ52	3,14
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 2,3100831605976717				
UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	53	16,93	P61204, O43615, P36405, Q15286, P61006, Q9H4M9, P54619, Q7L7X3, Q86YS6, Q96Q11, Q9Y4W6, Q6P1M0, P21127, P49589, P49411, Q9UL25, P49902, O43237, P14735, O15067, P84085, Q9P2R7, P56192, P29317, P12956, Q7L014, P08581, O95573, Q9NZN4, Q9NZN3, Q8TBX8, Q72222, P61160, Q58FF8, P20591, Q15257, P28482, P53602, Q15904, P49736, P42345, P38919, P15170, P61224, P19525, Q13637, P25205, P26640, Q15746, P12081, Q92614, P57735, Q9BQ39	0,01
UP_KEYWORDS	ATP-binding	37	11,82	P56192, P29317, O43615, P12956, Q7L014, P08581, O95573, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3, Q8TBX8, Q58FF8, P61160, P54619, Q15257, Q7L7X3, P28482, P53602, Q15904, P49736, P42345, P38919, Q96Q11, Q9Y4W6, P21127, P49589, P19525, O43237, P14735, P25205, P26640, Q15746, P12081, O15067, Q92614, Q9BQ39, Q9P2R7	1,57

## Annexes

Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 1,9809569347226461				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003924~GTPase activity	15	4,79	P61204, P49411, Q9UL25, P36405, Q15286, P52566, P61006, Q13637, Q2NL82, Q7Z2Z2, P20591, P84085, P15170, Q86YS6, P61224	0,14
INTERPRO	IPR005225:Small GTP-binding protein domain	11	3,51	Q7Z2Z2, P61204, Q9UL25, P36405, Q15286, P61006, P57735, P84085, Q13637, Q86YS6, P61224	0,78
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005525~GTP binding	18	5,75	P61204, P49411, Q9UL25, P36405, Q15286, P61006, Q13637, Q9NZN4, Q9H4M9, Q2NL82, Q9NZN3, Q7Z2Z2, P20591, P57735, P84085, P15170, Q86YS6, P61224	0,98
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:GTP	14	4,47	P61204, P49411, Q9UL25, P36405, Q15286, P61006, Q13637, Q7Z2Z2, P20591, P57735, P84085, P15170, Q86YS6, P61224	1,83
UP_KEYWORDS	GTP-binding	14	4,47	P61204, P49411, Q9UL25, P36405, Q15286, P61006, Q13637, Q7Z2Z2, P20591, P57735, P84085, P15170, Q86YS6, P61224	3,12
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:Effector region	7	2,24	Q9UL25, Q15286, P61006, P57735, Q13637, Q86YS6, P61224	7,48
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 1,924691944881562				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	9	2,88	P06730, P12270, P22626, Q8IYB3, Q8N1F7, P78406, Q05519, P38919, P52948	0,78
KEGG_PATHWAY	hsa03013:RNA transport	14	4,47	P06730, P12270, Q9H814, Q8IYB3, P78406, Q8N1F7, P51116, O43592, P51114, P38919, P52948, P78344, P20042, Q96Q11	0,68
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005635~nuclear envelope	10	3,19	P12270, O43633, P55060, Q8N1F7, Q13185, P78406, Q96P70, P43034, P52948, Q15125	2,22
GOTERM_BP_DIRECT	GO:1900034~regulation of cellular response to heat	7	2,24	P12270, Q99615, P28482, Q8N1F7, P78406, P42345, P52948	3,92
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006409~tRNA export from nucleus	5	1,60	P12270, Q8N1F7, P78406, O43592, P52948	4,17
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006606~protein import into nucleus	6	1,92	P12270, O60684, P55060, Q8N1F7, P78406, Q96P70	6,42
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0034399~nuclear periphery	4	1,28	P12270, Q92973, Q8N1F7, P52948	6,89
Annotation Cluster 15	Enrichment Score: 1,7990889312880836				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005783~endoplasmic reticulum	26	8,31	P62633, O75915, Q14573, Q14696, O95573, P61009, Q15125, Q9UK22, P50851, O95433, Q9UHB9, P26885, O95456, P04844, Q9P0L0, Q6P1M0, O94905, Q15293, Q13637, P30040, P55145, O60762, Q9BZF1, Q9P2E9, Q9UNW1, O43852	5,41
UP_KEYWORDS	Endoplasmic reticulum	28	8,95	P62633, O75915, Q14573, Q14696, O95573, P61009, Q15125, P20591, Q9UK22, P50851, O95433, P42345, P26885, O95456, P04844, Q9P0L0, Q6P1M0, P51648, Q9HCU5, O94905, Q9UL25, Q15293, P30040, O60762, Q9BZF1, Q9P2E9, Q9UNW1, O43852	8,48
Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 1,7853230052643687				
INTERPRO	IPR001431:Peptidase M16, zinc-binding site	3	0,96	O43847, P22695, P14735	4,00
INTERPRO	IPR011765:Peptidase M16, N-terminal	3	0,96	O43847, P22695, P14735	8,06
INTERPRO	IPR011249:Metalloenzyme, LuxS/M16 peptidase-like	3	0,96	O43847, P22695, P14735	8,06
INTERPRO	IPR011237:Peptidase M16 domain	3	0,96	O43847, P22695, P14735	8,06
INTERPRO	IPR007863:Peptidase M16, C-terminal domain	3	0,96	O43847, P22695, P14735	8,06

Annotation Cluster 18	Enrichment Score: 1,6328846484453938				
INTERPRO	IPR010987:Glutathione S-transferase, C-terminal-like	5	1,60	P26640, P56192, P49589, P28161, Q13155	6,97
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006418~tRNA aminoacylation for protein translation	5	1,60	P26640, P56192, P49589, Q13155, P12081	9,24
INTERPRO	IPR004046:Glutathione S-transferase, C-terminal	4	1,28	P26640, P56192, P28161, Q13155	9,25
Annotation Cluster 19	Enrichment Score: 1,5799997170943876				
SMART	SM00027:EH	4	1,28	Q9UBC2, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	0,70
INTERPRO	IPR000261:EPS15 homology (EH)	4	1,28	Q9UBC2, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	1,04
UP_SEQ_FEATURE	domain:EH	3	0,96	Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	3,62
INTERPRO	IPR022812:Dynammin	4	1,28	P20591, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	3,93
Annotation Cluster 20	Enrichment Score: 1,4998595015404326				
KEGG_PATHWAY	hsa00071:Fatty acid degradation	6	1,92	P49748, P51648, P40939, O95573, Q16836, P49419	5,53
KEGG_PATHWAY	hsa00410:beta-Alanine metabolism	5	1,60	P51648, Q96KP4, P19623, P40939, P49419	9,88
Annotation Cluster 23	Enrichment Score: 1,4435122433484942				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005885~Arp2/3 protein complex	4	1,28	Q9BPX5, P61160, O15144, O15511	1,31
BIOCARTA	h_rhoPathway:Rho cell motility signaling pathway	6	1,92	Q15746, P61160, O15144, Q9UQB8, O15511, Q07960	1,26

### Effets spécifiques des QDs non-vieillis :

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 17,127122381235523				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	41	9,72	Q9UHB6, P62820, Q96TA1, Q8WUF5, Q9NR46, P12931, Q9UHD8, P62750, Q9HC38, Q9Y6E0, P54136, P51610, P48730, P30041, Q9UHX1, Q9NVD7, Q9Y265, Q9H3U1, Q9Y570, P04083, Q9NUQ8, P05556, P46060, Q92817, Q14134, Q9Y371, P14923, O00560, P31939, O00567, Q86SQ0, P26641, O00299, P50552, O75874, Q15691, Q8N3F8, Q16513, P53367, Q14847, Q16181	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	41	9,72	Q9UHB6, P62820, Q96TA1, Q8WUF5, Q9NR46, P12931, Q9UHD8, P62750, Q9HC38, Q9Y6E0, P54136, P51610, P48730, P30041, Q9UHX1, Q9NVD7, Q9Y265, Q9H3U1, Q9Y570, P04083, Q9NUQ8, P05556, P46060, Q92817, Q14134, Q9Y371, P14923, O00560, P31939, O00567, Q86SQ0, P26641, O00299, P50552, O75874, Q15691, Q8N3F8, Q16513, P53367, Q14847, Q16181	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	36	8,53	Q9UHB6, P62820, Q96TA1, Q8WUF5, Q9NR46, Q9UHD8, P62750, Q9HC38, Q9Y6E0, P54136, P51610, P48730, P30041, Q9UHX1, Q9Y265, Q9H3U1, Q9Y570, Q9NUQ8, P46060, Q14134, Q92817, Q9Y371, O00560, P31939, O00567, Q86SQ0, P26641, P50552, O75874, Q15691, P09758, Q8N3F8, Q16513, P53367, Q14847, Q16181	0,00

Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 10,663759009498317				
UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	89	21,09	P51531, Q9Y5M8, P62820, P07437, P00367, Q9H0A0, Q9UHD8, P12931, Q3ZCM7, P62070, P47897, Q9Y6E0, Q9Y5Y2, P11586, P48730, Q9Y4I1, Q8NFF5, P11233, Q92620, O00442, Q08211, O00148, P00568, P63096, Q9Y265, Q8IY21, Q9POV9, P29992, Q9NR19, Q02880, Q9NUQ8, P46459, Q8TDD1, P50570, Q9NSE4, P23258, Q9NUU7, Q6PI48, Q14683, O00159, P49591, O60488, Q9Y5S2, Q9Y276, Q16181, P43686, P34932, Q03113, P11388, Q03518, P54136, P23743, Q6UB35, P16615, P13861, P04899, P78527, Q95819, P41743, P22102, Q12965, Q8N3C0, O00429, P06241, P55072, O94832, P08754, Q86V21, Q9Y5P6, Q8NE71, Q9BZX2, O75643, O43681, Q9BUQ8, Q14839, P50148, P48729, O14936, P46063, P61086, Q13838, P06576, Q13085, Q05397, Q9H0S4, P25705, Q15645, Q5H9U9, Q16513	0,00
INTERPRO	IPRO27417:P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	57	13,51	P51531, Q9Y5M8, P62820, Q9UHD8, P62070, O00204, Q9Y5Y2, P11586, Q9Y4I1, Q92620, P11233, Q08211, P00568, O00148, Q9POV9, Q8IY21, Q9Y265, P63096, P29992, Q9NUQ8, P46459, Q8TDD1, P50570, Q9NUU7, P21281, Q14683, O00159, Q9Y276, Q16181, P43686, Q03113, Q03518, Q6UB35, P04899, Q12965, Q8N3C0, O00429, Q5K651, P55072, O94832, P08754, Q8NE71, Q9BZX2, O43681, O75643, Q14839, Q9BUQ8, P50148, Q14936, P46063, Q13838, P06576, Q1KMD3, Q9H0S4, P25705, Q15645, Q5H9U9	0,00
UP_KEYWORDS	ATP-binding	69	16,35	P51531, P00367, Q9H0A0, P12931, P47897, Q9Y6E0, Q9Y5Y2, P11586, P48730, Q9Y4I1, Q8NFF5, Q92620, O00442, Q08211, O00148, P00568, Q8IY21, Q9Y265, Q9NR19, Q02880, Q9NUQ8, P46459, Q8TDD1, Q9NSE4, Q9NUU7, Q6PI48, Q14683, O00159, P49591, O60488, Q9Y5S2, Q9Y276, P43686, P34932, P11388, Q03518, P23743, Q6UB35, P54136, P16615, P78527, Q95819, P41743, Q12965, P22102, Q8N3C0, P06241, P55072, O94832, Q86V21, Q8NE71, Q9BZX2, O43681, O75643, Q9BUQ8, Q14839, P48729, O14936, P46063, Q13838, P61086, P06576, Q13085, Q05397, Q9H0S4, P25705, Q15645, Q5H9U9, Q16513	0,00
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	52	12,32	P51531, Q9H0A0, P12931, Q9Y6E0, Q9Y5Y2, P11586, P48730, Q9Y4I1, Q92620, Q08211, P00568, O00148, Q8IY21, Q9Y265, Q02880, P46459, Q8TDD1, Q9NUU7, Q14683, O00159, P49591, Q9Y276, Q9Y5S2, P43686, P11388, Q03518, Q6UB35, Q95819, P41743, Q12965, P22102, Q8N3C0, P06241, P55072, O94832, Q9BZX2, O43681, O75643, Q14839, Q9BUQ8, P48729, O14936, P46063, Q13838, Q13085, P06576, Q05397, Q9H0S4, Q5H9U9, Q15645, P25705, Q16513	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	72	17,06	P51531, P00367, Q9H0A0, P12931, P47897, Q9Y6E0, Q9Y5Y2, P11586, P48730, Q6P3W7, Q9Y4I1, Q8NFF5, Q92620, O00442, Q08211, O00148, P00568, Q8IY21, Q9Y265, Q9NR19, Q02880, Q9NUQ8, P46459, Q8TDD1, Q9NSE4, Q9NUU7, P21281, Q6PI48, Q14683, O00159, P49591, O60488, Q9Y5S2, Q9Y276, P43686, P34932, P11388, Q03518, P23743, Q6UB35, P54136, P16615, P78527, Q95819, P41743, Q12965, P22102, Q8N3C0, Q9Y287, P06241, P55072, O94832, Q86V21, Q8NE71, Q9BZX2, O43681, O75643, Q9BUQ8, Q14839, P48729, O14936, P46063, P61086, Q13838, P06576, Q13085, Q05397, Q9H0S4, P25705, Q15645, Q5H9U9, Q16513	0,00
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 6,339985626910311				
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	55	13,03	P00367, P12931, Q86Y39, Q9H845, O95831, Q8NFF5, P80404, Q9Y512, P23396, Q13423, Q9NYK5, Q96HS1, O15121, Q9NSE4, Q9Y241, Q13011, Q6PI48, Q6NUK1, P50336, Q07817, Q04837, Q07812, Q00325, P28331, P22033, P36639, O60488, O00154, Q6L8Q7, Q9Y276, Q9H2U2, P23368, Q9HC38, Q00796, Q8WWC4, Q6UB35, P09622, Q9BWM7, P30837, Q96A26, P05091, P31040, Q9HB07, O00429, Q6NZI2, O94925, Q9Y371, Q9UBX3, P99999, P06576, P04156, O43169, P25705, P30038, Q9NUJ1	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	26	6,16	Q9H2U2, P00367, P23368, P47897, Q8WWC4, P09622, Q6UB35, P30837, P05091, Q8NFF5, P80404, Q9UNQ2, P23396, O94925, Q9NSE4, Q6PI48, Q07817, Q04837, P06576, P22033, P28331, P25705, P30038, P36639, Q6L8Q7, Q9NUJ1	0,00
UP_KEYWORDS	Transit peptide	30	7,11	Q9H2U2, P00367, P23368, Q8WWC4, Q6UB35, P09622, P30837, P05091, Q9H845, O95831, Q8NFF5, P31040, Q9HB07, P80404, Q13423, O94925, Q9NSE4, Q13011, P09110, Q6PI48, Q04837, P06576, Q00325, P22033, P28331, P25705, P30038, P36639, Q6L8Q7, Q9NUJ1	0,00
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	26	6,16	Q9H2U2, P00367, P23368, Q8WWC4, P09622, Q6UB35, P30837, P05091, O95831, Q9H845, P31040, Q9HB07, P80404, Q13423, O94925, Q9NSE4, Q13011, Q6PI48, Q04837, P06576, Q00325, P22033, P28331, P25705, P30038, Q9NUJ1	0,05
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 5,7802692832868745				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	27	6,40	O75937, O75494, P41223, Q9UQ35, Q9Y333, P31943, Q6UN15, Q92620, Q08211, Q8N684, O00148, Q86U42, Q13151, Q9HCS7, A8MWD9, O75643, Q13247, Q9BUQ8, Q13838, P35637, P62318, Q12996, Q15366, Q15459, Q01130, O43447, P38159	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA processing	27	6,40	Q96MU7, O75494, Q9UQ35, Q9Y333, P31943, Q6UN15, Q92620, Q9UHX1, Q8N684, O00148, Q86U42, Q9HCS7, A8MWD9, O75643, Q13247, Q9BUQ8, Q13838, O43148, Q9UKV3, Q9H0S4, P62318, Q12996, Q15459, Q6L8Q7, Q01130, O43447, P38159	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	21	4,98	Q9HCS7, A8MWD9, O75643, Q96MU7, Q13247, O75494, Q9BUQ8, Q9UQ35, Q9Y333, P31943, Q13838, Q92620, Q9UKV3, Q9UHX1, Q9H0S4, P62318, O00148, Q15459, O43447, Q01130, P38159	0,00

## Annexes

UP_KEYWORDS	Spliceosome	13	3,08	Q92620, Q9HCS7, A8MWD9, O75643, P62318, Q9BUQ8, Q9UQ35, P31943, Q9Y333, Q15459, O43447, Q13838, P38159	0,02
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	16	3,79	Q9HCS7, O75643, Q13247, O75494, Q9BUQ8, P41223, Q9Y333, Q13838, Q92620, Q9UKV3, Q9UHX1, P62318, Q15459, O43447, Q01130, P38159	0,10
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	10	2,37	Q92620, Q9HCS7, O75643, P62318, Q9BUQ8, Q9UQ35, P31943, Q9Y333, Q15459, P38159	0,38
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005681~spliceosomal complex	9	2,13	A8MWD9, O75643, P62318, O00148, P41223, Q15459, O43447, Q01130, Q13838	2,04
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 4,735255183579933				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031124~mRNA 3'-end processing	10	2,37	Q9BY77, Q6UN15, Q92620, Q13247, Q8N684, O00148, Q12996, Q01130, Q86U42, Q13838	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006369~termination of RNA polymerase II transcription	11	2,61	Q9BY77, Q6UN15, Q92620, Q13247, P62318, Q8N684, O00148, Q12996, Q01130, Q86U42, Q13838	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	13	3,08	Q12769, Q96EE3, Q13247, O75494, Q9NUU7, Q13838, Q9BY77, Q6UN15, Q92620, P49790, O00148, P35658, Q01130	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006405~RNA export from nucleus	7	1,66	Q9BY77, Q92620, Q13247, O00148, P35658, Q01130, Q13838	3,65
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 4,730699162915877				
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	32	7,58	Q8TDZ2, P00367, P23368, Q00796, Q9BTZ2, P53004, P09622, P11586, P30837, P05091, O60568, O95831, Q9H845, P30041, P31040, P37268, Q6BCY4, Q13423, Q9NZ01, O15121, Q6IAN0, P50336, Q9P2T1, Q96LJ7, P49189, O75874, Q16881, P28331, P30038, Q6YN16, Q15067, Q53GQ0	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016491~oxidoreductase activity	18	4,27	Q8TDZ2, Q9NZ01, Q00796, P53004, P30837, Q6IAN0, P05091, O95831, P50336, P31040, Q9P2T1, Q96LJ7, Q16881, P30038, P37268, Q6YN16, Q53GQ0, Q6BCY4	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0055114~oxidation-reduction process	34	8,06	Q8TDZ2, P00367, P23368, Q00796, Q9H7Z7, Q9BTZ2, Q6UB35, P53004, P11586, O60568, O95831, P30041, P31040, Q9H3N1, P37268, Q6BCY4, Q13423, Q9NZ01, O43396, O15121, Q9Y241, A1X283, Q8IZ83, Q6IAN0, P50336, P99999, Q9P2T1, Q96LJ7, P49189, O43169, Q16881, P30038, Q6YN16, Q53GQ0	0,02
UP_KEYWORDS	NADP	14	3,32	Q8TDZ2, Q9NZ01, P00367, Q9BTZ2, P53004, Q6IAN0, P11586, Q9P2T1, O75874, Q16881, P37268, Q6YN16, Q53GQ0, Q13423	0,17
INTERPRO	IPR016040:NAD(P)-binding domain	14	3,32	P00367, P23368, Q00796, Q9BTZ2, P53004, Q6UB35, Q6IAN0, P11586, P50336, O43865, Q96LJ7, Q6YN16, Q53GQ0, Q13423	0,29
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 4,32556844311184				
INTERPRO	IPR011545:DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal	13	3,08	O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21	0,00
INTERPRO	IPR001650:Helicase, C-terminal	15	3,55	P51531, O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, Q14839, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21	0,00
SMART	SM00490:HELICc	15	3,55	P51531, O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, Q14839, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21	0,00
INTERPRO	IPR014001:Helicase, superfamily 1/2, ATP-binding domain	15	3,55	P51531, O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, Q14839, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21	0,00
SMART	SM00487:DEXDc	15	3,55	P51531, O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, Q14839, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21	0,00
UP_KEYWORDS	Helicase	16	3,79	P51531, O75643, Q8TDD1, Q14839, Q9BUQ8, P46063, Q9NUU7, Q13838, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8N3C0, O00148, Q5H9U9, Q8IY21, Q9Y265	0,00
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase C-terminal	13	3,08	P51531, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8TDD1, Q14839, O00148, Q9BUQ8, Q5H9U9, P46063, Q8IY21, Q9NUU7, Q13838	0,00
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase ATP-binding	13	3,08	P51531, Q92620, Q08211, Q9H0S4, Q8TDD1, Q14839, O00148, Q9BUQ8, Q5H9U9, P46063, Q8IY21, Q9NUU7, Q13838	0,01
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004004~ATP-dependent RNA helicase activity	9	2,13	Q92620, Q08211, Q9H0S4, O75643, Q8TDD1, Q9BUQ8, O00148, Q9NUU7, Q13838	0,25



Annexes

GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008026~ATP-dependent helicase activity	6	1,42	Q92620, Q08211, O75643, Q9BUQ8, Q14839, P46063	0,89
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004386~helicase activity	9	2,13	P51531, P04083, Q08211, Q9H0S4, O75643, Q9BUQ8, Q5H9U9, Q8IY21, Q9NUU7	1,54
INTERPRO	IPR014014:RNA helicase, DEAD-box type, Q motif	6	1,42	Q9H0S4, Q8TDD1, Q9BUQ8, O00148, Q9NUU7, Q13838	1,97
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:Q motif	6	1,42	Q9H0S4, Q8TDD1, Q9BUQ8, O00148, Q9NUU7, Q13838	2,23
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010501~RNA secondary structure unwinding	6	1,42	Q9H0S4, Q8TDD1, Q9BUQ8, O00148, Q9NUU7, Q13838	6,99
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 3,9627473666089443				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	22	5,21	P46776, Q9H8H0, Q9NXF1, P62750, P46779, P05388, Q07020, Q9BVJ6, O00567, P48730, Q9NPD3, P32969, Q8IWA0, Q9UNX4, O60832, P62861, Q9H0S4, P61247, P62241, P78346, P23396, P26373	0,00
UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	23	5,45	Q9NYK5, Q13151, A8MWD9, P46776, P62750, O75643, P46779, P05388, Q07020, O00567, Q9Y333, P31943, P32969, O60832, P62861, Q9UHX1, P62318, P61247, P62241, P23396, Q15366, P26373, P38159	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	17	4,03	Q8NE71, P46776, O14602, P62750, P46779, O75821, P05388, Q14152, Q07020, Q14232, P32969, P62861, P61247, P62241, P23396, P26373, P56537	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	15	3,55	Q12769, Q96EE3, P46776, P62750, P46779, P05388, Q07020, P32969, P62861, P49790, P61247, P62241, P35658, P23396, P26373	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	12	2,84	Q9Y5M8, P62861, P46776, P62750, P05388, P46779, P61247, Q07020, P62241, P23396, P26373, P32969	0,03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	13	3,08	Q8NE71, P27824, P62861, P46776, P62750, P05388, P46779, P61247, Q07020, P62241, P23396, P26373, P32969	0,66
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	17	4,03	Q8NE71, P46776, Q13310, P62750, P46779, P05388, Q07020, Q9UBX3, P32969, Q6NUK1, P62861, Q00325, P61247, P62241, P49591, P23396, P26373	0,87
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	11	2,61	P62861, P46776, P62750, P05388, P46779, P61247, Q07020, P62241, P23396, P26373, P32969	1,15
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	12	2,84	Q9NYK5, P62861, P46776, P62750, P05388, P46779, P61247, Q07020, P62241, P23396, P26373, P32969	2,10
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003735~structural constituent of ribosome	14	3,32	P46776, P62750, P46779, P05388, Q07020, Q9UBX3, P32969, Q6NUK1, P62861, Q00325, P61247, P62241, P23396, P26373	4,45
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	7	1,66	P46776, P62750, P05388, P46779, Q07020, P26373, P32969	6,50
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 3,5943663434873545				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003924~GTPase activity	18	4,27	P08754, P62820, P07437, Q03113, Q9UHD8, P62070, Q3ZCM7, P50570, P50148, P23258, P04899, P11233, P62873, P62879, O00429, P36639, P63096, P29992	0,09
UP_KEYWORDS	GTP-binding	20	4,74	P08754, P07437, P62820, Q9Y5M8, P00367, Q9Y5P6, Q03113, Q9UHD8, P62070, Q3ZCM7, P50570, P23258, P50148, P04899, P11233, O00429, Q9P0V9, P63096, P29992, Q16181	0,13
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:GTP	18	4,27	P08754, P07437, P62820, Q9Y5M8, Q03113, Q9UHD8, P62070, Q3ZCM7, P50570, P50148, P23258, P04899, P11233, O00429, Q9P0V9, P63096, P29992, Q16181	0,48
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005525~GTP binding	20	4,74	P08754, P07437, P62820, Q9Y5M8, P00367, Q9Y5P6, Q03113, Q9UHD8, P62070, Q3ZCM7, P50570, P23258, P50148, P04899, P11233, O00429, Q9P0V9, P63096, P29992, Q16181	3,94
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 3,4572463109935976				

UP_KEYWORDS	RNA-binding	45	10,66	P62750, Q96MU7, O75494, O75534, Q9UQ35, P31943, Q9Y333, Q92804, Q9BY77, O43865, Q6UN15, O60832, Q08211, Q15424, Q9UHX1, Q8N684, O00148, Q9UNQ2, Q9HAV4, Q8IY21, P23396, Q86U42, Q6NZI2, Q13151, A8MWD9, Q13310, Q13247, Q8TDD1, O75821, Q14152, Q96EP5, Q9NUU7, Q13838, Q9NPD3, O43148, Q9UKV3, P35637, Q9H0S4, P62318, Q5H9U9, P36639, Q15366, Q01130, P21399, P38159	0,00
INTERPRO	IPR012677:Nucleotide-binding, alpha-beta plait	18	4,27	Q13151, Q13310, P62750, Q13247, O75821, O75494, Q96EP5, P31943, Q92804, Q9BY77, Q9UKV3, Q15424, Q9UHX1, P35637, Q8N684, Q01130, P38159, Q86U42	0,14
SMART	SM00360:RRM	16	3,79	Q13151, Q13310, Q13247, O75821, O75494, Q96EP5, P31943, Q92804, Q9BY77, Q15424, Q9UHX1, P35637, Q8N684, Q01130, P38159, Q86U42	0,12
INTERPRO	IPR00504:RNA recognition motif domain	16	3,79	Q13151, Q13310, Q13247, O75821, O75494, Q96EP5, P31943, Q92804, Q9BY77, Q15424, Q9UHX1, P35637, Q8N684, Q01130, P38159, Q86U42	0,26
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0000166~nucleotide binding	20	4,74	Q9NYK5, Q13151, Q13310, P62750, Q13247, O75821, O75494, Q9Y5Y2, Q96EP5, P31943, Q92804, Q9BY77, Q9UKV3, Q15424, Q9UHX1, P35637, Q8N684, Q01130, P38159, Q86U42	1,29
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM	10	2,37	Q9BY77, Q15424, P35637, O75821, Q8N684, O75494, Q92804, Q01130, Q86U42, P38159	3,37
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 2,8386910006575805				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
UP_KEYWORDS	Cell division	22	5,21	Q99816, P08754, Q96EE3, Q16543, Q9UHD8, P18754, P48729, Q93008, Q8N3U4, P04899, Q6P1J9, Q7Z460, P11233, Q14683, Q15691, Q16513, Q9P0V9, Q9Y265, P63096, P23396, Q8IVT2, Q16181	0,08
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051301~cell division	22	5,21	Q99816, P08754, Q96EE3, P07437, Q16543, Q9UHD8, P18754, P27816, P48729, Q93008, Q8N3U4, P04899, Q6P1J9, Q7Z460, Q14683, Q15691, Q16513, Q9P0V9, Q9Y265, P63096, P23396, Q8IVT2	0,26
UP_KEYWORDS	Cell cycle	27	6,40	Q99816, Q96EE3, Q9UHD8, P12931, P51610, P04899, Q6P1J9, P11233, Q09028, Q9Y265, Q9P0V9, P63096, P23396, P16104, P08754, Q16543, P18754, P48729, Q8N3U4, Q93008, Q7Z460, P04156, Q14683, Q15691, Q16513, Q8IVT2, Q16181	1,31
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 2,5878622206320494				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
INTERPRO	IPR003593:AAA+ ATPase domain	11	2,61	P43686, Q8NE71, P06576, Q9NUQ8, P46459, Q8N3C0, Q15645, Q03518, Q9Y265, P55072, Q9Y276	1,42
SMART	SM00382:AAA	11	2,61	P43686, Q8NE71, P06576, Q9NUQ8, P46459, Q8N3C0, Q15645, Q03518, Q9Y265, P55072, Q9Y276	1,29
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016887~ATPase activity	13	3,08	P51531, P43686, Q8NE71, P06576, Q9NUQ8, Q9UKV3, P46459, O43681, O00148, P25705, Q9Y265, P55072, Q13838	2,50
INTERPRO	IPR003960:ATPase, AAA-type, conserved site	5	1,18	P43686, P46459, Q15645, P55072, Q9Y276	4,28
Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 2,511706194284925				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045454~cell redox homeostasis	11	2,61	P30041, O95831, P13667, O43396, Q9H3N1, Q8NBS9, Q16881, Q9H7Z7, P09622, Q9Y320, Q13423	0,03
UP_KEYWORDS	Redox-active center	7	1,66	P30041, P13667, O43396, Q9H3N1, Q8NBS9, Q16881, P09622	0,64
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005623~cell	10	2,37	P30041, O95831, P13667, O43396, Q9H3N1, Q8NBS9, Q16881, Q9H7Z7, Q9Y320, P21399	0,70
INTERPRO	IPR012336:Thioredoxin-like fold	11	2,61	P30041, P13667, Q92575, O43396, P26641, O00299, Q9H3N1, Q8NBS9, Q16881, Q9H7Z7, Q9Y320	1,00
INTERPRO	IPR013766:Thioredoxin domain	6	1,42	P30041, P13667, O43396, Q9H3N1, Q8NBS9, Q9Y320	3,13
INTERPRO	IPR017937:Thioredoxin, conserved site	4	0,95	P13667, O43396, Q9H3N1, Q8NBS9	8,76
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 2,504082631688525				

## Annexes

INTERPRO	IPR011989:Armadillo-like helical	17	4,03	P52294, Q13835, Q5VYK3, Q9NXF1, O14787, P14923, P63010, P78527, Q86VP6, Q6P3W7, Q7Z460, Q8NDA8, O95782, Q9HAV4, O60518, Q16537, Q9H3U1	0,07
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 7	6	1,42	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, Q86VP6	0,19
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 6	6	1,42	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, Q86VP6	0,58
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 5	6	1,42	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, Q86VP6	1,20
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 2	7	1,66	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, P78527, Q86VP6	2,06
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 1	7	1,66	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, P78527, Q86VP6	2,06
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 4	6	1,42	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, Q86VP6	3,08
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 3	6	1,42	Q7Z460, Q5VYK3, O14787, Q8NDA8, O60518, Q86VP6	5,94
Annotation Cluster 15	Enrichment Score: 2,4558906553684188				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000715~nucleotide-excision repair, DNA damage recognition	6	1,42	Q99627, Q9UNS2, Q13098, Q01831, P09874, Q9BT78	0,34
UP_SEQ_FEATURE	domain:PCI	5	1,18	Q99627, Q9UNS2, Q13098, Q14152, Q9BT78	0,91
UP_KEYWORDS	Signalosome	4	0,95	Q99627, Q9UNS2, Q13098, Q9BT78	1,25
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010388~cullin deneddylation	4	0,95	Q99627, Q9UNS2, Q13098, Q9BT78	1,86
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0008180~COP9 signalosome	6	1,42	Q99627, P62993, Q9UNS2, Q13098, P25705, Q9BT78	1,64
SMART	SM00088:PINT	4	0,95	Q9UNS2, Q13098, Q14152, Q9BT78	6,29
INTERPRO	IPR000717:Proteasome component (PCI) domain	4	0,95	Q9UNS2, Q13098, Q14152, Q9BT78	8,76
Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 2,4174746238182925				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
UP_KEYWORDS	FAD	10	2,37	Q8TDZ2, P50336, Q9H845, O95831, Q8NFF5, P31040, Q16881, P09622, Q15067, Q6BCY4	0,59
UP_KEYWORDS	Flavoprotein	10	2,37	Q8TDZ2, P50336, Q9H845, O95831, Q8NFF5, P31040, Q16881, P09622, Q15067, Q6BCY4	1,25
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:FAD	7	1,66	Q8TDZ2, P50336, O95831, P31040, Q16881, P09622, Q6BCY4	2,91
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0050660~flavin adenine dinucleotide binding	7	1,66	P50336, Q9H845, O95831, P31040, Q16881, P09622, Q15067	6,44
Annotation Cluster 20	Enrichment Score: 1,8114959847929697				
INTERPRO	IPR016163:Aldehyde dehydrogenase, C-terminal	5	1,18	P49189, P30038, Q8IZ83, P30837, P05091	1,10
INTERPRO	IPR016162:Aldehyde dehydrogenase, N-terminal	5	1,18	P49189, P30038, Q8IZ83, P30837, P05091	1,10
INTERPRO	IPR016161:Aldehyde/histidinol dehydrogenase	5	1,18	P49189, P30038, Q8IZ83, P30837, P05091	1,10

Annexes

INTERPRO	IPR015590:Aldehyde dehydrogenase domain	5	1,18	P49189, P30038, Q8IZ83, P30837, P05091	1,10
KEGG_PATHWAY	hsa00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	8	1,90	Q86V21, P80404, P49189, P22033, P09110, P09622, P30837, P05091	1,69
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:NAD	8	1,90	P00367, P23368, P49189, P30038, P09622, P30837, Q13423, P05091	2,24
UP_SEQ_FEATURE	site:Transition state stabilizer	5	1,18	P49189, P30038, P31939, P30837, P05091	3,09
KEGG_PATHWAY	hsa00620:Pyruvate metabolism	7	1,66	Q9NR19, Q13085, P23368, P49189, P09622, P30837, P05091	3,56
INTERPRO	IPR016160:Aldehyde dehydrogenase, conserved site	4	0,95	P49189, P30038, P30837, P05091	7,38
Annotation Cluster 21	Enrichment Score: 1,803448282441526				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0072583~clathrin-mediated endocytosis	5	1,18	O75146, P27824, O95782, P63010, Q96CW1	2,12
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019886~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	9	2,13	P27824, Q13409, Q14203, P50570, O95782, Q9Y6Q5, P63010, Q96CW1, Q07866	3,12
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0050690~regulation of defense response to virus by virus	5	1,18	P06241, O95782, Q9Y6Q5, P63010, Q96CW1	7,48
KEGG_PATHWAY	hsa04721:Synaptic vesicle cycle	8	1,90	P61421, P46459, P50570, O95782, P63010, P21283, P21281, Q96CW1	8,83
Annotation Cluster 23	Enrichment Score: 1,7575832588316702				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006418~tRNA aminoacylation for protein translation	7	1,66	Q9NYK5, Q9H2U2, P47897, Q9NSE4, P49591, P54136, Q6PI48	0,67
UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	11	2,61	P26641, O14602, O75821, P47897, Q9NSE4, Q14152, P49591, P54136, P56537, Q14232, Q6PI48	1,60
UP_KEYWORDS	Aminoacyl-tRNA synthetase	5	1,18	P47897, Q9NSE4, P49591, P54136, Q6PI48	9,64
Annotation Cluster 27	Enrichment Score: 1,6888326851766982				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016925~protein sumoylation	11	2,61	Q12769, Q96EE3, Q02880, P11388, P49790, Q14683, P46060, Q01831, P09874, P35658, Q8N3U4	1,01
UP_KEYWORDS	Nuclear pore complex	6	1,42	Q12769, Q96EE3, P49790, O00159, P35658, Q9NUU7	4,67
UP_KEYWORDS	mRNA transport	8	1,90	Q9BY77, Q12769, Q96EE3, P49790, O00159, P35658, Q9NUU7, Q13838	8,10
UP_KEYWORDS	Translocation	7	1,66	Q12769, Q96EE3, Q15629, P49790, O00159, P35658, Q9NUU7	9,85
Annotation Cluster 41	Enrichment Score: 1,2573202503794245				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR

Annexes

GOTERM_MF_DIRECT	GO:0046961~proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	5	1,18	P06576, P61421, P25705, P21283, P21281	4,84
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016241~regulation of macroautophagy	6	1,42	Q96A65, P61421, Q9Y371, P21283, O75436, P21281	6,99
INTERPRO	IPR004100:ATPase, alpha/beta subunit, N-terminal	3	0,71	P06576, P25705, P21281	7,10
INTERPRO	IPR020003:ATPase, alpha/beta subunit, nucleotide-binding domain, active site	3	0,71	P06576, P25705, P21281	7,10
INTERPRO	IPR000194:ATPase, F1/V1/A1 complex, alpha/beta subunit, nucleotide-binding domain	3	0,71	P06576, P25705, P21281	7,10
Annotation Cluster 44	Enrichment Score: 1,1818723251959624				
INTERPRO	IPR011025:G protein alpha subunit, helical insertion	6	1,42	P08754, Q03113, P50148, P63096, P04899, P29992	0,03
INTERPRO	IPR001019:Guanine nucleotide binding protein (G-protein), alpha subunit	6	1,42	P08754, Q03113, P50148, P63096, P04899, P29992	0,03
SMART	SM00275:SM00275	6	1,42	P08754, Q03113, P50148, P63096, P04899, P29992	0,03
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0019001~guanyl nucleotide binding	5	1,18	Q03113, P50148, P63096, P04899, P29992	0,06
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0031683~G-protein beta/gamma-subunit complex binding	6	1,42	P08754, Q03113, P50148, P63096, P04899, P29992	0,14
UP_KEYWORDS	ADP-ribosylation	8	1,90	P08754, P00367, P50148, P63096, P09874, Q92804, P04899, P29992	0,40
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004871~signal transducer activity	14	3,32	P08754, Q13835, Q03113, P51178, P50148, P14923, P42226, P04899, P62873, Q05397, P62879, Q5T9L3, P63096, P29992	2,13
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0044297~cell body	7	1,66	P07437, P62873, P62879, P46779, P50148, P21964, P04899	4,48
KEGG_PATHWAY	hsa04540:Gap junction	10	2,37	P08754, P07437, P12931, P62993, Q3ZCM7, P50148, P63096, P04899, P48730, P29992	5,29
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007213~G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	4	0,95	P62873, P50148, P04899, P29992	8,71
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005834~heterotrimeric G-protein complex	5	1,18	P08754, Q03113, P62873, P63096, P04899	9,12
Annotation Cluster 45	Enrichment Score: 1,130842109845297				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005777~peroxisome	9	2,13	Q9Y411, O75874, Q92538, O00429, Q13011, Q9BTZ2, P09110, Q6YN16, Q15067	3,85
UP_KEYWORDS	Peroxisome	8	1,90	O75874, O00429, Q13011, Q9BTZ2, P09110, O60488, Q6YN16, Q15067	5,07
Annotation Cluster 47	Enrichment Score: 1,0409796668357396				

GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000502~proteasome complex	7	1,66	O43396, P43686, P25788, Q5VYK3, P25789, P55072, Q99436	3,51
UP_KEYWORDS	Proteasome	6	1,42	O43396, P43686, P25788, Q5VYK3, P25789, Q99436	5,98

**Effets spécifiques des QDs vieilliss :**

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 25,96532179213275				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	60	9,43	P46940, Q9UPN3, Q01082, P42224, Q9NR46, P62750, O00571, P35221, Q9H6S3, P55196, Q6Y7W6, P11142, P15311, P62424, O60716, Q9Y266, P42566, Q9Y446, Q15019, Q9H2G2, Q04637, Q86W92, Q16643, Q13813, P08238, P62258, P63244, Q14C86, A0FGR8, Q8NC51, Q99439, Q96TA1, Q9HC38, Q14160, Q9UDY2, P25685, P54136, Q9COC2, P51610, Q86UP2, Q13492, P33176, P46109, O14530, Q6PKG0, P11021, P53990, Q07157, O60437, P35613, Q92817, Q9Y371, Q9NYL9, O60763, Q32MZ4, O75874, PODMV8, P68431, Q6IBS0, Q6WCQ1	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	61	9,59	P46940, Q9UPN3, Q01082, P42224, Q9NR46, P62750, O00571, P35221, Q9H6S3, P55196, Q6Y7W6, P11142, P15311, P62424, O60716, P22223, Q9Y266, P42566, Q9Y446, Q15019, Q9H2G2, Q04637, Q86W92, Q16643, Q13813, P08238, P62258, P63244, Q14C86, A0FGR8, Q8NC51, Q99439, Q96TA1, Q9HC38, Q14160, Q9UDY2, P25685, P54136, Q9COC2, P51610, Q86UP2, Q13492, P33176, P46109, O14530, Q6PKG0, P11021, P53990, Q07157, O60437, P35613, Q92817, Q9Y371, Q9NYL9, O60763, Q32MZ4, O75874, PODMV8, P68431, Q6IBS0, Q6WCQ1	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	55	8,65	P46940, Q9UPN3, Q01082, Q9NR46, P42224, P62750, O00571, Q9H6S3, P55196, Q6Y7W6, P11142, P62424, Q9Y266, P42566, Q15019, Q9H2G2, Q04637, Q16643, Q86W92, Q13813, P08238, P62258, P63244, Q14C86, A0FGR8, Q8NC51, Q99439, Q96TA1, Q9HC38, Q9UDY2, P25685, P54136, Q9COC2, P51610, Q86UP2, Q13492, P33176, P46109, O14530, Q6PKG0, P11021, P53990, Q07157, O60437, P35613, Q92817, Q9Y371, Q9NYL9, O60763, Q32MZ4, O75874, PODMV8, P68431, Q6IBS0, Q6WCQ1	0,00
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 19,134757109758045				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005739~mitochondrion	134	21,07	Q12906, P24752, Q96QK1, P42126, Q3ZCQ8, Q99714, P21964, Q9H845, O75146, P17900, Q6P587, P80404, Q9Y696, P38606, O43488, Q92538, Q16822, P08559, Q96HS1, Q96FJ2, O15121, Q9H6R4, O43837, O00217, Q9H061, P22570, P04181, Q6VP21, P42704, Q6NVY1, P08238, P09211, Q07812, P62258, P10599, P82930, P63244, P82933, Q16539, P23368, Q9NS69, P04040, P54136, P29728, Q99832, P61221, P51398, P30044, P11021, P35914, P27695, O94826, O75489, P35613, P63167, Q9Y371, P19367, Q13084, Q13085, P31937, O75874, O75608, P55084, P07954, P30038, Q99798, O75306, P31689, P36551, P17174, Q07021, P30153, Q9ULZ3, P48735, P16435, P61604, Q96I99, P13804, P51572, P36542, P25325, Q96C36, P83111, Q9P0J0, Q9NX14, P56385, Q02218, P38646, P11177, O00116, P21980, P49662, P23919, Q96C86, Q9H974, P28331, Q16881, Q9Y277, Q16698, Q9UIJ7, Q96TA2, Q9HC38, Q9Y6C9, O95202, P00505, P36776, O95571, P51610, O95479, P05141, Q9BYD6, P23786, Q9BWD1, O60437, Q9Y2Z4, P00390, Q96RP9, Q9NQR4, O94925, P54652, P54886, P07203, Q9Y2Q3, Q15046, Q92552, Q9Y5Z4, Q9H3D4, P48047, PODMV8, P30084, P21397, O75947, Q9Y3D9, Q9Y3D6	0,00
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	101	15,88	P24752, P42126, Q3ZCQ8, O00571, Q99714, Q9H845, Q6P587, P80404, P54819, Q9Y696, P52789, Q7Z2W9, Q16822, P08559, Q96HS1, O15121, P41250, O43837, O00217, Q9H061, P22570, P04181, Q6NVY1, P42704, Q07812, P09211, P82930, P82933, P23368, Q9NS69, P29728, P61221, P51398, P30044, P35914, P27695, O94826, O75489, P63167, Q9Y371, P19367, Q13505, Q13084, P31937, P55084, Q16718, P07954, P30038, Q99798, O75306, P31689, P36551, Q07021, Q9ULZ3, P30405, P48735, P61604, Q96I99, P13804, P36542, P25325, Q96C36, P83111, Q9P0J0, Q9NX14, P56385, Q02218, P38646, P11177, P49662, P28331, Q9H974, Q9Y277, Q96TA2, Q9UIJ7, Q16698, Q9HC38, Q9Y6C9, O95202, P00505, P36776, O95571, P05141, Q9BYD6, P23786, O60437, Q9Y2Z4, O94925, Q96RP9, P00390, P54886, Q15046, Q92552, Q9Y5Z4, Q14318, P48047, P30084, P21397, O75947, Q9Y3D9, Q9Y3D6	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	49	7,70	P24752, Q16698, P23368, P34931, Q9UIJ7, P42126, Q07021, Q99714, P00505, P30405, P36776, P48735, Q8N163, O95571, P61221, P61604, P30044, P80404, Q96I99, Q16822, P13804, P36542, P08559, P35914, O75489, Q9Y2Z4, Q96C36, P00390, O94925, Q96RP9, O43837, P41250, O00217, Q02218, P07203, P22570, P04181, Q9Y2Q3, Q15046, P11177, P31937, Q6NVY1, P23919, P30084, P28331, P07954, P30038, Q99798, O75306	0,00
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	53	8,33	P24752, P36551, P42126, Q3ZCQ8, Q07021, P48735, P30405, Q9H845, P80404, Q96I99, P13804, Q7Z2W9, Q16822, P08559, P36542, P83111, Q9NX14, O43837, O00217, Q02218, P22570, P38646, P11177, P42704, Q6NVY1, P28331, P82933, P23368, Q16698, O95202, P36776, P00505,	0,00

				O95571, P51398, P30044, Q9BYD6, P23786, P35914, Q9Y2Z4, O75489, O94925, Q96RP9, P00390, Q13084, P31937, P48047, P30084, P55084, Q96AB3, P30038, P07954, Q99798, O75306	
UP_KEYWORDS	Transit peptide	55	8,65	P24752, P36551, P42126, Q3ZCQ8, Q07021, P48735, P30405, Q9H845, Q6P587, P80404, Q96I99, P13804, Q7Z2W9, Q16822, P08559, P36542, P83111, Q9NX14, O43837, O00217, Q02218, P22570, P38646, P04181, O00116, P11177, P42704, Q6NVY1, P28331, P82933, P23368, Q16698, O95202, P36776, P00505, O95571, P51398, P30044, Q9BYD6, P23786, P35914, Q9Y2Z4, O75489, O94925, Q96RP9, P00390, Q13084, P31937, P48047, P30084, P55084, P30038, P07954, Q99798, O75306	0,00
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 7,834140249733883				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	33	5,19	P36578, Q7L2H7, P62750, P46778, P46779, Q14240, P27635, P63173, P61221, P62249, Q6PKG0, P62424, P62857, P49770, P61247, P62851, O14602, P05386, Q9NR50, Q04637, P60842, Q14232, Q9Y262, Q13347, P11940, P62888, O60841, O15372, O15371, P05198, P26373, P39023, P62847	0,00
UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	37	5,82	P36578, P62750, P46778, P47974, P46779, Q15349, P62306, P27635, P63173, P62249, P51398, Q9BYD6, P62424, P62857, P61247, Q7Z2W9, Q00839, Q9BUJ2, P09651, P62851, Q9Y4Y9, P61011, P05386, Q9UKF6, P62312, Q13084, P62314, Q92552, P62888, Q9UKM9, P82930, P08621, P82933, Q9Y3D9, P26373, P39023, P62847	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	23	3,62	P36578, P63151, P05386, P62750, P46778, P46779, P30153, Q04637, P27635, P63173, P62249, P11940, P62888, P62424, Q9Y5S9, P61247, P62857, P61326, Q92900, P62851, P26373, P39023, P62847	0,00
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	25	3,93	P36578, P62750, P46778, P46779, Q15349, P27635, P63173, P62249, P51398, Q9BYD6, P62424, P62857, P61247, Q7Z2W9, P62851, P05386, Q13084, Q92552, P62888, P82930, P82933, Q9Y3D9, P26373, P62847, P39023	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	19	2,99	P36578, P61011, P62750, P05386, P46778, P46779, P27635, P63173, P62249, P62888, P62424, P61247, P62857, Q9UNL2, P62851, P26373, Q9UGP8, P39023, P62847	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	24	3,77	P27695, P36578, P05386, P62750, P46778, P46779, Q15349, P27635, P63173, P62249, Q92552, P62888, P62424, P61247, P82930, P62857, Q7Z2W9, P05198, P82933, Q9Y3D9, P62851, P26373, P39023, P62847	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	20	3,14	Q96EE3, P36578, Q8WUM0, P05386, P62750, P46778, P46779, P27635, P63173, P62249, P62888, P62424, O75694, P61247, P62857, Q7Z3B4, P62851, P26373, P39023, P62847	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	25	3,93	P36578, Q9NR30, P62750, Q9Y2L1, P05386, P46778, Q9H6R4, P46779, P27635, Q14690, P63173, P62249, P42285, P62888, Q14137, P62424, P62857, P61247, Q9Y3A5, P26373, P62851, P39023, Q13895, Q92979, P62847	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	25	3,93	P36578, Q9Y2Z4, P05386, P62750, P46778, P46779, Q04637, P27635, P63173, P62249, P05141, Q13084, Q9BYD6, P62888, P62424, Q9NSD9, P61247, P62857, Q7Z2W9, P82933, Q9Y3D9, P62851, P26373, P39023, P62847	0,03
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	12	1,89	P36578, Q9BYD6, P62888, P05386, P62750, P62424, P46778, P46779, P27635, P26373, P39023, P63173	0,03
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003735~structural constituent of ribosome	23	3,62	P36578, P05386, P62750, P46778, P46779, P27635, P63173, P62249, P05141, Q13084, P51398, Q9BYD6, P62888, P62424, P61247, P82930, P62857, Q7Z2W9, P82933, Q9Y3D9, P26373, P39023, P62847	0,04
KEGG_PATHWAY	hsa03010:Ribosome	20	3,14	P36578, P05386, P62750, P46778, P46779, P27635, P63173, P62249, Q13084, Q9BYD6, P62888, P62424, P61247, P62857, Q7Z2W9, P82933, P62851, P26373, P39023, P62847	0,28
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 7,244855999880749				
UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	107	16,82	P51531, O75351, P52701, O00571, P49915, Q9Y5Y2, Q9Y4I1, P11142, P54819, P38606, P52789, Q16822, Q8IY21, Q00839, P68104, Q9H2K8, Q13464, Q92526, P17844, P54577, P41250, P60842, P08238, P08237, Q96BM9, O95786, Q9NSD9, P61586, Q16539, P62256, Q08AF3, Q9Y6G9, P34931, Q9UQ16, P54136, P29728, Q14166, Q99832, P62195, P10644, P61221, P00492, P08243, Q3YEC7, P17980, P11021, P61225, Q92900, P63279, P17066, Q86V21, P61088, Q14936, P19367, Q13085, Q92499, Q16512, Q92599, Q8NB16, Q3LXA3, Q14240, P08134, Q13188, Q6DD88, Q9Y3I0, Q96I99, Q15382, Q9Y285, P61011, Q9H2G2, Q15019, P28288, P38646, P23919, O43143, O60841, P62191, Q9Y277, Q96TA2, Q9UII7, Q9BST9, Q15349, Q03519, P36776, P30085, P11908, P33176, P42285, P07900, P48643, Q8NHH9, P48506, Q9NR30, P00966, Q9Y2Z4, Q96RP9, P54652, P54886, P27448, Q15046, P33991, Q9Y3L5, Q14204, P54707, P0DMV8, P62333, P43246	0,00
UP_KEYWORDS	ATP-binding	84	13,21	P51531, Q8NB16, Q3LXA3, P52701, O75351, O00571, P49915, Q9Y5Y2, Q14240, Q13188, Q9Y4I1, P11142, P54819, P38606, P52789, Q9Y3I0, Q8IY21, Q00839, Q9Y285, Q9H2K8, Q13464, Q9H2G2, P17844, P41250, Q92526, P54577, P28288, P38646, P60842, P08238, P23919, P08237, O43143, O95786, Q9NSD9, P62256, Q16539, P62191, Q08AF3, Q9Y6G9, P34931, Q96TA2, Q15349, Q03519, P36776, P30085, P29728, P54136, Q14166,	0,00

				Q99832, P62195, P61221, P11908, P33176, P42285, P07900, P08243, P48643, P17980, P11021, P63279, P48506, Q92900, P17066, Q86V21, Q9NR30, P00966, Q9Y2Z4, P61088, P54652, O14936, P54886, P19367, P27448, P33991, Q15046, Q13085, Q92499, Q14204, P54707, PODMV8, P62333, Q16512, P43246	
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	97	15,25	P51531, Q12905, O75351, P52701, O00571, Q9Y5Y2, P49915, Q9Y411, P11142, P54819, P38606, P52789, Q8IY21, Q00839, Q9NTI5, Q9H2K8, Q13464, Q92526, P17844, P54577, P41250, P60842, P08238, P08237, O95786, Q9NSD9, P62256, Q16539, Q08AF3, Q9Y6G9, P34931, P54136, P29728, Q14166, Q99832, P62195, P61221, P08243, P17980, P11021, Q92900, P63279, P17066, Q86V21, P61088, O14936, P19367, Q13085, Q92499, Q61BS0, Q16512, Q8NB16, P31689, Q3LXA3, Q14240, Q13188, P61604, Q9Y3I0, Q96199, P05026, Q9Y285, Q9P0J0, Q9H2G2, P28288, P21281, P38646, P21980, Q9UHY1, P23919, O43143, P62191, Q96TA2, Q9UIJ7, Q15349, Q03519, P36776, P30085, P11908, P33176, P07900, P42285, P48643, P49770, P48506, Q9NR30, P00966, Q9Y2Z4, P54652, P54886, P27448, Q15046, P33991, Q14204, P54707, PODMV8, P62333, P43246	0,00
INTERPRO	IPRO27417:P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	61	9,59	P46940, P51531, P52701, O75351, O00571, Q14240, Q9Y5Y2, P08134, Q6DD88, Q9Y411, P54819, P38606, Q15382, Q8IY21, Q00839, Q9BUJ2, P68104, P61011, Q15019, P17844, P28288, P21281, P60842, Q96BM9, P23919, O43143, O95786, O60841, P61586, P62191, Q08AF3, Q9Y6G9, Q9UIJ7, Q96TA2, Q9UQ16, Q03519, P36776, Q9UDY2, P30085, P62195, P61221, P33176, P51398, P42285, Q3YEC7, Q5K651, P17980, Q8NHH9, P61225, Q92900, Q07157, Q9NR30, Q96RP9, O14936, P33991, Q92499, Q9Y3L5, Q14204, P62333, P43246, Q92599	0,00
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	52	8,18	P51531, P52701, Q3LXA3, O75351, O00571, P49915, Q14240, Q9Y5Y2, Q13188, Q9Y411, P54819, P38606, Q8IY21, Q00839, Q9H2K8, Q13464, Q9H2G2, P17844, P41250, P28288, P60842, P08237, P23919, O95786, O43143, Q16539, P62191, Q08AF3, Q9Y6G9, Q96TA2, Q15349, Q03519, P36776, P30085, P62195, P11908, P33176, P42285, P17980, Q92900, Q9NR30, P00966, O14936, P27448, P33991, Q13085, Q15046, Q92499, Q14204, P62333, Q16512, P43246	0,79
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 6,963486490457726				
UP_KEYWORDS	Chaperone	25	3,93	Q15185, P31689, Q9BTW9, P54652, Q16576, P25685, Q92526, Q08752, P38646, Q99832, P61221, P61604, P11142, P07900, Q8TAT6, P08238, Q86V81, PODMV8, P48643, P07237, O43765, P04792, O75832, Q9UGP8, Q9BS26	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006457~protein folding	24	3,77	Q9H173, P31689, Q14554, Q9BTW9, Q9H2J4, O95302, P30405, P25685, Q92526, Q08752, Q99832, Q9NZL4, P38646, P61604, P07900, P11142, P08238, Q14318, P10599, P48643, Q13724, Q96JJ7, Q9Y266, Q9BS26	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0051082~unfolded protein binding	18	2,83	Q9H173, Q15185, P31689, P34931, P54652, P25685, Q92526, P38646, Q99832, P61604, P11142, P07900, P08238, P48643, PODMV8, P11021, Q9Y266, P17066	0,00
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 6,96124930738582				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	51	8,02	P52895, P36551, Q99714, P48735, P16435, Q9H845, O43488, P15559, P08559, Q04828, O15121, O00625, Q14534, Q96C36, O43837, O00217, Q02218, P22570, P11177, Q15392, P52209, P07237, P28331, Q16881, O00767, Q8TC12, Q8N0U8, P23368, Q16850, Q16698, P04040, O95571, P16152, O95479, Q8IXB1, Q15738, P30044, P37268, O75489, Q6NUM9, P00390, P54886, Q49A26, P07203, P31937, O75874, O95864, P21397, P30038, P30519, O75306	0,00
UP_KEYWORDS	NADP	23	3,62	Q8TC12, Q16850, P52895, Q16698, Q96C36, Q6NUM9, Q14534, P00390, P48735, P04040, P54886, P22570, P16152, P16435, O95479, O75874, Q15392, O43488, P52209, Q16881, P15559, P37268, Q04828	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0055114~oxidation-reduction process	40	6,29	Q8N0U8, Q8TC12, P52895, P36551, P23368, Q16850, Q99714, P16152, P16435, Q8IXB1, O95479, Q15738, P30044, O43488, Q14739, P15559, P37268, Q04828, P27695, Q14554, O15121, O00625, Q14534, Q6NUM9, Q96C36, P00390, P54886, Q49A26, P22570, Q9Y2Q3, O00116, P31937, Q15392, P10599, O95864, P52209, Q16881, P21397, P30038, O00767	0,45
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 5,714074393845667				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	26	4,09	P68104, Q9Y285, Q7L2H7, O14602, Q9Y2Z4, Q96RP9, Q9NR50, Q04637, P54577, P41250, Q14240, P54136, Q9Y262, Q14232, P60842, Q13347, Q15046, Q6PKG0, O60841, O15372, Q9NSD9, O15371, O43324, P49770, P05198, P24534	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006446~regulation of translational initiation	13	2,04	Q7L2H7, Q04637, Q14240, P60842, Q14232, Q9Y262, Q13347, Q92499, O60841, O15372, O15371, P49770, P04792	0,00
UP_KEYWORDS	Initiation factor	14	2,20	Q7L2H7, O14602, Q9NR50, Q04637, Q14240, Q9Y262, P60842, Q14232, Q13347, O60841, O15372, O15371, P49770, P05198	0,00



Annexes

GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003743~translation initiation factor activity	14	2,20	Q7L2H7, O14602, Q9NR50, Q04637, Q14240, Q9Y262, P60842, Q14232, Q13347, O60841, O15372, O15371, P49770, P05198	0,00
KEGG_PATHWAY	hsa03013:RNA transport	29	4,56	Q96EE3, Q14974, Q96F07, Q14240, Q86V81, Q7L576, O75694, P49770, Q7Z3B4, Q9HAV4, Q92900, P63279, P68104, Q8WUM0, O14602, Q9Y3F4, Q9NR50, Q04637, Q86W42, P60842, Q14232, Q13347, P11940, O15372, O60841, Q9Y5S9, O15371, P05198, P61326	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005852~eukaryotic translation initiation factor 3 complex	7	1,10	P61221, Q13347, Q7L2H7, O15372, O15371, O00571, Q9Y262	0,02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0033290~eukaryotic 48S preinitiation complex	6	0,94	Q13347, Q7L2H7, O15372, O15371, P05198, Q9Y262	0,16
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071541~eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3m	4	0,63	Q13347, Q7L2H7, O15372, O15371	1,87
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016282~eukaryotic 43S preinitiation complex	5	0,79	Q13347, Q7L2H7, O15372, O15371, Q9Y262	2,05
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 5,413072519266369				
UP_KEYWORDS	mRNA processing	35	5,50	Q13595, Q12874, Q13573, Q07021, P62306, Q8N163, Q14498, P42285, P11142, Q86V81, Q16629, Q92945, Q00839, P09651, O43809, Q10570, Q9Y4Y9, Q9Y3F4, P55265, Q9UKF6, Q86W42, P17844, P62312, P11940, Q96DI7, P62314, Q92499, Q9UKM9, Q96C86, O43143, Q9Y5S9, P08621, Q53GS9, P61326, Q6NXG1	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	29	4,56	Q13595, Q12874, Q13573, Q07021, P62306, Q8N163, Q14498, P42285, P11142, Q86V81, Q16629, Q92945, Q00839, P09651, Q9Y4Y9, Q9Y3F4, P17844, Q86W42, P62312, P11940, Q96DI7, P62314, Q96C86, O43143, Q9UKM9, Q9Y5S9, Q53GS9, P61326, Q6NXG1	0,00
UP_KEYWORDS	Spliceosome	18	2,83	Q9Y4Y9, Q12874, Q13573, P62306, P17844, P62312, P11142, P11940, P42285, P62314, Q96DI7, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, Q53GS9, Q00839, P61326, P09651	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	26	4,09	Q13595, Q12874, Q13573, P62306, P42285, P11142, Q86V81, Q16629, Q00839, Q9BUJ2, O43809, P09651, Q10570, Q9Y4Y9, P17844, Q9UKF6, P62312, P11940, Q96DI7, P62314, O43143, Q9UKM9, Q9Y5S9, P08621, Q53GS9, P61326	0,00
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	23	3,62	P34931, Q13595, Q9Y4Y9, Q12874, Q13573, P54652, P62306, P17844, P62312, P11142, P62314, Q96DI7, O43143, Q86V81, Q16629, P0DMV8, Q9Y5S9, P08621, Q53GS9, P61326, Q00839, P09651, P17066	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	14	2,20	Q12874, Q13573, P62306, P17844, P42285, P11940, P62314, Q96DI7, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P61326, Q00839, P09651	0,02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008380~RNA splicing	17	2,67	Q12874, Q07021, P30153, P62306, Q86W42, Q8N163, P62312, Q14498, P62314, Q96DI7, O43143, Q16629, Q9Y5S9, Q92945, P08621, Q53GS9, Q6NXG1	0,65
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005681~spliceosomal complex	11	1,73	P62312, P11142, Q9Y4Y9, Q12874, Q13573, Q15382, P62306, P08621, Q8N163, Q53GS9, P09651	2,15
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006397~mRNA processing	16	2,52	Q9Y4Y9, Q12874, Q07021, P55265, Q8N163, Q14690, Q14498, O43143, Q16629, Q9Y5S9, Q92945, P08621, Q53GS9, O43809, P09651, Q6NXG1	3,98
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 4,675789843215963				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043488~regulation of mRNA stability	22	3,46	P27695, O43242, P25786, Q9Y2L1, P47974, Q04637, Q99460, P62195, P20618, P28074, P11142, P11940, P0DMV8, P17980, Q15008, Q92945, P62333, P04792, P62191, O75832, Q8NC51, P28066	0,00
UP_KEYWORDS	Proteasome	14	2,20	O43242, Q5VYK3, P25786, Q99460, Q9UMX0, Q9Y5K5, P62195, P28074, P20618, P17980, Q15008, P62333, P62191, P28066	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000502~proteasome complex	15	2,36	O43242, Q5VYK3, P25786, Q99460, Q9UMX0, P62195, P28074, P20618, Q15008, P17980, P62333, P04792, P62191, O75832, P28066	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0038061~NIK/NF-kappaB signaling	15	2,36	O43242, P25786, Q99460, P62195, P28074, P20618, P63208, Q15008, P17980, Q13616, P62333, P62191, O75832, P28066, Q04864	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006521~regulation of cellular amino acid metabolic process	13	2,04	P20618, P28074, O43242, P25786, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P15559, P62191, O75832, P28066, P62195	0,00

Annexes

GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051437~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in regulation of mitotic cell cycle transition	15	2,36	P20618, P28074, O43242, O43684, P25786, P63208, Q13616, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, O75832, P28066, P62195	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002479~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	13	2,04	P20618, P28074, O43242, P25786, P17980, Q15008, P01891, P62333, Q99460, P62191, O75832, P28066, P62195	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031145~anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	14	2,20	P20618, P28074, O43242, O43684, P25786, P17980, Q15008, Q13618, P62333, Q99460, P62191, O75832, P28066, P62195	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051436~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	13	2,04	P20618, P28074, O43242, O43684, P25786, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, O75832, P28066, P62195	0,02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022624~proteasome accessory complex	7	1,10	O43242, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, P62195	0,02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002223~stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	15	2,36	O43242, P25786, P61088, Q99460, P62195, P28074, P20618, P63208, Q15008, P17980, Q13616, P62333, P62191, O75832, P28066	0,05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0060071~Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	14	2,20	P20618, P28074, O43242, P25786, P61586, P17980, Q15008, O95782, P62333, Q99460, P62191, O75832, P28066, P62195	0,05
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0008540~proteasome regulatory particle, base subcomplex	6	0,94	P17980, P62333, Q99460, P62191, O75832, P62195	0,05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0090090~negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	18	2,83	O43242, P25786, Q99460, Q13188, Q03135, P62195, P20618, Q13547, P28074, O60716, Q15008, P17980, Q13618, P62333, Q16539, P62191, O75832, P28066	0,16
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0033209~tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	15	2,36	O43242, P42224, P25786, P05787, Q99460, Q9ULZ3, P62195, P28074, P20618, Q15008, P17980, P62333, P62191, O75832, P28066	0,17
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0090263~positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	15	2,36	Q96QK1, O43242, P25786, Q99460, Q8N163, Q03135, P62195, P28074, P20618, Q15008, P17980, P62333, P62191, O75832, P28066	0,21
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	11	1,73	P20618, P28074, O43242, P25786, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, P28066, P62195	0,17
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005838~proteasome regulatory particle	5	0,79	Q15008, Q99460, P62191, O75832, P62195	0,56
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000209~protein polyubiquitination	18	2,83	O43242, P25786, Q99460, Q7Z627, P62195, P20618, P28074, Q96PU5, P63208, P55786, Q13616, Q15008, P17980, P62333, Q13618, P62191, O75832, P28066	0,71
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0050852~T cell receptor signaling pathway	15	2,36	O43242, P25786, P61088, Q99460, P62195, P28074, P20618, P63208, Q15008, P17980, Q13616, P62333, P62191, O75832, P28066	1,77
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043161~proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	18	2,83	O43242, O43684, P25786, Q99460, P62195, P20618, P28074, Q96PU5, P63208, Q15008, P17980, Q13616, P62333, Q13618, P62256, P62191, O75832, P28066	2,13
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0038095~Fc-epsilon receptor signaling pathway	16	2,52	O43242, P25786, P61088, Q99460, P62195, P20618, P28074, PODP23, P63208, Q15008, P17980, Q13616, P62333, P62191, O75832, P28066	3,77

## Annexes

Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 3,5241078218250763				
KEGG_PATHWAY	hsa01200:Carbon metabolism	25	3,93	P24752, P23368, Q3LXA3, P17174, P00505, P48735, P04040, P29401, P11908, O95479, P52789, Q9BWD1, Q96I99, P08559, O43837, Q02218, P19367, P11177, Q6NVY1, P08237, O75874, P52209, P30084, P07954, Q99798	0,00
UP_KEYWORDS	Tricarboxylic acid cycle	8	1,26	P11177, O75874, Q96I99, P48735, P07954, O43837, Q99798, P08559	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006099~tricarboxylic acid cycle	9	1,42	P11177, O75874, Q96I99, P48735, P07954, O43837, Q02218, Q99798, P08559	0,01
KEGG_PATHWAY	hsa00020:Citrate cycle (TCA cycle)	10	1,57	P11177, O75874, Q96I99, Q16822, P48735, P07954, O43837, Q02218, Q99798, P08559	0,04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006103~2-oxoglutarate metabolic process	7	1,10	O75874, P17174, P00505, P48735, O43837, Q02218, Q6YP21	0,05
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0051287~NAD binding	8	1,26	P23368, P31937, O75874, P48735, O43837, Q49A26, P23526, O75306	0,63
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006102~isocitrate metabolic process	4	0,63	O75874, P48735, O43837, Q99798	0,80
KEGG_PATHWAY	hsa01210:2-Oxocarboxylic acid metabolism	6	0,94	O75874, P17174, P00505, P48735, O43837, Q99798	2,57
KEGG_PATHWAY	hsa01230:Biosynthesis of amino acids	12	1,89	P11908, P00966, O75874, P08237, Q96C36, P17174, P00505, P48735, O43837, P54886, Q99798, P29401	2,86
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 3,4671068269384766				
SMART	SM00250:PLEC	6	0,94	O60437, Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,00
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 2	6	0,94	O60437, Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,00
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 1	6	0,94	O60437, Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,00
INTERPRO	IPR001101:Plectin repeat	6	0,94	O60437, Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,00
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 7	5	0,79	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,02
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 6	5	0,79	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,02
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 4	5	0,79	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,02
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 5	5	0,79	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,02
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 3	5	0,79	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001, Q92817	0,02
SMART	SM00150:SPEC	7	1,10	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q92817, Q13813	0,24
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 9	4	0,63	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001	0,51
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 8	4	0,63	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001	0,51
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 10	4	0,63	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001	0,51
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 11	4	0,63	Q9UPN3, P15924, P58107, Q03001	0,51
INTERPRO	IPR018159:Spectrin/alpha-actinin	7	1,10	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q92817, Q13813	0,59
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 2	6	0,94	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q13813	1,99
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 1	6	0,94	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q13813	1,99

## Annexes

UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Central fibrous rod domain	3	0,47	P15924, Q03001, Q92817	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 16	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 17	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Globular 1	3	0,47	P15924, Q03001, Q92817	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 14	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Globular 2	3	0,47	P15924, Q03001, Q92817	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 15	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 12	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Plectin 13	3	0,47	Q9UPN3, P15924, P58107	9,36
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 3,2596958604528044				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030127~COPII vesicle coat	6	0,94	Q15437, O95487, Q15436, P53992, Q9Y3B3, O95486	0,02
INTERPRO	IPR006896:Sec23/Sec24, trunk domain	5	0,79	Q15437, O95487, Q15436, P53992, O95486	0,03
INTERPRO	IPR006900:Sec23/Sec24, helical domain	5	0,79	Q15437, O95487, Q15436, P53992, O95486	0,03
INTERPRO	IPR012990:Sec23/Sec24 beta-sandwich	5	0,79	Q15437, O95487, Q15436, P53992, O95486	0,03
INTERPRO	IPR006895:Zinc finger, Sec23/Sec24-type	5	0,79	Q15437, O95487, Q15436, P53992, O95486	0,03
COG_ONTOLOGY	Intracellular trafficking and secretion	11	1,73	Q15437, O00629, O95487, Q15436, Q14974, Q9NRW7, P52292, Q8TEX9, P53992, P51809, O95486	0,02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002474~antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	7	1,10	O95487, Q15436, P53992, P51572, P01891, Q03519, O95486	1,11
INTERPRO	IPR007123:Gelsolin domain	5	0,79	Q15437, O95487, Q15436, P53992, O95486	1,63
UP_KEYWORDS	ER-Golgi transport	10	1,57	Q15437, O95487, Q15436, O60763, P35606, P53992, P51572, Q13618, O95486, O43264	3,41
Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 3,045366059579948				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006986~response to unfolded protein	15	2,36	Q8TCJ2, Q9BUN8, P61604, P31689, P07900, P11142, Q96CS3, P34931, P08238, P54652, P25685, P07996, P04792, P17066, Q9BS26	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0051082~unfolded protein binding	18	2,83	Q9H173, Q15185, P31689, P34931, P54652, P25685, Q92526, P38646, Q99832, P61604, P11142, P07900, P08238, P48643, PODMV8, P11021, Q9Y266, P17066	0,00
INTERPRO	IPR018181:Heat shock protein 70, conserved site	7	1,10	P11142, P34931, PODMV8, P54652, P11021, P17066, P38646	0,01
INTERPRO	IPR013126:Heat shock protein 70 family	7	1,10	P11142, P34931, PODMV8, P54652, P11021, P17066, P38646	0,01
UP_KEYWORDS	Stress response	13	2,04	P61604, P07900, P11142, P34931, Q14011, P08238, PODMV8, P54652, P25685, Q16539, P04792, P17066, Q9BS26	0,08

Annexes

GOTERM_MF_DIRECT	GO:0031072~heat shock protein binding	9	1,42	P11142, P34931, Q12907, P08238, Q92769, P0DMV8, Q02218, P17066, Q08752	0,19
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042026~protein refolding	6	0,94	P07900, P11142, P34931, P0DMV8, P54652, P17066	0,24
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 3,002881522793542				
UP_KEYWORDS	Lipid biosynthesis	17	2,67	Q15185, Q01581, O15121, Q16850, Q6Y1H2, Q7L5N7, Q13085, Q15738, O00116, Q13907, Q15392, O95864, O00767, P48449, Q8NF37, P37268, Q8IU89	0,04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	9	1,42	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q14534, Q15392, Q14739, P48449, P37268	0,10
UP_KEYWORDS	Cholesterol biosynthesis	6	0,94	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q15392, P37268	0,31
UP_KEYWORDS	Cholesterol metabolism	9	1,42	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q15392, O75477, O15118, P37268, P22570	0,48
UP_KEYWORDS	Steroid biosynthesis	7	1,10	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q15392, P48449, P37268	0,89
UP_KEYWORDS	Sterol biosynthesis	6	0,94	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q15392, P37268	1,22
UP_KEYWORDS	Sterol metabolism	9	1,42	Q01581, Q15738, Q16850, Q13907, Q15392, O75477, O15118, P37268, P22570	1,43
UP_KEYWORDS	Steroid metabolism	10	1,57	Q01581, Q15738, P52895, Q16850, Q13907, Q15392, O75477, O15118, P37268, P22570	1,85
KEGG_PATHWAY	hsa00100:Steroid biosynthesis	6	0,94	Q15738, Q16850, Q14534, Q15392, P48449, P37268	5,51
Annotation Cluster 15	Enrichment Score: 2,8958046097144416				
Category	Term	Count	%	Genes	FDR
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	14	2,20	Q96EE3, Q8WUM0, Q10570, P52594, Q9UKF6, Q86W42, O75694, Q9Y5S9, Q16629, Q86V81, Q7Z3B4, P61326, Q92900, P82979	0,12
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031124~mRNA 3'-end processing	9	1,42	Q10570, Q86V81, Q16629, Q9Y5S9, Q9UKF6, Q86W42, P61326, O43809, P82979	0,71
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006369~termination of RNA polymerase II transcription	10	1,57	Q10570, Q86V81, Q16629, Q9Y5S9, P62306, Q9UKF6, Q86W42, P61326, O43809, P82979	0,85
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006405~RNA export from nucleus	8	1,26	O75694, Q86V81, Q16629, Q9Y5S9, Q86W42, P61326, P09651, P82979	6,20
Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 2,7772492049630806				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022624~proteasome accessory complex	7	1,10	O43242, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, P62195	0,02
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0008540~proteasome regulatory particle, base subcomplex	6	0,94	P17980, P62333, Q99460, P62191, O75832, P62195	0,05
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	11	1,73	P20618, P28074, O43242, P25786, P17980, Q15008, P62333, Q99460, P62191, P28066, P62195	0,17
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031597~cytosolic proteasome complex	5	0,79	P17980, P62333, P62191, Q9Y5K5, P62195	0,37
INTERPRO	IPR005937:26S proteasome subunit P45	4	0,63	P17980, P62333, P62191, P62195	1,17
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0036402~proteasome-activating ATPase activity	4	0,63	P17980, P62333, P62191, P62195	1,40

## Annexes

INTERPRO	IPR003960:ATPase, AAA-type, conserved site	6	0,94	Q96TA2, O75351, P17980, P62333, P62191, P62195	3,11
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031595~nuclear proteasome complex	4	0,63	P17980, P62333, P62191, P62195	2,91
SMART	SM00382:AAA	12	1,89	P61221, Q96TA2, O75351, P61011, Q14204, P17980, P36776, P62333, Q03519, P28288, P62191, P62195	3,38
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045899~positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	4	0,63	P17980, P62333, P62191, P62195	5,86
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0030163~protein catabolic process	7	1,10	O75503, P50897, P17980, P36776, P62333, P62191, P62195	5,88
Annotation Cluster 17	Enrichment Score: 2,7438169836260418				
INTERPRO	IPR012336:Thioredoxin-like fold	17	2,67	O94888, Q96CS3, Q9H2J4, Q14554, P07203, Q9Y2Q3, Q8IXB1, O14530, P30044, Q9Y696, P09211, P10599, P07237, O43324, Q16881, Q96JJ7, Q9BS26	0,01
UP_KEYWORDS	Redox-active center	10	1,57	P25325, Q8N0U8, Q8IXB1, Q14554, P30044, P00390, P10599, P07237, Q16881, Q96JJ7	0,02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045454~cell redox homeostasis	13	2,04	P27695, Q14554, P00390, P07203, Q8IXB1, O14530, P30044, P10599, Q16881, P07237, Q96JJ7, P48506, Q9BS26	0,04
INTERPRO	IPR013766:Thioredoxin domain	8	1,26	Q8IXB1, O14530, Q14554, P30044, P10599, P07237, Q96JJ7, Q9BS26	0,67
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0034976~response to endoplasmic reticulum stress	10	1,57	Q8IXB1, O94874, Q14554, P07237, P05198, P57088, Q9UMX0, P07996, Q96JJ7, Q9BS26	2,69
INTERPRO	IPR017937:Thioredoxin, conserved site	5	0,79	Q8IXB1, Q14554, P10599, P07237, Q96JJ7	3,54
Annotation Cluster 18	Enrichment Score: 2,541511794319901				
UP_KEYWORDS	FAD	13	2,04	Q9H845, O00116, Q3LXA3, Q15392, Q14534, Q6NUM9, P00390, Q16881, P13804, P21397, P15559, P22570, P16435	0,21
UP_KEYWORDS	Flavoprotein	13	2,04	Q9H845, O00116, Q3LXA3, Q15392, Q14534, Q6NUM9, P00390, Q16881, P13804, P21397, P15559, P22570, P16435	0,55
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:FAD	8	1,26	Q14534, Q15392, P00390, Q16881, P13804, P15559, P22570, P16435	5,53
Annotation Cluster 20	Enrichment Score: 2,2293690683880594				
INTERPRO	IPR011545:DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal	10	1,57	Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	0,85
SMART	SM00490:HELICc	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	1,81
UP_KEYWORDS	Helicase	13	2,04	P51531, Q9NR30, O00571, Q14240, P17844, P60842, P33991, P42285, Q92499, O43143, O95786, Q8IY21, Q92900	2,24
SMART	SM00487:DEXDc	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	2,08
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase C-terminal	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	3,74
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004004~ATP-dependent RNA helicase activity	9	1,42	Q9NR30, P42285, Q92499, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q92900, P60842	3,82
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase ATP-binding	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	5,51
INTERPRO	IPR001650:Helicase, C-terminal	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	5,90

## Annexes

INTERPRO	IPR014001:Helicase, superfamily 1/2, ATP-binding domain	11	1,73	P51531, Q9NR30, P42285, Q92499, O95786, O43143, O00571, P17844, Q14240, Q8IY21, P60842	6,70
Annotation Cluster 21	Enrichment Score: 2,2126864376302096				
KEGG_PATHWAY	hsa00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	11	1,73	Q01581, P24752, Q86V21, P80404, P31937, Q6NVY1, P30084, Q9BWD1, P55084, Q99714, P35914	0,31
KEGG_PATHWAY	hsa00650:Butanoate metabolism	7	1,10	Q01581, P24752, Q86V21, P80404, P30084, Q9BWD1, P35914	4,34
INTERPRO	IPR016039:Thiolase-like	4	0,63	Q01581, P24752, Q9BWD1, P55084	8,24
Annotation Cluster 22	Enrichment Score: 2,2123710819078224				
INTERPRO	IPR011989:Armado-like helical	22	3,46	Q9H173, Q96T76, O00629, Q9Y446, Q9NTI5, Q5VYK3, Q9BTW9, Q14974, Q9UIA9, Q8TEX9, P30153, Q9Y5L0, Q99460, Q9NZL4, Q15021, Q8TF05, O60716, Q08AM6, P52292, Q9HAV4, O95782, O43747	0,05
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 6	7	1,10	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	0,52
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 5	7	1,10	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	1,23
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 3	8	1,26	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q9BTW9, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	1,58
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 4	7	1,10	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	3,68
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 1	8	1,26	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q9BTW9, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	3,80
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 2	8	1,26	Q96T76, Q8TF05, Q5VYK3, Q14974, Q9BTW9, Q08AM6, Q8TEX9, P30153	3,80
Annotation Cluster 24	Enrichment Score: 2,1238582210597885				
KEGG_PATHWAY	hsa00250:Alanine, aspartate and glutamate metabolism	9	1,42	Q06210, P00966, P80404, P08243, Q9NQR4, O94925, P17174, P30038, P00505	0,78
UP_SEQ_FEATURE	binding site:Aspartate	3	0,47	P00966, P17174, P00505	4,89
Annotation Cluster 26	Enrichment Score: 2,099604558796067				
UP_SEQ_FEATURE	calcium-binding region:1	13	2,04	P0DP23, Q02818, P17655, Q9UPN3, P27482, Q03001, O95302, Q7L5N7, P80303, Q14257, Q8NF37, P42566, Q13813	1,28
UP_SEQ_FEATURE	domain:EF-hand 2	16	2,52	Q02818, Q9UPN3, P17655, Q03001, P60660, O95302, Q7L5N7, P80303, Q13813, P0DP23, P27482, Q96FQ6, Q8NF37, Q14257, P29034, P42566	1,39
UP_SEQ_FEATURE	domain:EF-hand 1	16	2,52	Q02818, Q9UPN3, P17655, Q03001, P60660, O95302, Q7L5N7, P80303, Q13813, P0DP23, P27482, Q96FQ6, Q8NF37, Q14257, P29034, P42566	1,39
UP_SEQ_FEATURE	calcium-binding region:2	12	1,89	Q02818, P0DP23, P17655, Q9UPN3, P27482, Q03001, O95302, Q7L5N7, P80303, Q14257, P42566, Q13813	2,19
INTERPRO	IPR018247:EF-Hand 1, calcium-binding site	15	2,36	Q02818, Q9UPN3, P17655, Q03001, O95302, Q7L5N7, O95202, P80303, Q13813, P0DP23, P27482, Q96FQ6, Q14257, P29034, P42566	4,92
SMART	SM00054:EFh	12	1,89	P0DP23, Q9UPN3, P27482, P60660, Q03001, O95302, Q7L5N7, P80303, Q14257, Q8NF37, P42566, Q13813	5,21
INTERPRO	IPR002048:EF-hand domain	17	2,67	Q02818, Q9UPN3, P17655, Q03001, P60660, O95302, O95202, Q7L5N7, P80303, Q13813, P0DP23, P27482, Q96FQ6, Q8NF37, Q14257, P29034, P42566	7,93
Annotation Cluster 27	Enrichment Score: 2,0764524787592467				
INTERPRO	IPR006115:6-phosphogluconate dehydrogenase, NADP-binding	3	0,47	P31937, P52209, Q49A26	5,38

## Annexes

GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004616~phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity	3	0,47	P31937, P52209, Q49A26	5,94
Annotation Cluster 28	Enrichment Score: 2,048566337119001				
UP_SEQ_FEATURE	repeat:ARM 4	6	0,94	O00629, Q9Y446, O60763, O60716, P52292, Q9NZL4	4,46
UP_SEQ_FEATURE	repeat:ARM 8	5	0,79	O00629, Q9Y446, O60763, O60716, P52292	7,56
UP_SEQ_FEATURE	repeat:ARM 3	6	0,94	O00629, Q9Y446, O60763, O60716, P52292, Q9NZL4	8,52
UP_SEQ_FEATURE	repeat:ARM 2	6	0,94	O00629, Q9Y446, O60763, O60716, P52292, Q9NZL4	9,55
SMART	SM00185:ARM	6	0,94	O00629, Q9Y446, O60763, Q14974, O60716, P52292	7,44
Annotation Cluster 29	Enrichment Score: 2,028103320352812				
UP_KEYWORDS	Aminotransferase	6	0,94	Q06210, P80404, P17174, P00505, P04181, Q6YP21	0,65
INTERPRO	IPR015424:Pyridoxal phosphate-dependent transferase	7	1,10	O15269, P80404, P17174, Q95470, P00505, P04181, Q6YP21	5,00
INTERPRO	IPR015421:Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 1	7	1,10	O15269, P80404, P17174, Q95470, P00505, P04181, Q6YP21	5,00
Annotation Cluster 32	Enrichment Score: 1,9918805503874084				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005643~nuclear pore	9	1,42	O00629, Q14974, Q8WUM0, P52594, O75694, Q9UIA9, P52292, Q8TEX9, P57088	4,71
SMART	SM00185:ARM	6	0,94	O00629, Q9Y446, O60763, Q14974, O60716, P52292	7,44
Annotation Cluster 33	Enrichment Score: 1,9144566024265315				
SMART	SM00150:SPEC	7	1,10	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q92817, Q13813	0,24
INTERPRO	IPR018159:Spectrin/alpha-actinin	7	1,10	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q92817, Q13813	0,59
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 2	6	0,94	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q13813	1,99
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 1	6	0,94	O60437, Q9UPN3, Q01082, P15924, Q03001, Q13813	1,99
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 4	5	0,79	O60437, Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	6,38
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 3	5	0,79	O60437, Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	7,56
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 17	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 16	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 15	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 14	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 13	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 12	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12



## Annexes

UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 11	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
UP_SEQ_FEATURE	repeat:Spectrin 10	4	0,63	Q9UPN3, Q01082, Q03001, Q13813	9,12
Annotation Cluster 34	Enrichment Score: 1,9041764150492835				
UP_SEQ_FEATURE	repeat:WD 5	17	2,67	Q96EE3, P63151, O43684, Q9GZS3, Q9Y3F4, Q2TAY7, O15143, P35606, Q16576, Q86W42, Q13347, Q96DI7, Q09028, O95834, Q9BZH6, Q14137, P63244	6,13
UP_SEQ_FEATURE	repeat:WD 6	15	2,36	Q96EE3, P63151, Q9GZS3, Q9Y3F4, Q2TAY7, O15143, P35606, Q16576, Q86W42, Q96DI7, Q09028, Q9BZH6, Q14137, O95834, P63244	6,45
INTERPRO	IPR020472:G-protein beta WD-40 repeat	10	1,57	Q96EE3, O43684, Q09028, Q96DI7, Q9GZS3, Q9Y3F4, Q2TAY7, P35606, P63244, Q16576	6,83
SMART	SM00320:WD40	17	2,67	Q96EE3, P63151, O43684, Q9GZS3, Q9Y3F4, Q2TAY7, O15143, P35606, Q16576, Q86W42, Q13347, Q96DI7, Q09028, O95834, Q9BZH6, Q14137, P63244	8,62
Annotation Cluster 35	Enrichment Score: 1,8717664456004066				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006635~fatty acid beta-oxidation	9	1,42	P24752, Q16698, Q6NVY1, P23786, P30084, P42126, Q9BWD1, P55084, P28288	0,29
INTERPRO	IPR016039:Thiolase-like	4	0,63	Q01581, P24752, Q9BWD1, P55084	8,24
Annotation Cluster 37	Enrichment Score: 1,8231548229408414				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006418~tRNA aminoacylation for protein translation	9	1,42	Q9Y285, Q15046, Q9Y224, Q9NSD9, O43324, P41250, P54577, Q15181, P54136	0,14
UP_KEYWORDS	Aminoacyl-tRNA synthetase	7	1,10	Q9Y285, Q15046, Q9Y224, Q9NSD9, P41250, P54577, P54136	1,39
Annotation Cluster 38	Enrichment Score: 1,781096723236427				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016651~oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H	5	0,79	Q16698, P28331, Q16718, O00217, O75306	0,75
UP_KEYWORDS	Electron transport	12	1,89	O75489, Q9P0J0, P10599, O95864, Q9NX14, P28331, Q16881, P13804, Q16718, O00217, P22570, O75306	0,71
UP_KEYWORDS	Mitochondrion inner membrane	19	2,99	Q96TA2, O75489, Q9P0J0, Q9Y6C9, Q9NX14, Q3ZCQ8, O95202, P56385, P54886, Q9H061, P05141, P48047, P23786, P28331, P55084, Q16718, O75947, P36542, O75306	2,62
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003954~NADH dehydrogenase activity	4	0,63	O75489, Q9P0J0, O00217, O75306	3,66
UP_KEYWORDS	Ubiquinone	6	0,94	O75489, Q9P0J0, P28331, Q16718, O00217, O75306	5,66
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005747~mitochondrial respiratory chain complex I	7	1,10	O75489, Q9P0J0, Q9NX14, P28331, Q16718, O00217, O75306	9,14
KEGG_PATHWAY	hsa00190:Oxidative phosphorylation	16	2,52	O75489, Q9P0J0, Q9NX14, P56385, O00217, Q15181, P21283, P21281, P38606, P48047, P54707, P28331, Q16718, O75947, P36542, O75306	9,93
Annotation Cluster 39	Enrichment Score: 1,7562765283001558				
UP_KEYWORDS	Hydrogen ion transport	8	1,26	P38606, P48047, P54707, P56385, O75947, P21283, P36542, P21281	1,00
KEGG_PATHWAY	hsa00190:Oxidative phosphorylation	16	2,52	O75489, Q9P0J0, Q9NX14, P56385, O00217, Q15181, P21283, P21281, P38606, P48047, P54707, P28331, Q16718, O75947, P36542, O75306	9,93

Annexes

Annotation Cluster 42	Enrichment Score: 1,6689640013081333				
KEGG_PATHWAY	hsa00650:Butanoate metabolism	7	1,10	Q01581, P24752, Q86V21, P80404, P30084, Q9BWD1, P35914	4,34
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001889~liver development	9	1,42	Q01581, P25325, P24752, Q86V21, P00966, Q16706, P08243, Q9UGP8, P35914	8,99
Annotation Cluster 43	Enrichment Score: 1,643584076185552				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005851~eukaryotic translation initiation factor 2B complex	4	0,63	Q9NR50, P49770, P05198, Q14232	1,10
UP_KEYWORDS	Leukodystrophy	6	0,94	P20700, Q96C36, Q9NR50, P49770, P54136, Q14232	1,76
OMIM_DISEASE	603896~Leukoencephalopathy with vanishing white matter	3	0,47	Q9NR50, P49770, Q14232	9,91
Annotation Cluster 52	Enrichment Score: 1,4452983511847441				
UP_KEYWORDS	Hydrogen ion transport	8	1,26	P38606, P48047, P54707, P56385, O75947, P21283, P36542, P21281	1,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005753~mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	5	0,79	P48047, P56385, P30405, O75947, P36542	7,44
Annotation Cluster 64	Enrichment Score: 1,13832750283253				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0031492~nucleosomal DNA binding	10	1,57	P84243, Q13547, O75367, Q09028, Q12824, Q92769, P68431, P18754, Q71DI3, O96019	0,06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000228~nuclear chromosome	9	1,42	P84243, Q15021, O75367, P52701, O60216, Q12824, P11387, P68431, P62805	0,63
UP_KEYWORDS	Citrullination	10	1,57	P84243, P36578, P62750, Q86V81, P68431, Q9NYF8, P27635, Q71DI3, Q00839, P62805	4,21

**Effets communs des QDs :**

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 8,365096020530705				
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	54	15,61	P49748, Q9NX46, Q9NX47, O43615, P12931, P42126, O95831, P61604, Q8NFF5, Q96EY7, Q7Z2W9, Q9Y6M9, P23396, P22695, P49419, Q96Q11, Q9NYK5, P10515, O00217, P39748, P22570, P50336, Q07812, P82930, P28331, Q16836, O00154, Q6L8Q7, Q9H2U2, Q9UIJ7, Q16698, P09669, O95571, Q8WWC4, O95674, P06493, Q9HD33, P51398, Q5JRX3, Q8TCS8, P30048, P35914, Q16891, P14406, Q12849, Q9H3P7, P49821, O94826, P34897, Q9UBX3, Q13637, O43169, P50213, Q9Y3D9	0,00
UP_KEYWORDS	Transit peptide	33	9,54	P49748, Q9H2U2, Q9NX46, Q16698, O43615, P42126, O95571, Q8WWC4, Q9HD33, O95831, Q8NFF5, Q96EY7, P51398, Q5JRX3, Q8TCS8, P30048, Q7Z2W9, P49419, P22695, Q16891, P35914, Q96Q11, P14406, Q12849, P49821, P10515, P34897, O00217, P22570, P28331, P50213, Q16836, Q6L8Q7	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005739~mitochondrion	59	17,05	P49748, Q9BPW8, O43615, P12931, P42126, O43847, O95831, O75146, P61604, Q96EY7, P49792, Q9Y6M9, P22695, P49419, Q96Q11, Q9NYK5, P10515, O00217, P48163, P39748, P22570, Q07812, P28331, P82930, Q15006, Q16836, O00154, Q96CW1, Q9UIJ7, Q16698, P09669, Q03518,	0,00

				P06493, O95571, Q8WWC4, Q9UG63, P30566, Q9HD33, O95479, P51398, Q5JRX3, Q8TCS8, P30048, P06241, P35914, Q16891, Q12849, Q9H3P7, O94826, Q9NQR4, P35613, P07858, P34897, Q13637, P26640, Q9NZL9, P12081, P50213, Q9Y3D9	
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	25	7,23	P49748, Q9H2U2, Q9NX46, Q9UIJ7, Q16698, O43615, P42126, P10515, P34897, O95571, O00217, Q8WWC4, P22570, Q8NFF5, P61604, Q5JRX3, P30048, P28331, P50213, Q16836, P23396, Q6L8Q7, P49419, P35914, Q96Q11	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005743~mitochondrial inner membrane	27	7,80	P49748, O43615, P12931, Q9BPW8, P42126, P09669, O95674, Q8WWC4, Q9HD33, O95831, Q96EY7, P51398, Q7Z2W9, Q9Y6M9, P23396, P22695, Q16891, P35914, Q9NYK5, P49821, P34897, Q9UBX3, P22570, O43169, P82930, Q16836, Q9Y3D9	0,00
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	27	7,80	P49748, Q9H2U2, Q16698, O43615, P42126, O95571, Q8WWC4, Q9HD33, O95831, P51398, Q96EY7, Q5JRX3, Q8TCS8, P30048, Q7Z2W9, P22695, P35914, Q96Q11, P14406, P49821, P10515, P34897, O00217, P22570, P28331, P50213, Q16836	0,00
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 6,143244318970467				
UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	27	7,80	Q71UM5, P18124, P62750, P46778, P62277, Q07020, Q9HD33, P62280, P51398, P09012, P62241, Q7Z2W9, Q9UHB9, P23396, P62701, Q9NYK5, P08579, Q13151, P52272, O75643, Q9UKM9, P82930, P08621, P42677, Q14764, Q9Y3D9, P26373	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	16	4,62	P18124, P62750, P46778, P78406, Q07020, P62277, P62280, P49792, P49790, Q8N1F7, P62241, P42677, P23396, P35658, P26373, P62701	0,00
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	18	5,20	Q9NYK5, P18124, Q71UM5, P62750, P46778, Q07020, P62277, Q9HD33, P62280, P51398, P82930, Q7Z2W9, P62241, P42677, Q9Y3D9, P23396, P26373, P62701	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	18	5,20	P18124, Q71UM5, P62750, P46778, Q07020, P62277, P62280, P82930, Q7Z2W9, P62241, P05198, P42677, Q15637, Q9UHB9, Q9Y3D9, P23396, P26373, P62701	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	16	4,62	P18124, P62750, P46778, O75821, Q07020, P62277, P62280, Q13347, Q9BY44, O60841, P62241, P05198, P42677, P23396, P26373, P62701	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	13	3,76	P62280, Q9Y5M8, P18124, P62750, P46778, P62277, Q07020, P62241, P42677, Q9UHB9, P23396, P26373, P62701	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	18	5,20	P18124, Q71UM5, P62750, Q9NXF1, Q9Y2L1, P46778, Q07020, P62277, Q9BVJ6, P62280, Q14137, P62241, P42677, P78346, P23396, P26373, P62701, Q92979	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003735~structural constituent of ribosome	18	5,20	P18124, Q71UM5, P62750, P46778, Q07020, P62277, Q9UBX3, Q9HD33, P62280, P51398, P82930, Q7Z2W9, P62241, P42677, Q9Y3D9, P23396, P26373, P62701	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	13	3,76	P62280, P18124, P62750, P46778, Q9Y5S9, P62495, P62277, Q07020, P62241, P42677, P23396, P26373, P62701	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	8	2,31	P62280, Q71UM5, Q9BY44, P62277, P62241, P42677, P23396, P62701	0,04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	17	4,91	P18124, Q71UM5, P62750, P14868, P46778, Q07020, P62277, Q9UBX3, P62280, P12081, Q7Z2W9, P62241, P42677, Q9Y3D9, P23396, P26373, P62701	0,07
KEGG_PATHWAY	hsa03010:Ribosome	13	3,76	P62280, Q71UM5, P18124, P62750, P46778, P62277, Q07020, P62241, Q7Z2W9, P42677, P23396, P26373, P62701	0,74
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 5,714609022999148				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	21	6,07	Q9UPN3, Q7L1Q6, P12931, P62750, P35613, Q9H2G2, Q9BR76, Q9UQB8, P37802, Q9Y6W5, Q14008, Q9UBC2, Q16643, Q9H4M9, Q9UH65, Q8WWM7, Q9BY44, Q14C86, Q14258, Q9H3U1, P42566	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	20	5,78	Q9UPN3, Q7L1Q6, P62750, P35613, Q9H2G2, Q9UQB8, Q9BR76, P37802, Q9Y6W5, Q14008, Q9UBC2, Q16643, Q9H4M9, Q9UH65, Q8WWM7, Q9BY44, Q14C86, Q14258, Q9H3U1, P42566	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	21	6,07	Q9UPN3, Q7L1Q6, P12931, P62750, P35613, Q9H2G2, Q9BR76, Q9UQB8, P37802, Q9Y6W5, Q14008, Q9UBC2, Q16643, Q9H4M9, Q9UH65, Q8WWM7, Q9BY44, Q14C86, Q14258, Q9H3U1, P42566	0,00
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 4,088136179082066				

UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	58	16,76	Q9Y5M8, P61204, P12931, Q3LXA3, O43615, Q3ZCM7, Q13188, Q9H4M9, P17858, Q8NFF5, P54619, Q7L7X3, Q15382, Q8IY21, Q96Q11, Q9NR19, P21127, P49589, Q9UL25, P46459, Q13464, Q9H2G2, P54577, O43237, O60841, O15067, P84085, P62256, P56192, Q9Y6G9, P34932, Q9UIJ7, Q9UQ16, P14868, Q7L014, Q03518, P06493, Q14166, Q9NZN4, Q9UG63, Q9NZN3, P20591, Q8N3C0, P17980, P06241, Q15904, P61224, Q13131, Q86V21, O75643, P46063, Q13637, P33993, P26640, Q14204, P12081, Q9BQ39, P43246	0,00
UP_KEYWORDS	ATP-binding	46	13,29	P34932, Q9Y6G9, P56192, O43615, P12931, Q3LXA3, P14868, Q7L014, Q03518, P06493, Q9NZN4, Q14166, Q13188, Q9H4M9, P17858, Q9UG63, Q9NZN3, Q8NFF5, P54619, Q8N3C0, Q7L7X3, P17980, Q15904, P06241, Q8IY21, Q96Q11, Q13131, Q9NR19, Q86V21, P21127, P49589, P46459, O75643, Q13464, Q9H2G2, O43237, P54577, P46063, P33993, P26640, Q14204, P12081, O15067, Q9BQ39, P43246, P62256	0,02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	50	14,45	P12931, Q3LXA3, O43615, Q13188, Q9H4M9, P17858, P61604, Q8NFF5, P54619, Q7L7X3, Q8IY21, Q96Q11, Q9NR19, P21127, P49589, P46459, Q13464, Q9H2G2, P54577, O43237, Q9UHY1, O15067, P62256, P56192, Q9Y6G9, P34932, Q9UIJ7, P14868, Q7L014, P06493, Q03518, Q14166, Q9NZN4, Q9UH65, Q9UG63, Q9NZN3, Q8N3C0, P17980, Q15904, P06241, Q13131, Q86V21, O75643, P46063, P33993, P26640, Q14204, P12081, Q9BQ39, P43246	0,31
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 4,055165307985083				
UP_KEYWORDS	RNA-binding	41	11,85	Q01085, P56192, P18124, P62750, Q9Y2L1, Q7L014, P62280, Q14498, Q96EY7, Q8TCS8, P49792, Q86V81, P09012, Q9UHB9, Q15637, Q8IY21, P23396, Q86U42, P62701, Q96Q11, P08579, Q13151, Q12849, P52272, Q13247, O75821, P54577, Q8WXF1, P06748, O43148, Q9UKM9, Q9Y5S9, P51116, Q05519, Q9BQ39, P08621, P05198, P51114, Q9UKK9, P82979, Q92979	0,00
SMART	SM00360:RRM	16	4,62	P08579, Q01085, Q13151, Q12849, P52272, Q13247, O75821, Q8WXF1, Q14498, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q86U42	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	18	5,20	P08579, Q13151, P52272, O75643, Q13247, Q7L014, P41223, Q8WXF1, Q13435, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q15637, O43447, Q86U42	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA processing	20	5,78	P08579, Q12849, P52272, O75643, Q13247, Q7L014, Q13435, Q14498, O43148, Q8TCS8, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q15637, O43447, Q6L8Q7, Q86U42	0,00
INTERPRO	IPR012677:Nucleotide-binding, alpha-beta plait	18	5,20	P08579, Q01085, Q13151, Q12849, P52272, P62750, Q13247, O75821, Q8WXF1, Q14498, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q9BQ39, Q86U42	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005681~spliceosomal complex	11	3,18	P08579, Q13435, P52272, O75643, Q9BZZ5, P09012, Q15382, P08621, P41223, Q15637, O43447	0,01
INTERPRO	IPR000504:RNA recognition motif domain	16	4,62	P08579, Q01085, Q13151, Q12849, P52272, Q13247, O75821, Q8WXF1, Q14498, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q86U42	0,03
UP_KEYWORDS	Spliceosome	10	2,89	P08579, Q13435, P52272, Q9UKM9, O75643, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q15637, O43447	0,39
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	14	4,05	P08579, P52272, O75643, Q13247, Q7L014, Q13435, Q14498, Q9UKM9, Q9Y5S9, Q86V81, P09012, Q05519, Q15637, O43447	0,63
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0000166~nucleotide binding	18	5,20	Q9NYK5, P08579, Q01085, Q13151, Q12849, P52272, P62750, Q13247, O75821, Q8WXF1, Q14498, Q9UKM9, Q86V81, Q9Y5S9, P09012, Q05519, P08621, Q86U42	0,73
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 2	9	2,60	Q14498, Q01085, P08579, Q13151, Q12849, P52272, Q13247, P09012, Q8WXF1	2,23
UP_SEQ_FEATURE	domain:RRM 1	9	2,60	Q14498, Q01085, P08579, Q13151, Q12849, P52272, Q13247, P09012, Q8WXF1	2,23
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	12	3,47	P08579, Q13435, P52272, O75643, Q13247, Q86V81, Q7L014, Q9Y5S9, P09012, P08621, P41223, O43447	2,11
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016607~nuclear speck	11	3,18	Q8WWM7, Q14498, Q13247, Q86V81, Q7L014, Q9Y5S9, P08621, O43447, Q8WXF1, Q86U42, P82979	6,38
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 3,4380326829736227				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006886~intracellular protein transport	20	5,78	P10619, Q14974, P46459, Q9UIA9, O14617, Q9Y6Q5, P63010, Q9Y2T2, P06748, O14964, Q9H4M9, P53621, O43752, O94973, Q5T9L3, Q10567, O95782, Q9NZ52, Q96CW1, O60784	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030131~clathrin adaptor complex	7	2,02	O94973, Q10567, Q9Y6Q5, P63010, Q9NZ52, Q9Y2T2, Q96CW1	0,00

## Annexes

GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042059~negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	8	2,31	O94973, Q96B97, O95782, Q9UBC2, P63010, Q96CW1, O14964, P42566	0,01
SMART	SM00809:Alpha_adaptinC2	5	1,45	O94973, O95782, Q10567, P63010, Q9NZ52	0,01
INTERPRO	IPR008152:Clathrin adaptor, alpha/beta/gamma-adaptin, appendage, Ig-like subdomain	5	1,45	O94973, O95782, Q10567, P63010, Q9NZ52	0,02
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0050690~regulation of defense response to virus by virus	7	2,02	O94973, P06241, O95782, Q10567, Q9Y6Q5, P63010, Q96CW1	0,02
INTERPRO	IPR013041:Coatomer/clathrin adaptor appendage, Ig-like subdomain	5	1,45	O94973, O95782, Q10567, P63010, Q9NZ52	0,07
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030122~AP-2 adaptor complex	5	1,45	O94973, O95782, P63010, Q96CW1, P42566	0,10
INTERPRO	IPR002553:Clathrin/coatomer adaptor, adaptin-like, N-terminal	5	1,45	O94973, O95782, Q10567, O14617, P63010	0,14
INTERPRO	IPR009028:Coatomer/calthrin adaptor appendage, C-terminal subdomain	4	1,16	O94973, O95782, Q10567, P63010	0,17
UP_KEYWORDS	Endocytosis	10	2,89	O75146, Q9UQ16, O94973, Q96B97, O95782, Q14C86, Q9UBC2, P63010, Q96CW1, P42566	0,27
KEGG_PATHWAY	hsa04144:Endocytosis	19	5,49	P61204, Q9UQ16, P12931, O15145, O95219, Q9Y6D6, O15511, Q9UBC2, P63010, Q9NZN4, O14964, Q9H4M9, Q9NZN3, O94973, Q96B97, P84085, O95782, Q96CW1, P42566	0,28
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0048013~ephrin receptor signaling pathway	9	2,60	P12931, O94973, O15145, Q13464, P06241, O95782, O15511, P63010, Q96CW1	0,48
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0072583~clathrin-mediated endocytosis	5	1,45	O75146, O94973, O95782, P63010, Q96CW1	0,93
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0035615~clathrin adaptor activity	4	1,16	O94973, O95782, P63010, Q96CW1	1,15
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030669~clathrin-coated endocytic vesicle membrane	6	1,73	O94973, O95782, Q10567, Q9Y6Q5, P63010, Q96CW1	1,33
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0036020~endolysosome membrane	4	1,16	O94973, O95782, P63010, Q96CW1	1,73
UP_KEYWORDS	Coated pit	6	1,73	O94973, O95782, Q9UBC2, P63010, Q96CW1, P42566	2,12
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019886~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	8	2,31	O94973, Q14204, O95782, Q10567, O43237, Q9Y6Q5, P63010, Q96CW1	3,71
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008565~protein transporter activity	7	2,02	Q14974, O94973, Q96P70, O95782, Q10567, O14617, P63010	3,98
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016192~vesicle-mediated transport	10	2,89	O95197, O94973, P46459, Q10567, O14617, Q9Y6Q5, P63010, Q9NZ52, Q9Y2T2, Q96CW1	5,22
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007018~microtubule-based movement	7	2,02	Q9Y6G9, O94973, Q14204, O95782, O43237, P63010, Q96CW1	8,41
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 3,3963249794626327				

## Annexes

UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 6	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,02
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 5	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,04
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 7	6	1,73	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,07
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 4	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,14
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 3	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,32
INTERPRO	IPR021133:HEAT, type 2	5	1,45	Q7Z460, Q14974, Q9NXF1, Q8NDA8, Q14008	0,50
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 2	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,73
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 1	7	2,02	Q7Z460, Q5VYK3, Q14974, Q08AM6, Q8NDA8, Q14008, Q86VP6	0,73
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 8	4	1,16	Q5VYK3, Q14974, Q14008, Q86VP6	6,07
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 2,9134050845364827				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008536~Ran GTPase binding	6	1,73	Q14974, P55060, P49792, Q9UIA9, Q9H6Z4, Q96P70	0,38
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006606~protein import into nucleus	7	2,02	Q14974, P55060, P49790, Q8N1F7, P78406, Q96P70, P35658	1,58
UP_SEQ_FEATURE	domain:Importin N-terminal	4	1,16	Q14974, P55060, Q9UIA9, Q96P70	2,47
SMART	SM00913:SM00913	4	1,16	Q14974, P55060, Q9UIA9, Q96P70	2,42
INTERPRO	IPR001494:Importin-beta, N-terminal	4	1,16	Q14974, P55060, Q9UIA9, Q96P70	4,95
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 2,4820887540632715				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030131~clathrin adaptor complex	7	2,02	O94973, Q10567, Q9Y6Q5, P63010, Q9NZ52, Q9Y2T2, Q96CW1	0,00
INTERPRO	IPR018240:Clathrin adaptor, mu subunit, conserved site	3	0,87	Q9Y6Q5, Q9Y2T2, Q96CW1	6,92
INTERPRO	IPR001392:Clathrin adaptor, mu subunit	3	0,87	Q9Y6Q5, Q9Y2T2, Q96CW1	6,92
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 2,429614604774942				
KEGG_PATHWAY	hsa03013:RNA transport	17	4,91	Q14974, O75821, P78406, Q13347, A6NKT7, P49792, O60841, Q86V81, Q9Y5S9, P49790, Q8N1F7, P51116, P05198, P78346, P51114, P35658, Q96Q11	0,05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	10	2,89	P49792, Q13247, Q86V81, P49790, Q9Y5S9, Q8N1F7, P78406, Q05519, P35658, P82979	0,26
UP_KEYWORDS	mRNA transport	9	2,60	P49792, Q86V81, Q9UIA9, P49790, Q9Y5S9, Q8N1F7, Q14764, P35658, P82979	0,56
BIOCARTA	h_npcPathway:Mechanism of Protein Import into the Nucleus	5	1,45	Q14974, P49792, P49790, P18754, P35658	0,56
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006606~protein import into nucleus	7	2,02	Q14974, P55060, P49790, Q8N1F7, P78406, Q96P70, P35658	1,58
UP_KEYWORDS	Nuclear pore complex	6	1,73	P49792, Q9UIA9, P49790, Q8N1F7, Q14764, P35658	1,94

Annexes

GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007077~mitotic nuclear envelope disassembly	6	1,73	P49792, P49790, Q8N1F7, P78406, P06493, P35658	2,74
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005643~nuclear pore	7	2,02	Q14974, P49792, Q9UIA9, P49790, Q8N1F7, P78406, Q14764	3,12
UP_KEYWORDS	Translocation	7	2,02	O43615, P49792, Q9UIA9, P49790, Q8N1F7, Q14764, P35658	3,78
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0075733~intracellular transport of virus	6	1,73	Q14974, P49792, P49790, Q8N1F7, P78406, P35658	5,23
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006409~tRNA export from nucleus	5	1,45	P49792, P49790, Q8N1F7, P78406, P35658	5,58
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010827~regulation of glucose transport	5	1,45	P49792, P49790, Q8N1F7, P78406, P35658	6,23
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0034399~nuclear periphery	4	1,16	Q14974, P49790, Q8N1F7, O75475	8,92
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 2,3892728854296594				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006418~tRNA aminoacylation for protein translation	8	2,31	P26640, Q9NYK5, Q9H2U2, P56192, P49589, P14868, P12081, P54577	0,02
UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	12	3,47	P26640, Q13347, P56192, P49589, P14868, Q9BY44, O60841, O75821, P12081, P62495, P05198, P54577	0,07
UP_KEYWORDS	Aminoacyl-tRNA synthetase	6	1,73	P26640, P56192, P49589, P14868, P12081, P54577	0,55
UP_KEYWORDS	Ligase	15	4,34	P26640, Q9NR19, Q86V21, P56192, Q9BRZ2, Q9NX47, P49589, P49792, P14868, P12081, O15067, P54577, Q14166, Q14258, Q9HAB8	3,03
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:"KMSKS" region	4	1,16	P26640, P56192, P49589, P54577	3,69
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:"HIGH" region	4	1,16	P26640, P56192, P49589, P54577	5,20
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004812~aminoacyl-tRNA ligase activity	4	1,16	P26640, P56192, P12081, P54577	5,78
Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 2,2908317334254273				
INTERPRO	IPR016040:NAD(P)-binding domain	13	3,76	P50336, O95479, Q15738, Q16698, Q9NZL9, Q9Y394, Q14914, P48163, Q16836, P53004, P22570, P16152, Q6IAN0	0,16
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	23	6,65	Q9NZ01, P49748, P49821, Q16698, Q9Y394, P78417, O95571, O00217, P48163, P53004, P22570, P16152, Q6IAN0, O95831, P50336, O95479, Q15738, P30048, P28331, P50213, Q14914, Q16836, P49419	0,48
UP_KEYWORDS	NADP	10	2,89	Q9NZ01, O95479, Q16698, Q9NZL9, Q14914, P48163, P53004, P22570, P16152, Q6IAN0	5,54
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0016491~oxidoreductase activity	11	3,18	Q9NZ01, P50336, O95831, Q14554, Q9Y394, P78417, Q14914, P53004, P22570, P49419, Q6IAN0	8,37
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 2,261220619145083				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	10	2,89	P49792, Q13247, Q86V81, P49790, Q9Y5S9, Q8N1F7, P78406, Q05519, P35658, P82979	0,26
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031124~mRNA 3'-end processing	6	1,73	Q13247, Q86V81, Q9Y5S9, Q05519, Q86U42, P82979	4,81
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006405~RNA export from nucleus	6	1,73	Q13247, Q86V81, Q9Y5S9, Q05519, P35658, P82979	7,20

Annexes

Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 1,6803170964194467				
UP_KEYWORDS	Cholesterol metabolism	6	1,73	Q13131, Q15738, O94905, O15118, P22570, Q15125	3,47
UP_KEYWORDS	Steroid biosynthesis	5	1,45	Q13131, Q15738, Q9H3P7, P48449, Q15125	3,54
UP_KEYWORDS	Sterol metabolism	6	1,73	Q13131, Q15738, O94905, O15118, P22570, Q15125	6,87
Annotation Cluster 19	Enrichment Score: 1,5946777813886477				
SMART	SM00027:EH	5	1,45	Q9UBC2, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3, P42566	0,02
INTERPRO	IPR000261:EPS15 homology (EH)	5	1,45	Q9UBC2, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3, P42566	0,05
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0032456~endocytic recycling	6	1,73	O43752, O95219, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3, P42566	0,15
INTERPRO	IPR022812:Dynamin	5	1,45	Q9UQ16, P20591, Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	0,32
UP_SEQ_FEATURE	domain:EH	3	0,87	Q9NZN4, Q9H4M9, Q9NZN3	4,39
Annotation Cluster 20	Enrichment Score: 1,593442508830228				
INTERPRO	IPR007863:Peptidase M16, C-terminal domain	3	0,87	Q5JRX3, O43847, P22695	9,45
INTERPRO	IPR011765:Peptidase M16, N-terminal	3	0,87	Q5JRX3, O43847, P22695	9,45
INTERPRO	IPR011237:Peptidase M16 domain	3	0,87	Q5JRX3, O43847, P22695	9,45
INTERPRO	IPR011249:Metalloenzyme, LuxS/M16 peptidase-like	3	0,87	Q5JRX3, O43847, P22695	9,45
Annotation Cluster 33	Enrichment Score: 1,1026536586871065				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005868~cytoplasmic dynein complex	4	1,16	Q9Y6G9, Q14204, O95219, O43237	3,41
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007018~microtubule-based movement	7	2,02	Q9Y6G9, O94973, Q14204, O95782, O43237, P63010, Q96CW1	8,41

**Effets spécifiques des ions In<sup>3+</sup> :**

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 20,060987459866116				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	40	11,80	Q99439, P60228, P62820, Q8WUUF5, Q9Y5K6, Q86UP2, Q00341, P33176, Q9UHX1, P62826, P61313, P61978, P50402, Q99959, Q9Y266, P62854, Q9UJU6, P15880, Q9NUQ8, P46060, Q04637, Q92817, Q9Y371, Q13177, Q9NTK5, Q13813, Q86SQ0, P26641, Q32MZ4, P08238, O95292, Q15691, Q61BS0, Q02878, Q8N3F8, P53367, P23229, A0FGR8, Q6WCQ1, Q16181	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	40	11,80	Q99439, P60228, P62820, Q8WUUF5, Q9Y5K6, Q86UP2, Q00341, P33176, Q9UHX1, P62826, P61313, P61978, P50402, Q99959, Q9Y266, P62854, Q9UJU6, P15880, Q9NUQ8, P46060, Q04637, Q92817, Q9Y371, Q13177, Q9NTK5, Q13813, Q86SQ0, P26641, Q32MZ4, P08238, O95292, Q15691, Q61BS0, Q02878, Q8N3F8, P53367, P23229, A0FGR8, Q6WCQ1, Q16181	0,00



GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	37	10,91	Q99439, P60228, P62820, Q8WUF5, Q86UP2, Q00341, P33176, Q9UHX1, P62826, P61313, P61978, P50402, Q9Y266, P62854, Q9UJU6, P15880, Q9NUQ8, P46060, Q04637, Q92817, Q9Y371, Q13177, Q9NTK5, Q86SQ0, Q13813, P26641, Q32MZ4, P08238, O95292, Q15691, Q6IBS0, Q02878, Q8N3F8, P53367, AOFGR8, Q6WQC1, Q16181	0,00
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 7,067703826161869				
UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	74	21,83	P62820, P07437, P00367, Q9BVP2, P36405, P53597, P47897, Q9Y5Y2, P68371, P11233, P38606, Q9UJ70, P52789, P00568, P62826, Q8NBU5, Q14566, Q6P1M0, P68036, Q9NUQ8, P49841, P49411, P78371, Q9H0U4, O94804, P38646, Q6PI48, O43776, P08238, Q96BM9, Q9P2J5, Q16181, Q08AF3, P11388, Q15349, Q14978, P08581, Q9NVA2, O95573, Q03519, P36776, P33121, P13861, Q8TBX8, P61221, P33176, Q58FF8, P61160, P22102, Q12965, P49736, P20340, P42345, P55072, Q9Y5P6, P00966, Q9NVJ2, P26639, Q9BUQ8, P19525, P48729, Q9HD20, Q13177, P54886, Q9NTK5, P19367, Q12931, P33992, Q92499, Q9H0S4, Q92614, Q13885, A3KMH1, Q9Y4L1	0,00
UP_KEYWORDS	ATP-binding	55	16,22	P00367, P47897, Q9Y5Y2, P38606, Q9UJ70, P52789, P00568, Q8NBU5, Q14566, Q9NUQ8, P68036, P49841, P78371, O94804, P38646, Q6PI48, O43776, P08238, Q9P2J5, Q08AF3, P11388, P08581, Q15349, Q14978, O95573, Q03519, P36776, P33121, Q8TBX8, P61221, P33176, P61160, Q58FF8, Q12965, P22102, P49736, P42345, P55072, P00966, P26639, P19525, Q9BUQ8, P48729, Q9HD20, P54886, Q13177, Q9NTK5, P19367, Q12931, P33992, Q92499, Q9H0S4, Q92614, A3KMH1, Q9Y4L1	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	59	17,40	P00367, P47897, Q9Y5Y2, P38606, Q9UJ70, P52789, P00568, Q8NBU5, Q14566, Q9NTI5, Q9NUQ8, P68036, P49841, Q9P0J0, P78371, O94804, P38646, P21281, Q6PI48, O43776, P08238, Q9P2J5, Q08AF3, P11388, P08581, Q15349, Q14978, O95573, Q03519, P36776, P33121, Q8TBX8, P61221, P33176, P61160, Q58FF8, Q12965, P22102, P49736, P42345, P55072, P00966, P26639, P19525, Q9BUQ8, P48729, Q9HD20, P54886, Q13177, Q9NTK5, P19367, Q12931, P33992, Q92499, Q9H0S4, Q92614, Q6IBS0, A3KMH1, Q9Y4L1	0,00
INTERPRO	IPRO27417:P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	36	10,62	Q08AF3, P62820, Q9BVP2, P36405, O00204, Q9NVA2, Q03519, P36776, Q9Y5Y2, P61221, P33176, P11233, Q12965, P38606, P00568, Q5K651, P49736, P20340, P62826, P55072, Q8NBU5, Q14566, Q9NUQ8, P49411, Q9NVJ2, Q9BUQ8, Q9NTK5, Q9H0U4, P21281, P33992, Q92499, Q96BM9, Q9H0S4, Q92614, A3KMH1, Q16181	0,01
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	31	9,14	Q08AF3, P11388, Q15349, P08581, Q03519, P36776, Q9Y5Y2, P33176, P61160, P22102, Q12965, P38606, Q9UJ70, P00568, P49736, P55072, Q8NBU5, Q14566, P00966, P49841, Q9BUQ8, P19525, P48729, Q13177, Q9NTK5, O94804, P33992, Q92499, Q9H0S4, Q92614, A3KMH1	2,38
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 6,105860452439949				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	22	6,49	P60228, P15880, P36578, O75822, P05388, Q04637, P55884, Q14232, P20042, P63173, P61221, P62861, O15372, P62269, P84098, O15371, P61247, Q02878, P61313, P62854, P39023, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	22	6,49	P15880, P36578, Q9H0D6, Q14978, P05388, Q9BVI4, Q9NPD3, P63173, Q2NL82, O60832, P62861, P55769, Q9H0S4, P62269, P84098, P61247, Q02878, Q8TED0, P61313, P62854, P39023, P46781	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	15	4,42	P15880, P36578, P05388, P61619, P63173, O76094, P62861, P62269, P84098, P61247, Q02878, P61313, P62854, P46781, P39023	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	16	4,72	P60228, P15880, P36578, P05388, Q04637, P63173, P62861, P62269, P84098, P61247, Q02878, P61313, P61326, P62854, P39023, P46781	0,00
UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	22	6,49	P15880, P36578, P05388, Q15349, Q9UKF6, P63173, O76094, O60832, P62861, P55769, Q9UHX1, P62269, P84098, P62318, P61247, Q02878, P61978, P61313, Q6DKI1, P62854, P39023, P46781	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005840~ribosome	17	5,01	P27695, P15880, P36578, Q15349, P05388, P19525, P63173, P62861, P62269, P84098, P61247, Q02878, P61313, P62854, Q6DKI1, P46781, P39023	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003723~RNA binding	30	8,85	P36578, P52594, Q14444, P47897, Q00341, P63173, Q96AE4, O60832, P55769, P62269, P84098, P61247, P61313, P61978, P15880, Q13310, P26639, Q04637, P55265, Q9UKF6, Q01844, P55884, P20042, P62861, Q13325, O15371, Q02878, Q53EL6, Q13148, P39023	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	13	3,83	P15880, P36578, P05388, P63173, P62861, P84098, P62269, P61247, Q02878, P61313, P62854, P46781, P39023	0,00
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	15	4,42	P15880, P36578, Q15349, P05388, P63173, P62861, P62269, P84098, P61247, Q02878, P61313, P62854, Q6DKI1, P46781, P39023	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	18	5,31	P15880, P36578, Q13310, P26639, P05388, P19525, Q04637, P63173, P62861, P55769, P62269, P84098, P61247, Q02878, P61313, P62854, P39023, P46781	0,02

## Annexes

GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	9	2,65	P36578, P55769, P05388, P84098, Q02878, P61313, Q6DKI1, P39023, P63173	0,05
KEGG_PATHWAY	hsa03010:Ribosome	13	3,83	P15880, P36578, P05388, P63173, P62861, P84098, P62269, P61247, Q02878, P61313, P62854, P46781, P39023	0,53
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003735~structural constituent of ribosome	14	4,13	P15880, P36578, P05388, P63173, P62861, P84098, P62269, P61247, Q02878, P61313, P62854, Q6DKI1, P46781, P39023	0,76
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0015935~small ribosomal subunit	5	1,47	P15880, P62861, P62269, P62854, P46781	2,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	6	1,77	P15880, P62861, P62269, P61247, P62854, P46781	2,59
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 4,390567360761245				
UP_KEYWORDS	Endoplasmic reticulum	39	11,50	Q9BUN8, P62820, P62633, O94874, O00204, Q70UQ0, O95573, Q03519, P33121, Q86UP2, Q8IXB1, Q9H3N1, P57088, P42345, O00400, P55072, Q15800, Q9H4L5, P30101, P27695, Q6P1M0, Q9BW60, Q8NBS9, Q00765, Q9HD20, P61619, Q06136, O76094, Q12797, Q9NYU2, Q8TAT6, O95292, Q8IY17, Q9HCN8, Q96JJ7, Q8NF37, O43852, Q9Y4L1, A0FGR8	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005789~endoplasmic reticulum membrane	34	10,03	Q9BUN8, P62820, O94874, P49585, Q96N66, Q70UQ0, O95573, Q03519, Q9BTZ2, Q13451, P33121, Q86UP2, Q9H3N1, P20340, P57088, P42345, O00400, P55072, Q15800, Q9H4L5, Q8IU89, Q6P1M0, Q9BW60, Q9H2M9, Q9HD20, Q9H0U4, Q06136, Q12797, O95292, Q8IY17, Q9HCN8, Q96JJ7, Q8NF37, O43852	0,09
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005783~endoplasmic reticulum	32	9,44	Q9BUN8, P62633, O94874, O00204, Q70UQ0, O95573, Q8IY95, Q86UP2, Q8IXB1, Q9H3N1, P57088, P50402, P55072, Q15800, Q8IU89, P30101, P27695, Q6P1M0, Q9BW60, P00966, Q8NBS9, Q06136, O76094, P26641, Q12797, Q8TAT6, Q9NYU2, O95292, Q8IY17, Q8NF37, O43852, Q9Y4L1	0,22
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 4,089001473979294				
UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	15	4,42	P60228, P49411, O75822, P47897, P26639, Q04637, P55884, Q14232, P20042, Q6PI48, P26641, O43776, O15372, O15371, Q9P2J5	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006446~regulation of translational initiation	8	2,36	P60228, Q92499, O15372, O75822, O15371, Q04637, P55884, Q14232	0,01
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005852~eukaryotic translation initiation factor 3 complex	6	1,77	P61221, P60228, O15372, O75822, O15371, P55884	0,02
UP_KEYWORDS	Initiation factor	8	2,36	P60228, O15372, O75822, O15371, Q04637, P55884, Q14232, P20042	0,06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0016282~eukaryotic 43S preinitiation complex	5	1,47	P60228, O15372, O75822, O15371, P55884	0,19
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0033290~eukaryotic 48S preinitiation complex	5	1,47	P60228, O15372, O75822, O15371, P55884	0,19
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003743~translation initiation factor activity	8	2,36	P60228, O15372, O75822, O15371, Q04637, P55884, Q14232, P20042	0,29
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0001731~formation of translation preinitiation complex	5	1,47	P60228, O15372, O75822, O15371, P55884	1,53
KEGG_PATHWAY	hsa03013:RNA transport	14	4,13	P60228, Q13310, O75822, P46060, Q04637, P55884, P20042, Q14232, Q9UKV3, O15372, O15371, Q9H307, P62826, P61326	1,35
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071541~eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3m	3	0,88	O15372, O15371, P55884	9,04
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 3,8884640235856445				
UP_KEYWORDS	Chaperone	14	4,13	Q9BTT0, Q9HAV7, P78371, Q99471, Q13451, P38646, Q12931, P61221, Q58FF8, Q8TAT6, P46379, P08238, Q9Y4L1, Q16401	0,04

## Annexes

GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006457~protein folding	13	3,83	P30101, Q58FF8, Q9HAV7, P08238, Q9H3N1, P78371, Q8NBS9, Q99471, Q96JJ7, Q13451, Q9Y266, Q12931, P38646	0,35
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0051082~unfolded protein binding	10	2,95	Q58FF8, Q9NYU2, Q9HAV7, P08238, P78371, Q99471, Q9Y266, P38646, Q12931, P68371	0,51
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 3,676671843060184				
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	38	11,21	P00367, P23368, O75964, Q9Y3E5, Q9Y6C9, P53597, Q9UJZ1, O95573, P36776, P33121, O96008, P30837, P05091, P61221, Q9H845, P31040, P52789, P42345, P47985, P27695, Q9HAV7, Q96C36, P49411, Q9P0J0, Q9Y371, P54886, P19367, P38646, Q12931, Q6PI48, Q9NZJ7, P11177, P38117, P31937, Q9Y5Z4, P55809, P07954, Q9NUJ1	0,06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	18	5,31	P00367, P23368, Q9HAV7, Q96C36, P47897, P53597, P36776, P30837, Q12931, P05091, Q6PI48, P61221, P11177, P38117, P31937, P55809, P07954, Q9NUJ1	0,19
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	20	5,90	P47985, P00367, P23368, Q9Y3E5, Q9HAV7, P49411, P53597, P36776, P30837, Q12931, P38646, P05091, Q6PI48, Q9H845, P31040, P11177, P31937, P55809, P07954, Q9NUJ1	0,90
UP_KEYWORDS	Transit peptide	21	6,19	P47985, P00367, P23368, Q9Y3E5, Q9HAV7, P49411, P53597, Q9UJZ1, P36776, P30837, Q12931, P38646, P05091, Q6PI48, Q9H845, P31040, P11177, P31937, P55809, P07954, Q9NUJ1	0,81
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 2,8237154132076787				
UP_KEYWORDS	GTP-binding	19	5,60	P07437, P62820, P00367, Q9Y5P6, Q9BVP2, P49411, Q9NVJ2, P36405, P53597, Q14978, Q9NVA2, Q9H0U4, P68371, P11233, Q96BM9, P62826, P20340, Q13885, Q16181	0,02
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005525~GTP binding	22	6,49	P07437, P62820, P00367, Q9Y5P6, Q9BVP2, P49411, Q9NVJ2, P36405, Q14978, P53597, Q9NVA2, Q9NTK5, Q9H0U4, P68371, Q2NL82, P11233, P08238, Q96BM9, P62826, Q13885, P20340, Q16181	0,04
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:GTP	15	4,42	P62820, P07437, Q9BVP2, P49411, Q9NVJ2, P36405, Q9NVA2, Q9H0U4, P68371, P11233, Q96BM9, P20340, Q13885, P62826, Q16181	1,32
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003924~GTPase activity	13	3,83	P62820, P07437, P49411, Q9BVP2, Q9NVJ2, P36405, P68371, Q2NL82, P11233, Q96BM9, P20340, Q13885, P62826	3,74
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 2,4027579400141272				
UP_SEQ_FEATURE	domain:PCI	5	1,47	P60228, P61201, Q99627, O00231, Q9BT78	0,40
SMART	SM00088:PINT	4	1,18	P60228, P61201, O00231, Q9BT78	2,69
INTERPRO	IPR000717:Proteasome component (PCI) domain	4	1,18	P60228, P61201, O00231, Q9BT78	4,93
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 2,361549217468144				
UP_SEQ_FEATURE	domain:PCI	5	1,47	P60228, P61201, Q99627, O00231, Q9BT78	0,40
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000715~nucleotide-excision repair, DNA damage recognition	5	1,47	P61201, Q99627, Q01831, P09874, Q9BT78	1,53
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0008180~COP9 signalosome	5	1,47	P61201, Q99627, P08238, Q9UJZ1, Q9BT78	5,23
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 2,234162024980518				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0034976~response to endoplasmic reticulum stress	9	2,65	P30101, Q8IXB1, O94874, Q9H3N1, Q8NBS9, P57088, Q13148, Q9Y4L1, Q96JJ7	0,17
INTERPRO	IPR017937:Thioredoxin, conserved site	5	1,47	P30101, Q8IXB1, Q9H3N1, Q8NBS9, Q96JJ7	0,32
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:Prevents secretion from ER	7	2,06	P30101, Q8IXB1, Q9NYU2, Q8NBS9, Q9HCN8, Q9Y4L1, O43852	0,88

## Annexes

INTERPRO	IPR013766:Thioredoxin domain	6	1,77	P30101, Q8IXB1, Q9H3N1, Q8NBS9, Q96JJ7, Q6DKJ4	1,24
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005623~cell	8	2,36	P30101, Q8IXB1, Q9H3N1, P52789, Q8NBS9, Q96JJ7, Q6DKJ4, P19367	3,53
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0045454~cell redox homeostasis	7	2,06	P27695, P30101, Q8IXB1, Q9H3N1, Q8NBS9, Q96JJ7, Q6DKJ4	6,18
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0015036~disulfide oxidoreductase activity	3	0,88	P30101, Q8IXB1, Q9H3N1	7,96
Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 2,0611283456517664				
INTERPRO	IPR011990:Tetratricopeptide-like helical	15	4,42	Q6PGP7, P61201, O75153, Q6ZXV5, Q9Y2Z0, Q13451, O76094, Q9H9A5, Q12797, Q13325, P42345, O00231, Q96EK5, P54920, Q07866	0,07
SMART	SM00028:TPR	9	2,65	Q9H9A5, O76094, Q6PGP7, Q12797, Q6ZXV5, Q13325, Q9Y2Z0, Q13451, Q07866	2,00
UP_KEYWORDS	TPR repeat	10	2,95	O76094, Q6PGP7, Q12797, O75153, Q6ZXV5, Q13325, Q9Y2Z0, P42345, Q13451, Q07866	2,43
INTERPRO	IPR019734:Tetratricopeptide repeat	9	2,65	Q9H9A5, O76094, Q6PGP7, Q12797, Q6ZXV5, Q13325, Q9Y2Z0, Q13451, Q07866	5,37
UP_SEQ_FEATURE	repeat:TPR 3	9	2,65	O76094, Q6PGP7, Q12797, O75153, Q6ZXV5, Q13325, Q9Y2Z0, Q13451, Q07866	6,12
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 1,972596122842297				
UP_KEYWORDS	mRNA processing	18	5,31	Q9H0D6, O75312, Q9BUQ8, Q9UMS4, P55265, Q9UKF6, Q92499, P55769, Q9UKV3, Q9UHX1, Q9H0S4, P62318, Q8N684, Q9H307, Q13148, P61978, P61326, Q6NXG1	0,05
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	13	3,83	Q9UKV3, P55769, Q9UHX1, Q9H0S4, P62318, O75312, Q9H307, Q9UMS4, Q9BUQ8, Q13148, P61326, P61978, Q6NXG1	1,75
Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 1,7675009898893848				
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005198~structural molecule activity	13	3,83	P07437, Q13751, P19012, Q92817, Q03252, Q12797, Q01546, P12035, P08727, Q9H307, P04264, O00231, Q16181	5,73
UP_SEQ_FEATURE	region of interest:Coil 2	6	1,77	Q03252, Q01546, P12035, P19012, P08727, P04264	8,77
INTERPRO	IPR018039:Intermediate filament protein, conserved site	6	1,77	Q03252, Q01546, P12035, P19012, P08727, P04264	8,72
SMART	SM01391:SM01391	6	1,77	Q03252, Q01546, P12035, P19012, P08727, P04264	9,96
Annotation Cluster 23	Enrichment Score: 1,5245072810563958				
KEGG_PATHWAY	hsa00071:Fatty acid degradation	7	2,06	P49189, O95573, P33121, P11766, P30837, Q15067, P05091	1,30
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:NAD	7	2,06	P00367, P23368, P31937, P49189, Q14376, P30837, P05091	3,60
INTERPRO	IPR016163:Aldehyde dehydrogenase, C-terminal	4	1,18	P49189, P54886, P30837, P05091	6,79
INTERPRO	IPR016161:Aldehyde/histidinol dehydrogenase	4	1,18	P49189, P54886, P30837, P05091	6,79
INTERPRO	IPR016162:Aldehyde dehydrogenase, N-terminal	4	1,18	P49189, P54886, P30837, P05091	6,79
INTERPRO	IPR015590:Aldehyde dehydrogenase domain	4	1,18	P49189, P54886, P30837, P05091	6,79

KEGG_PATHWAY	hsa00620:Pyruvate metabolism	6	1,77	P11177, P23368, P49189, P07954, P30837, P05091	6,06
--------------	------------------------------	---	------	--	------

**Effets spécifiques des ions Zn<sup>2+</sup> :**

Category	Term	Count	%	Genes	FDR
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 9,005989029939714				
UP_KEYWORDS	Nucleotide-binding	90	22,11	P51531, Q9H0A0, Q9UHD8, P62070, Q96I59, P31153, O00571, Q15029, P49915, Q9Y230, P49916, Q9BZE4, Q6DD88, Q9Y4I1, P18085, Q92620, Q13523, Q9NRF8, O00148, Q9Y265, P36507, Q9UBT2, P11498, Q9Y285, P23634, P49588, Q92878, P49902, Q8TDD1, Q9NSE4, Q15019, P23258, P41250, P61019, Q9NUU7, P14735, Q6PI48, Q15418, Q14344, Q86UT6, Q16539, P49591, O60488, P62191, Q9Y6K5, Q9NV17, Q9COC9, P40227, Q86XP3, P61026, Q8NCW5, Q9NVA2, Q02750, Q9HCE1, P30085, P23743, P61020, Q6UB35, P54136, P16615, P13861, P78527, Q13546, P00492, P42285, P08243, Q3YEC7, P11217, Q15257, P53602, P28482, P55039, P15170, P38919, P49840, Q13509, O43681, Q96RP9, Q14839, P20020, P54886, Q13838, Q15046, P48637, Q13085, P62330, P57735, P62333, O43795, P23381	0,00
UP_KEYWORDS	ATP-binding	65	15,97	P51531, Q9H0A0, Q96I59, P31153, O00571, P49915, Q9Y230, P49916, Q9Y4I1, Q92620, Q13523, Q9NRF8, O00148, P36507, Q9Y265, Q9UBT2, P11498, Q9Y285, P23634, P49588, Q92878, Q8TDD1, Q9NSE4, P41250, Q9NUU7, P14735, Q6PI48, Q15418, Q86UT6, Q16539, P49591, O60488, P62191, Q9Y6K5, Q9NV17, Q9COC9, P40227, Q86XP3, Q02750, P30085, Q9HCE1, P23743, Q6UB35, P54136, P16615, P78527, Q13546, P42285, P08243, Q15257, P28482, P53602, P38919, P49840, O43681, Q14839, P20020, P54886, Q13838, Q15046, Q13085, P48637, P62333, O43795, P23381	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005524~ATP binding	67	16,46	P51531, Q9H0A0, Q96I59, P31153, O00571, P49915, Q9Y230, P49916, Q9Y4I1, Q92620, Q13523, Q9NRF8, O00148, P36507, Q9Y265, Q9UBT2, P05026, P11498, Q9Y285, P23634, P49588, Q92878, Q9P0J0, Q8TDD1, Q9NSE4, P41250, Q9NUU7, P14735, Q6PI48, Q15418, Q86UT6, Q16539, P49591, O60488, P62191, Q9Y6K5, Q9NV17, Q9COC9, P40227, Q86XP3, Q02750, P30085, Q9HCE1, P23743, Q6UB35, P54136, P16615, P78527, Q13546, P42285, P08243, Q15257, P28482, P53602, P38919, P49840, O43681, Q14839, P20020, P54886, Q13838, Q15046, Q13085, P48637, P62333, O43795, P23381	0,00
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	40	9,83	P51531, Q9NV17, Q9H0A0, Q86XP3, P31153, O00571, P49915, Q02750, Q9Y230, P30085, Q9HCE1, Q6UB35, Q9Y4I1, Q13546, Q13523, P42285, Q92620, P28482, O00148, P36507, Q9Y265, P38919, P49840, Q9UBT2, Q92878, O43681, Q8TDD1, Q14839, P41250, Q9NUU7, Q13838, Q15418, Q15046, P48637, Q13085, Q86UT6, P62333, Q16539, P49591, P62191	0,10
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 8,51986999771523				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	27	6,63	Q9NR46, Q9UHD8, P61026, O00571, Q8WU90, Q9UDY2, P54136, P51610, Q86UP2, Q9Y265, Q99497, P42167, P53990, Q9POL0, Q9Y570, Q15019, Q15020, Q07960, O00560, Q92522, P20810, P26641, O75874, O43795, P78344, A0FGR8, Q6WCQ1	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	28	6,88	Q9NR46, Q9UHD8, P61026, Q8WU90, O00571, Q9UDY2, P54136, P51610, Q86UP2, Q9Y265, Q99497, P42167, P53990, O75955, Q9POL0, Q9Y570, Q15019, O15020, Q07960, O00560, Q92522, P20810, P26641, O75874, O43795, P78344, A0FGR8, Q6WCQ1	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0098641~cadherin binding involved in cell-cell adhesion	27	6,63	Q9NR46, Q9UHD8, P61026, O00571, Q8WU90, Q9UDY2, P54136, P51610, Q86UP2, Q9Y265, Q99497, P42167, P53990, Q9POL0, Q9Y570, Q15019, Q15020, Q07960, O00560, Q92522, P20810, P26641, O75874, O43795, P78344, A0FGR8, Q6WCQ1	0,00
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 4,837900497140334				
UP_KEYWORDS	mRNA processing	25	6,14	P18583, Q12874, Q92797, Q96MU7, O75494, P62306, Q15029, Q8N163, Q9H7N4, Q13838, P62312, Q6UN15, Q92620, P42285, Q13523, P26599, Q08170, O00148, O43390, Q12996, Q6P2Q9, Q9NW13, P38919, P09661, O60506	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA splicing	22	5,41	P18583, Q12874, Q96MU7, O75494, P62306, Q15029, Q8N163, Q9H7N4, Q13838, P62312, Q92620, Q13523, P42285, P26599, Q08170, O00148, O43390, Q6P2Q9, Q9NW13, P38919, P09661, O60506	0,00
UP_KEYWORDS	Spliceosome	14	3,44	Q12874, P62306, Q15029, Q13838, P62312, Q13523, P42285, Q92620, O43390, Q6P2Q9, Q9NW13, P38919, P09661, O60506	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	19	4,67	Q12874, O75494, P62306, Q15029, Q13838, P62312, Q6UN15, Q92620, Q13523, P42285, P26599, Q08170, O00148, O43390, Q12996, Q6P2Q9, P38919, P09661, O60506	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0008380~RNA splicing	16	3,93	P18583, Q12874, P62306, Q15029, Q8N163, Q9H7N4, Q13838, P62312, Q13523, P26599, Q08170, Q6P2Q9, Q9NW13, P38919, P09661, O60506	0,02

GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	11	2,70	Q13523, Q92620, P42285, Q12874, O43390, P62306, Q15029, Q6P2Q9, P38919, P09661, O60506	0,05
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005681~spliceosomal complex	11	2,70	P62312, Q12874, O43390, O00148, P62306, Q15029, Q9NW13, Q8N163, Q6P2Q9, P09661, Q13838	0,06
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 4,714744483600539				
UP_KEYWORDS	Protein biosynthesis	20	4,91	Q9Y285, P49588, Q96RP9, Q96I59, Q9NR50, Q9NSE4, P41250, P54136, P55884, Q6PI48, Q9Y262, P06730, P26641, Q15046, P15170, P49591, P78344, P56537, P63241, P23381	0,00
UP_KEYWORDS	Aminoacyl-tRNA synthetase	10	2,46	Q9Y285, Q15046, P49588, Q96I59, Q9NSE4, P41250, P49591, P54136, P23381, Q6PI48	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006418~tRNA aminoacylation for protein translation	10	2,46	Q9Y285, Q15046, P49588, Q96I59, Q9NSE4, P41250, P49591, P54136, P23381, Q6PI48	0,00
UP_KEYWORDS	Ligase	23	5,65	P11498, Q9Y285, O94874, P49588, Q5T4S7, Q96I59, Q9NSE4, P41250, P49915, P49916, Q9UBE0, P54136, Q6UB35, Q6PI48, Q13085, P48637, Q15046, P08243, Q9NRF8, P49591, O60488, Q9UBT2, P23381	0,00
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0000049~tRNA binding	9	2,21	Q9Y285, Q15046, P49588, Q9NSE4, O43592, Q9HAV4, P18077, P54136, Q6PI48	0,03
INTERPRO	IPR006195:Aminoacyl-tRNA synthetase, class II	6	1,47	Q9Y285, Q15046, Q96I59, P41250, P49591, Q6PI48	0,04
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004812~aminoacyl-tRNA ligase activity	5	1,23	Q9Y285, Q15046, Q96I59, P23381, Q6PI48	0,84
KEGG_PATHWAY	hsa00970:Aminoacyl-tRNA biosynthesis	10	2,46	Q9Y285, Q15046, P49588, Q96I59, Q9NSE4, P41250, P49591, P54136, P23381, Q6PI48	0,74
INTERPRO	IPR018150:Aminoacyl-tRNA synthetase, class II (D/K/N)-like	3	0,74	Q15046, Q96I59, Q6PI48	6,72
INTERPRO	IPR004364:Aminoacyl-tRNA synthetase, class II (D/K/N)	3	0,74	Q15046, Q96I59, Q6PI48	6,72
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 4,139321976916572				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006888~ER to Golgi vesicle-mediated transport	17	4,18	Q9P0L0, Q02388, P13987, Q9BVK6, P49755, Q13561, O15020, Q8N6H7, P61019, O94979, Q6DD88, O43264, O95487, P18085, Q92538, O75935, P54920	0,00
UP_KEYWORDS	ER-Golgi transport	10	2,46	Q9P2W9, O95487, P18085, P49755, P62330, Q8N6H7, P61019, O94979, P54920, O43264	0,14
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006890~retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	8	1,97	Q9P2W9, P18085, Q92538, P49755, Q9BVK6, Q8N6H7, P54920, O43264	5,29
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 4,069152576915378				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005759~mitochondrial matrix	22	5,41	P11498, P23368, Q96C36, Q96RP9, Q96I59, Q8NCW5, Q9P0J1, Q9NSE4, Q8N4T8, P30405, P00505, P41250, Q8N163, Q6UB35, P05091, Q6PI48, Q9Y2Q3, Q15046, P80404, O95299, P36639, Q99497	0,02
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	44	10,81	Q9NVI7, Q9NX20, P23368, Q86Y39, Q96I59, Q8NCW5, Q00796, O14925, O00571, P00505, P30405, P49916, Q6UB35, P05091, P80404, P22307, Q99497, P11498, P25325, Q9BYT8, Q9Y6N5, Q96C36, Q9P0J0, Q96RP9, Q9P0J1, P12236, Q9NSE4, P43304, Q8N4T8, P41250, P54886, Q6PI48, Q15046, P31930, O95299, P49662, P42704, Q8N4H5, Q96920, Q86UT6, P82933, P36639, O60488, P00387	0,03
UP_KEYWORDS	Transit peptide	25	6,14	P11498, Q9NX20, Q9BYT8, P23368, Q9Y6N5, Q96RP9, Q96I59, Q8NCW5, Q9P0J1, Q9NSE4, P43304, P30405, P00505, P49916, Q6UB35, P05091, Q6PI48, P31930, P80404, O95299, P42704, Q96920, Q86UT6, P82933, P36639	0,25
UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	22	5,41	P11498, Q9NX20, P23368, Q9BYT8, Q9Y6N5, Q96RP9, Q96I59, Q9P0J1, Q9NSE4, P43304, P30405, P00505, Q6UB35, P05091, Q6PI48, P80404, O95299, P31930, P42704, Q96AB3, Q86UT6, P82933	1,44
Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 3,873383663564925				

Annexes

GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	16	3,93	Q12769, Q8WUM0, O75494, Q9NUU7, P52948, Q13838, Q5SRE5, P06730, P12270, Q6UN15, Q92620, Q08170, O00148, P57740, P38919, P63241	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006405~RNA export from nucleus	9	2,21	P06730, Q5SRE5, P12270, Q92620, Q08170, O00148, P38919, P52948, Q13838	0,07
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006369~termination of RNA polymerase II transcription	8	1,97	Q6UN15, Q92620, Q08170, O00148, P62306, Q12996, P38919, Q13838	1,26
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031124~mRNA 3'-end processing	7	1,72	Q6UN15, Q92620, Q08170, O00148, Q12996, P38919, Q13838	1,84
Annotation Cluster 8	Enrichment Score: 3,8525882951816426				
INTERPRO	IPR027417:P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	45	11,06	P51531, Q9NVI7, Q86XP3, Q9UHD8, P62070, P61026, Q9NVA2, O00571, Q15029, Q9UDY2, Q9Y230, P30085, Q9HCE1, Q6UB35, P61020, Q9BZE4, Q6DD88, Q9Y411, P18085, Q92620, P42285, Q9NRF8, Q3YEC7, O00148, Q5K651, P15170, Q9Y265, P38919, P55039, Q92878, Q96RP9, O43681, Q8TDD1, Q14839, Q15019, Q9NUU7, P61019, Q13838, Q14344, O95299, P62330, P57735, P62333, O43795, P62191	0,00
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:GTP	20	4,91	Q13509, Q9UHD8, P62070, Q96RP9, P61026, Q9NVA2, Q15019, P23258, Q15029, P61020, Q9BZE4, P61019, Q6DD88, Q14344, P18085, Q3YEC7, P57735, P62330, P15170, P55039	0,03
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003924~GTPase activity	18	4,42	Q13509, Q9UHD8, P62070, Q96RP9, P61026, O00571, P23258, Q15029, P61020, P61019, Q9BZE4, Q6DD88, Q14344, P18085, P62873, P62330, P36639, P15170	0,06
UP_KEYWORDS	GTP-binding	20	4,91	Q13509, Q9UHD8, P62070, Q96RP9, P61026, Q9NVA2, Q15019, P23258, Q15029, P61020, Q9BZE4, P61019, Q6DD88, Q14344, P18085, Q3YEC7, P57735, P62330, P15170, P55039	0,08
INTERPRO	IPR005225:Small GTP-binding protein domain	12	2,95	P18085, Q9UHD8, P62070, P61026, Q96RP9, P62330, P57735, Q15029, P61020, P55039, Q9BZE4, P61019	1,58
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005525~GTP binding	20	4,91	Q13509, Q9UHD8, P62070, Q96RP9, P61026, Q9NVA2, Q15019, P23258, Q15029, P61020, Q9BZE4, P61019, Q6DD88, Q14344, P18085, Q3YEC7, P57735, P62330, P15170, P55039	2,83
Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 3,6094860017513435				
UP_KEYWORDS	Helicase	14	3,44	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, Q9Y230, Q9HCE1, Q9Y265, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,01
SMART	SM00490:HELICc	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,04
SMART	SM00487:DEXDc	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,05
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase C-terminal	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,11
UP_SEQ_FEATURE	domain:Helicase ATP-binding	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,18
INTERPRO	IPR001650:Helicase, C-terminal	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,18
INTERPRO	IPR011545:DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal	9	2,21	Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,18
INTERPRO	IPR014014:RNA helicase, DEAD-box type, Q motif	7	1,72	Q86XP3, Q8TDD1, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,20
INTERPRO	IPR014001:Helicase, superfamily 1/2, ATP-binding domain	11	2,70	P51531, Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, Q14839, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,21
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004004~ATP-dependent RNA helicase activity	9	2,21	Q92620, P42285, Q86XP3, Q8TDD1, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,20
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:Q motif	7	1,72	Q86XP3, Q8TDD1, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,23
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010501~RNA secondary structure unwinding	7	1,72	Q86XP3, Q8TDD1, O00148, O00571, P38919, Q9NUU7, Q13838	0,92

Annexes

UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:DEAD box	5	1,23	Q86XP3, Q8TDD1, O00571, P38919, Q9NUU7	9,15
Annotation Cluster 10	Enrichment Score: 3,5805143820662533				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006406~mRNA export from nucleus	16	3,93	Q12769, Q8WUM0, O75494, Q9NUU7, P52948, Q13838, Q5SRE5, P06730, P12270, Q6UN15, Q92620, Q08170, O00148, P57740, P38919, P63241	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005635~nuclear envelope	17	4,18	Q12769, Q8WUM0, O43633, Q03001, P43034, P09874, P52948, Q5SRE5, P12270, P02545, Q9UNN5, P50995, Q8WUX9, P57740, P57088, P42167, P53990	0,00
UP_KEYWORDS	mRNA transport	13	3,19	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, P42704, P57740, O00425, P38919, P52948, Q9NUU7, P63241, Q9UN86, Q13838	0,00
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005643~nuclear pore	11	2,70	Q12769, P12270, Q8WUM0, Q8TEX9, P57740, O43592, P57088, P52948, Q9NUU7, P63241, O00410	0,01
UP_KEYWORDS	Translocation	11	2,70	Q9H173, Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, Q15629, O14925, P57740, P52948, Q9NUU7, P63241	0,01
UP_KEYWORDS	Nuclear pore complex	8	1,97	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, P57740, P52948, Q9NUU7, P63241	0,07
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006409~tRNA export from nucleus	7	1,72	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, P57740, O43592, P52948	0,15
GOTERM_BP_DIRECT	GO:1900034~regulation of cellular response to heat	9	2,21	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, P28482, P57740, O75190, Q8N163, P52948	0,64
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0016925~protein sumoylation	11	2,70	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, Q9Y2X3, P57740, Q9UBE0, P09874, P52948, Q8N3U4, Q9UBT2	0,76
KEGG_PATHWAY	hsa03013:RNA transport	17	4,18	Q12769, O14744, Q8WUM0, Q9NR50, Q96F07, P55884, P52948, Q13838, Q5SRE5, P06730, P12270, Q7L576, P57740, O43592, Q9HAV4, P38919, P78344	0,63
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007077~mitotic nuclear envelope disassembly	7	1,72	Q5SRE5, Q12769, P12270, P02545, Q8WUM0, P57740, P52948	0,92
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010827~regulation of glucose transport	6	1,47	Q5SRE5, Q12769, P12270, Q8WUM0, P57740, P52948	1,65
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031080~nuclear pore outer ring	4	0,98	Q12769, Q8WUM0, P57740, P52948	1,64
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0017056~structural constituent of nuclear pore	5	1,23	Q5SRE5, Q8WUM0, P57740, P57088, P52948	1,94
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005487~nucleocytoplasmic transporter activity	5	1,23	Q12769, P12270, Q8WUM0, P57740, P52948	2,33
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051292~nuclear pore complex assembly	4	0,98	P12270, P57740, P57088, P52948	3,13
Annotation Cluster 11	Enrichment Score: 3,505909546712004				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005769~early endosome	20	4,91	Q02818, Q9BUN8, O75955, Q96QK1, P01130, P11717, Q02750, P61020, Q2M389, Q12768, Q9Y4I1, P61421, Q92544, Q9UBQ0, P28482, Q15075, P62330, O43795, P09429, P36507	0,00
KEGG_PATHWAY	hsa04144:Endocytosis	23	5,65	Q9NP79, Q96QK1, Q9BPX5, Q9NR46, O43633, P01130, O15144, Q9UNH7, P61026, P11717, Q8N6H7, P61020, Q2M389, Q03135, Q12768, Q9NRW7, Q92538, Q9UBQ0, Q8WUX9, Q15075, P62330, Q00610, P53990	0,07
Annotation Cluster 12	Enrichment Score: 3,371133497309924				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0019083~viral transcription	15	3,69	Q12769, Q8WUM0, P46777, P46779, P05388, P25398, P52948, Q5SRE5, P12270, P62249, P62888, P62917, P62906, P57740, P18077	0,00
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006413~translational initiation	15	3,69	P46777, P46779, P05388, Q9NR50, P25398, P55884, Q9Y262, P06730, P62249, P62888, P62917, P62906, P18077, P78344, P56537	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006364~rRNA processing	18	4,42	P46777, P46779, P05388, Q9Y2X3, P25398, Q9BV38, Q14690, P62249, Q9UNX4, P42285, P62888, P62917, P62906, Q9Y3A5, P18077, P38919, Q9GZL7, Q13895	0,02



## Annexes

UP_KEYWORDS	Ribonucleoprotein	19	4,67	Q9NX20, P46777, P46779, Q9Y2X3, P05388, P62306, Q15029, P25398, P62249, P62312, P62888, P62917, P62906, O43390, Q6P2Q9, P18077, P82933, P09661, O60506	0,04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	11	2,70	P62249, P62888, P46777, P05388, P46779, P62917, P62906, P25398, P18077, P15170, P38919	0,86
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006412~translation	16	3,93	Q9NX20, P46777, P46779, P05388, P12236, Q15029, P25398, P62249, P62888, P62917, P62906, P18077, P82933, P49591, O00425, P23381	1,71
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	9	2,21	P62249, P62888, P46777, P05388, P46779, P62917, P62906, P25398, P18077	2,83
UP_KEYWORDS	Ribosomal protein	11	2,70	P62249, Q9NX20, P62888, P46777, P05388, P46779, P62917, P62906, P82933, P25398, P18077	5,07
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	7	1,72	P62888, P46777, P05388, P46779, P62917, P62906, P18077	5,48
Annotation Cluster 13	Enrichment Score: 2,7154274308905815				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0034399~nuclear periphery	7	1,72	P12270, Q92973, Q8TEX9, O14787, P57740, P52948, O00410	0,01
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000059~protein import into nucleus, docking	5	1,23	Q92973, Q8TEX9, O14787, P52948, O00410	0,03
INTERPRO	IPR001494:Importin-beta, N-terminal	6	1,47	Q92973, Q8TEX9, O14787, O43592, Q9HAV4, O00410	0,04
SMART	SM00913:SM00913	5	1,23	Q92973, Q8TEX9, O14787, O43592, Q9HAV4	0,23
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008536~Ran GTPase binding	6	1,47	Q92973, Q8TEX9, O14787, O43592, Q9HAV4, O00410	0,91
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006610~ribosomal protein import into nucleus	4	0,98	Q92973, Q8TEX9, O14787, O00410	1,13
INTERPRO	IPR011989:Armado-like helical	14	3,44	Q9H173, O94915, Q13835, Q9BTW9, Q92973, Q92797, Q8TEX9, O14787, Q99460, P78527, Q9Y376, Q9HAV4, O43592, O00410	1,93
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006886~intracellular protein transport	15	3,69	Q9P2W9, Q9H173, Q96QK1, Q92973, Q9UNH7, P49755, Q8TEX9, O14787, O95487, Q9NRW7, Q9UBQ0, Q00610, O43592, P54920, O00410	2,46
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008565~protein transporter activity	8	1,97	Q96QK1, Q92973, Q9UBQ0, Q8N4H5, Q8TEX9, Q8WUX9, O14787, O00410	2,20
UP_SEQ_FEATURE	domain:Importin N-terminal	4	0,98	Q92973, Q8TEX9, O14787, O00410	4,08
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0008139~nuclear localization sequence binding	5	1,23	Q92973, Q8TEX9, O14787, P52948, O00410	5,73
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 1	6	1,47	Q9BTW9, Q92973, Q8TEX9, O14787, P78527, O00410	9,84
UP_SEQ_FEATURE	repeat:HEAT 2	6	1,47	Q9BTW9, Q92973, Q8TEX9, O14787, P78527, O00410	9,84
COG_ONTOLOGY	Intracellular trafficking and secretion	6	1,47	O95487, Q92973, Q9NRW7, Q8TEX9, O14787, O00410	6,67
Annotation Cluster 14	Enrichment Score: 2,4697967089251955				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0038061~NIK/NF-kappaB signaling	10	2,46	P20618, O43242, P25786, Q13616, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191, Q04864	0,04
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043488~regulation of mRNA stability	12	2,95	P20618, O43242, Q01105, P25786, Q92973, Q9Y5A9, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191, P04792	0,05

## Annexes

GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000502~proteasome complex	9	2,21	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191, P04792	0,07
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051437~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in regulation of mitotic cell cycle transition	10	2,46	P20618, O43242, O43684, P25786, Q13616, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	0,12
UP_KEYWORDS	Proteasome	8	1,97	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	0,11
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006521~regulation of cellular amino acid metabolic process	8	1,97	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	0,31
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051436~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	9	2,21	P20618, O43242, O43684, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	0,44
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031145~anaphase-promoting complex-dependent catabolic process	9	2,21	P20618, O43242, O43684, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	0,91
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0090263~positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	11	2,70	P20618, Q96QK1, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, Q8N163, P60900, P62191, Q03135	0,92
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002479~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	8	1,97	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	1,15
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	8	1,97	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	1,20
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000165~MAPK cascade	16	3,93	P20936, O43242, P25786, O15020, Q99460, Q02750, Q15121, P35609, Q03135, P20618, P28482, P51665, P62333, P60900, P36507, P62191	2,41
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0060071~Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	9	2,21	P20618, O43242, P25786, Q00610, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	2,47
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0002223~stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	9	2,21	P20618, O43242, P25786, Q13616, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	5,60
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0000209~protein polyubiquitination	12	2,95	P20618, Q9Y4X5, O43242, P25786, Q8NEZ5, P29144, Q13616, P51665, P62333, Q99460, P60900, P62191	7,11
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0090090~negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	11	2,70	P20618, O43242, P25786, P51665, P62333, Q99460, Q16539, P60900, P62191, P49840, Q03135	8,69
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0022624~proteasome accessory complex	4	0,98	O43242, P62333, Q99460, P62191	8,03
Annotation Cluster 15	Enrichment Score: 2,4581226352619585				
UP_KEYWORDS	Neuropathy	9	2,21	P02545, Q15046, Q27J81, P49588, Q03001, Q9NSE4, P41250, P04792, Q6DD88	0,55
UP_KEYWORDS	Charcot-Marie-Tooth disease	6	1,47	P02545, Q15046, Q27J81, P49588, P41250, P04792	4,35
Annotation Cluster 16	Enrichment Score: 2,4099614203733393				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0071013~catalytic step 2 spliceosome	11	2,70	Q13523, Q92620, P42285, Q12874, O43390, P62306, Q15029, Q6P2Q9, P38919, P09661, O60506	0,05

## Annexes

GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030529~intracellular ribonucleoprotein complex	11	2,70	Q96PK6, Q12906, P42704, P46777, P05388, O43390, Q15029, P38919, P09661, Q9UN86, O60506	1,30
Annotation Cluster 17	Enrichment Score: 2,3658277528953677				
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006890~retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	8	1,97	Q9P2W9, P18085, Q92538, P49755, Q9BVK6, Q8N6H7, P54920, O43264	5,29
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0048205~COPI coating of Golgi vesicle	3	0,74	Q92538, P49755, Q9BVK6	5,37
Annotation Cluster 18	Enrichment Score: 2,1275769825965325				
INTERPRO	IPR016040:NAD(P)-binding domain	12	2,95	P51659, P30043, P23368, Q96C36, Q00796, Q8N4T8, Q8IX04, Q13630, Q9UBE0, Q49A26, Q6UB35, Q9UBT2	2,75
UP_KEYWORDS	NAD	11	2,70	P51659, P23368, Q8NCW5, Q00796, Q8N4T8, Q8IX04, Q49A26, P09874, P00387, P05091, Q6BCY4	3,44
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	22	5,41	P51659, P23368, Q96C36, Q9Y6N5, P43304, Q00796, Q8N4T8, Q8IX04, Q13630, P04040, P54886, Q49A26, P31350, P16435, P05091, P30043, O75874, P13674, P37268, P30519, P00387, Q6BCY4	7,96
Annotation Cluster 21	Enrichment Score: 1,9104362793346716				
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0000776~kinetochore	9	2,21	Q12769, P12270, O43684, O43670, Q13561, P57740, P43034, P52948, O43264	0,61
UP_KEYWORDS	Kinetochore	8	1,97	P12270, O43684, Q8WUM0, O43670, Q15019, P57740, O75935, O43264	4,63
UP_KEYWORDS	Centromere	9	2,21	P12270, O43684, Q8WUM0, O43670, Q15019, P57740, O75935, Q8N3U4, O43264	7,74
Annotation Cluster 29	Enrichment Score: 1,605902107166464				
UP_KEYWORDS	Cell cycle	24	5,90	P18583, O43684, O43670, Q9UHD8, Q92878, Q9NVA2, Q15019, P43034, Q8N163, P49916, Q8N3U4, Q9UKG1, P51610, O43264, P12270, Q15418, Q09028, P50995, P28482, O75935, P62330, Q00610, Q9Y265, P53990	6,95
UP_KEYWORDS	Centromere	9	2,21	P12270, O43684, Q8WUM0, O43670, Q15019, P57740, O75935, Q8N3U4, O43264	7,74

## Annexe 4 : Communications scientifiques

### Articles scientifiques :

- ✓ F. Dussert, G. Sarret, K.D. Wegner, O. Proux, G. Landro, P.H. Jouneau, P. Reiss and M. Carriere. Fate of multi-shell InP-based quantum dots during simulating sunlight irradiations in a climatic chamber and identification of secondary products. (Article en cours)
- ✓ F. Dussert, K.D. Wegner, C. Moriscot, B. Gallet, P. Reiss and M. Carriere. Toxicological effects of shell designed InP quantum dots on human primary keratinocytes upon environmental aging. (Article en cours)
- ✓ A. Rosset, V. Bartolomei, J. Laisney, N. Shandilya, H. Voisin, J. Morin, I. Michaud-Soret, I. Capron, H. Wortham, G. Brochard, V. Bergé, M. Carriere, F. Dussert, O. Le Bihan, C. Dutouquet, D. Truffier-Boutry, S. Clavaguera and S. Artous. Towards the development of Safer by Design TiO<sub>2</sub>-based photocatalytic paint: impacts and performances. (Article soumis à Environmental Science: Nano)
- ✓ K.D. Wegner, F. Dussert, D. Truffier-Boutry, A. Benayad, D. Beal, L. Mattera, W.L Ling, M. Carriere and P. Reiss. Influence of the Core/Shell Structure of Indium Phosphide Based Quantum Dots on Their Photostability and Cytotoxicity. *Frontiers in Chemistry*, 2019
- ✓ A. Tarantini, K.D. Wegner, F. Dussert, G. Sarret, D. Beal, L. Mattera, C. Lincheneau, O. Proux, D. Truffier-Boutry, C. Moriscot, B. Gallet, P.H. Jouneau, P. Reiss and M. Carriere. Toxicity of pristine vs. aged indium-based quantum dots: a safer-by-design study. *Nanoimpact*, 2018

### Communication orale :

- ✓ **Présentation orale** : Conférence SFnano/C'nano, Dijon 2019
- ✓ **Présentation orale** : Séminaire interne du SyMMES 2019, Eybens
- ✓ **Présentation orale** : Journée des doctorants EDCSV-2019, Grenoble
- ✓ **Présentation orale** : Journée des doctorants-Air ADEME-2019, Paris
- ✓ **Présentation orale** : Journée des doctorants ADEME-2019, Angers
- ✓ **Présentation orale** : Séminaire annuel du Labex SERENADE, Aix en Provence
- ✓ **Poster** : Journée des doctorants ADEME-2018, Valbonne
- ✓ **Présentation orale** : Workshop à l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Canada)
- ✓ **Présentation orale** : Conférence internationale Nanosafe 2018 (Grenoble, France)
- ✓ **Poster** : Conférence internationale NanoTox 2018 (Neuss, Allemagne)





---

# Résumé/Abstract

---

Les quantum dots (QD) sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents aux propriétés optiques exceptionnelles, ce qui les rend particulièrement attractifs dans les domaines de l'optoélectronique et pour les applications biomédicales. Cependant, au cours de leur cycle de vie, le vieillissement des QDs peut conduire à la dégradation de ces composés, induisant la libération d'éléments toxiques. Même si les études de toxicité sur les QDs à base d'indium sont peu nombreuses, certaines révèlent une toxicité intrinsèque plus faible que les QDs contenant des métaux lourds comme le Cd. Dans ce contexte, notre laboratoire synthétise différents QDs d'InP recouverts de coquilles, conçus par une approche « *safer by design* », dans le but de produire des QDs moins toxiques avec de meilleures propriétés optiques. Ces QDs sont constitués d'une structure cœur/coquille de InZnP/Zn (Se,S) qui est recouverte, ou non, d'une couche additionnelle de ZnS, épaisse ou mince. Dans cette étude, des kératinocytes primaires humains, issus de chirurgies mammaires, sont exposés aux QDs, après synthèse ou après vieillissement environnemental simulé. Dans un premier temps, les transformations physico-chimiques des QDs au cours du vieillissement sont caractérisées et mettent en évidence d'importantes modifications photophysiques et structurales ainsi que la formation de produits de transformation. Néanmoins, les résultats montrent que les transformations physico-chimiques des QDs sont ralenties par la présence de la double coquille, notamment lorsqu'elle est épaisse. Dans un second temps, l'évaluation de la toxicité des QDs est effectuée et de nouveaux tests sont développés en criblage à haut contenu (HCS) sur un microscope automatisé. Alors que les QDs non vieillis se sont révélés relativement stables et peu toxiques pour les cellules, il n'en fût pas de même pour leurs produits de dégradation. L'exposition des cellules aux QDs vieillis a mis en évidence une forte toxicité à faibles concentrations, modifiant l'expression de certains gènes et protéines essentiels à l'homéostasie cellulaire. Ces résultats montrent que les nouvelles générations de QDs sont plus sûres. Cependant, il est important de continuer à améliorer leur photostabilité puisque leur dissolution et le relargage d'éléments toxiques en fin de vie sont inévitables pour le moment.

Quantum dots (QDs) are fluorescent semiconductor nanocrystals with exceptional optical properties, which make them particularly attractive in optoelectronic fields and for biomedical applications. However, during their life cycle, the aging of QDs can lead to the degradation of these compounds, inducing the release of toxic elements. Even if toxicity studies on indium-based QDs are still limited, they show a lower intrinsic toxicity in comparison to the heavy metal containing Cd-based QDs. In this context, our laboratory synthesizes different InP QDs with different shell designs, following a "safer by design" approach, with the aim of producing less toxic QDs with better optical properties. These QDs are composed of a InZnP/Zn(Se,S) core/shell structure which is covered or not by a thick or a thin additional ZnS layer. In this study, primary human keratinocytes which come from breast surgeries, were exposed to these QDs, either pristine or after simulating environmental weathering. First, the physico-chemical transformations of QDs during aging are characterized. Significant photophysical and structural modifications are highlighted and transformation products are identified. However, the results show that these physico-chemical transformations are slowed down by the presence of a double shell, especially when it is thick. Then, the evaluation of QDs toxicity are performed and new assays are developed via high content screening (HCS) on an automated microscope. While pristine QDs were relatively stable and not very toxic to cells, it was not true for their degradation products. Exposure of cells to aged QDs demonstrated high toxicity at low concentrations and modified the expression of some genes and proteins essential for cellular homeostasis. These results show that new generations of QDs are safer. However, it's important to keep improving their photostability since their dissolution and the release of toxic elements at the end of their life are still inevitable.