

Étude de toxicité *in vitro* et *in vivo* de boîtes quantiques contenant du cadmium et synthétisées par voie aqueuse

Période : septembre 2011 à décembre 2011

Bertrand BOCQUET

Université Lille1 – IEMN – UMR CNRS 8520 – Villeneuve d'Ascq

Mots clés : Boite quantique, Boite quantique à base de cadmium, Boite quantique synthétisée par voie aqueuse, Cytotoxicité, In vitro, In vivo, Microfluidique, Nanomatériau, Nanotoxicité, Nanotoxicologie

Nous constatons actuellement une consommation croissante de nanomatériaux fonctionnels comme par exemple, les nanotubes de carbone, les nanofils de silicium, les nanoparticules d'or ou d'argent ou encore les boîtes quantiques (quantum dots – QDs⁽¹⁾), qui possèdent des propriétés électriques, mécaniques ou optiques spécifiques. Nous nous intéresserons aux QDs et à leur toxicité.

Elles sont utilisées principalement comme sondes fluorescentes dans le domaine médical pour relever des contrastes en imagerie ou comme marqueur pour des analyses biologiques. L'intérêt principal de cette technologie par rapport à des marqueurs fluorescents naturels à base de protéines, est de deux ordres : une très grande photostabilité et des émissions précises en longueur d'onde stimulées facilement par des sources lumineuses à large bande de longueur d'onde.

Ces caractéristiques devraient voir l'émergence de ces QDs à grande échelle. Leur production industrielle est aussi un facteur clé dans cette émergence. L'essentiel des synthèses de QD passe par des voies organiques, suivies généralement d'un traitement les rendant hydrophiles et permettant de réduire le relargage toxique des ions cadmium. En revanche, l'augmentation de la taille des nanoparticules contrarie leur élimination par l'organisme. Il commence à émerger une nouvelle famille de QDs synthétisées par voie aqueuse (aqueous quantum dots – aQDs⁽²⁾), plus petites, plus simples à produire et moins polluantes en termes de fabrication. La filière technologique correspondante ne nécessite pas de traitement de surface puisqu'elles sont naturellement hydrophiles. Ces nanoparticules sont en général directement injectées aux patients. La question de leur toxicité, encore peu étudiée aujourd'hui, est posée. Nous examinerons les études de cytotoxicité de cette nouvelle classe de QDs par deux équipes.

Distribution, pharmacocinétique et toxicité *in vivo* de boîtes quantiques contenant du cadmium et synthétisées par voie aqueuse

Su Y, Peng F, Jiang Z, Zhong Y, Lu Y, Jiang X, Huang Q, Fan C, Lee ST, He Y. *In vivo* distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. *Biomaterials*. 2011; 32: 5855-5862

Résumé

L'article s'intéresse à une nouvelle classe de quantum dots (QDs) synthétisées par voie aqueuse (aqQDs) qui présente l'avantage d'être hydrophile, de petite taille, de synthèse plus simple et moins polluante en termes de fabrication. Par conséquent, par rapport à des QDs obtenues par voie organique, le traitement de surface (enveloppe hydrophile de polymère ou de silice par exemple) n'est pas nécessaire.

Les études *in vivo*⁽³⁾ à court et long terme, menées par les auteurs, tendent à combler le manque de connaissance de la toxicité des aqQDs. Elles sont effectuées sur des groupes de 4 à 5 souris à des temps différents (30 min, 1 h, 4 h, 15 j, 80 j) et pour des tailles différentes de QDs (2,8 nm, 3,2 nm, 4,5 nm). Ces groupes sont comparés à un groupe témoin. Une concentration de 0,2 nmol de aqQDs dans un volume de 0,1 ml est injectée par voie intraveineuse. Les animaux sont sacrifiés et les organes prélevés

(cœur, foie, rate, poumon, rein, intestin). Ils sont examinés en ICP-MS⁽⁴⁾ pour détecter la quantité d'ions cadmium présents. Ces grandeurs serviront à quantifier un taux d'accumulation défini par le pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

Dès 30 min après l'injection, les nanoparticules s'accumulent principalement dans le foie avec un pic d'accumulation à 4 h d'environ 30 % de la quantité injectée. Puis, progressivement, les QDs vont migrer et s'accumuler de plus en plus dans le rein avec un pic à 80 j pouvant monter à 40 % de la quantité injectée. Il est intéressant de noter que les nanoparticules les plus grosses (4,5 nm) sont moins facilement piégées par le rein mais qu'on les retrouve à la même concentration dans le foie et la rate 4 h après l'injection. Contrairement aux QDs obtenus par voie organique, le métabolisme des plus grosses aqQDs passe aussi par la rate.

L'étude histologique sur les tissus prélevés est effectuée à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence. Elle ne montre pas d'anomalie apparente, ni de lésion pour les différentes QDs étudiées.

La toxicité induite *in vivo* est plus difficile à quantifier. Une analyse biochimique est effectuée à l'aide de 5 marqueurs analysant principalement les dysfonctionnements du foie et du rein. On distingue les jeunes souris sacrifiées âgées de moins de 2 mois des plus âgées qui peuvent présenter des variations des paramètres biochimiques naturels liées à l'âge. Les trois tailles

de QDs sont prises en compte. Les résultats montrent que les données biochimiques restent semblables pendant toutes les durées d'examen. L'explication pourrait être que la quantité d'ions métalliques reste à un niveau modeste par rapport à leurs présences en conditions normales (Hauck *et al.*, 2010).

Enfin, la mesure du poids des souris sur toute la période ne montre pas de différence entre les souris traitées et le groupe de référence.

Commentaire

Cette étude est intéressante par son caractère *in vivo* sur une nouvelle famille de QDs qui, à la vue de son mode d'élaboration, pourrait aboutir à leur production en grand nombre. Il est intéressant de noter que, bien que les auteurs ne soient pas issus d'un laboratoire de biologie, la question posée est clairement de fabriquer des objets nanométriques présentant une toxicité la plus faible possible. Nous voyons bien apparaître une circulation de ces nanoparticules au cours du temps dans l'organisme, avec des accumulations ciblées dans le foie (et la rate pour les plus grosses) au temps court. Il y a progressivement migration et accumulation dans le rein. Les études histologiques, biochimiques et de poids ne montrent pas de dégradation apparente physique ou fonctionnelle des tissus.

Cytotoxicité des boîtes quantiques contenant du cadmium

Chen N, He Y, Su Y, Li X, Huang Q, Wang H, Zhang X, Tai R, Fan C. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials*. 2012; 33: 1238-1244

Résumé

L'article s'intéresse à une étude de cytotoxicité de boîtes quantiques (QDs) synthétisées par voie aqueuse. Dans un autre article (Su *et al.*, 2010), les auteurs avaient mis en évidence une relation entre le relargage d'ions cadmium (Cd^{2+}) et des nanoparticules simples ($CdTe^{(5)}$) ou ayant des enveloppes multiples ($CdTe/CdS^{(6)}/ZnS^{(7)}$). Une relation directe avait été mise en évidence entre la cytotoxicité des QDs et les ions cadmium. En allant plus avant, ils ont montré que les aqQDs CdTe étaient plus toxiques que des solutions de $CdCl_2$, alors que la concentration en ion Cd^{2+} était identique, montrant une action plus spécifique des nanoparticules. C'est cette spécificité que les auteurs cherchent à appréhender ici.

Les auteurs avaient employé la méthode classique MTT⁽⁸⁾ qui reflète l'activité métabolique des cellules mais cette activité n'est pas toujours corrélée à d'autres facteurs comme la croissance, la prolifération ou l'apoptose. Cette nouvelle étude est centrée sur la prolifération cellulaire de HEK293⁽⁹⁾. Différentes concentrations de aqQDs sont étudiées allant de 37,5 nM⁽¹⁰⁾ (pas d'altération significative) à 600 nM (inhibition complète). La comparaison avec leurs travaux antérieurs utilisant la méthode MTT montre que pour les concentrations faibles à moyennes, la cytotoxicité est liée à l'inhibition de l'activité métabolique, suggérant la génération de radicaux libres comme l'oxygène. Ce stress oxydatif

entraîne une perte de fonctions métaboliques. La distinction doit être faite entre la génération des Cd^{2+} et une action spécifique des QDs dans la genèse du stress oxydatif. Une étude est menée avec du $CdCl_2$ en solution de 5 000 nM (pas de changement significatif) à 100 000 nM (inhibition complète). Une quantification des ions Cd^{2+} intracellulaire est faite par ICP-MS pour relier ces mesures. Pour des valeurs intermédiaires de concentration de $CdCl_2$ ou de aqQDs corrélées aux effets d'inhibition, on retrouve des teneurs en Cd^{2+} supérieures à 20 ng/10⁵ cellules avec 10 000 nM de $CdCl_2$ contre des teneurs inférieures à 10 ng/10⁵ cellules avec 150 nM de CdTe. Or, la présence de ces QDs a une action inhibitrice sur la prolifération cellulaire bien plus élevée suggérant d'autres mécanismes d'action.

Les auteurs ont effectué une étude complémentaire en expression de gènes sur les cellules HEK293 pour les deux traitements en condition de basse toxicité (37,5 nM de aqQDs et 10 000 nM de $CdCl_2$) et haute toxicité (300 nM de aqQDs et 60 000 nM de $CdCl_2$). La sur-régulation de métalloprotéines ne dépend pas du dosage et renforce les conclusions issues des mesures ICP-MS. Pour le traitement avec $CdCl_2$, où les ions Cd^{2+} sont l'unique raison de la toxicité, la sur-régulation est nettement plus élevée qu'avec les QDs, résultat confirmé par les mesures ICP-MS. Par contre, il n'y a pas de différences significatives d'expression entre QDs et $CdCl_2$, suggérant que ce sont bien les ions Cd^{2+} qui créent des expressions différenciées et non pas une influence spécifique des QDs au niveau de l'expression des gènes.

Par conséquent, d'où peut provenir cette toxicité différenciée ? L'hypothèse testée par les auteurs est celle d'un regroupement localisé des QDs au sein même des cellules. Leurs études antérieures en fluorescence montrent une localisation privilégiée dans le cytoplasme peri-nucléaire. Afin de gagner en résolution spatiale, un microscope à rayons X en transmission (STXM⁽¹¹⁾) est utilisé pour observer des cellules HeLa⁽¹²⁾ déshydratées, soumises au préalable à des QDs à double enveloppe. On retrouve alors des images à concentrations hétérogènes en QDs dans le cytoplasme. Cette distribution est ici caractérisée spécifiquement pour le cas des QDs à enveloppes multiples qui pourraient s'accumuler dans des zones privilégiées, par exemple autour du noyau ou dans des organelles comme les mitochondries. Ces concentrations localisées sont responsables de la cytotoxicité plus grande liée spécifiquement aux nanoparticules. Ces regroupements de QDs sont susceptibles de créer localement des concentrations importantes d'ions Cd^{2+} et d'agir sur des fonctions vitales des cellules, entraînant un ralentissement dans la prolifération cellulaire.

Commentaire

Nous nous intéressons ici à une nouvelle classe de QDs synthétisées par voie aqueuse peu étudiées en cytotoxicité. L'article est intéressant dans la mesure où il montre de façon convaincante un effet spécifique des aqQDs dépassant le cadre classique des effets des ions Cd^{2+} . La mise en œuvre d'une imagerie de très haute résolution pouvant atteindre 50 nm permet d'observer les distributions hétérogènes de QDs à double enveloppe. Sans doute pour des raisons techniques, cette imagerie est pratiquée

sur des cellules épithéliales HeLa différentes des cellules étudiées dans le contenu principal de l'article. Les auteurs observent une distribution hétérogène de la concentration de nanoparticules dans le cytoplasme des cellules. Ils émettent l'hypothèse que la concentration locale de boîtes quantiques dans des organelles internes des cellules vivantes peut jouer un rôle délétère sur la prolifération cellulaire au sein des cellules.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces articles s'intéressent à des boîtes quantiques (quantum dots - QD) synthétisées par voie aqueuse (aqQDs). Nous obtenons alors des tailles de particules très faibles et exploitables sans traitement particulier en médecine ou en biologie. Néanmoins, elles ont un potentiel de toxicité plus élevé compte tenu du relargage facilité d'ions Cd²⁺.

L'étude *in vivo* s'intéresse aux effets à court et long terme sur des souris. Après une injection, les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans le foie entre 30 min et 4 h, et dans le rein et la rate pour les nanoparticules plus grosses (4,5 nm). Elles migrent ensuite préférentiellement vers le rein entre 15 j et 80 j. L'histologie des organes observés dans l'étude, les analyses biochimiques et les mesures de poids ne montrent pas d'effet de toxicité des aqQDs sur le court et long terme.

Les études *in vitro*⁽¹³⁾ réalisées antérieurement en comparant des aqQDs et des QDs multi-enveloppes synthétisées par voie organique montrent une cytotoxicité plus grande des aqQDs. En effet, plus le nombre d'enveloppes est grand, moins le taux de relargage est élevé. L'étude présentée ici compare les aqQDs à des solutions de CdCl₂ afin de mieux cerner un effet spécifique des nanoparticules. L'utilisation d'un microscope puissant dont la résolution peut atteindre 50 nm montre qu'il est très vraisemblable que des aqQDs se concentrent localement dans des organelles de la cellule, accroissant localement la concentration d'ions cadmium. Cet effet spécifique agit sur la prolifération cellulaire. Au-delà de leur taille ou de leur composition chimique de surface, ce paramètre supplémentaire sera dorénavant à considérer lors des études de cytotoxicité.

Lexique

- (1) QD: quantum dot ou boîte quantique, nanocrystal semi-conducteur dont la fluorescence résulte de l'excitation - désexcitation d'un électron de valence.
- (2) aqQD: boîte quantique synthétisée par voie aqueuse
- (3) *In vivo*: recherche ou examen pratiqué sur l'ensemble d'un organisme vivant.

- (4) ICP-MS: Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry, spectrométrie de masse permettant des détections de métaux à très basse concentration.
- (5) CdTe: tellure de cadmium, semi-conducteur de la famille II-VI.
- (6) CdS: sulfure de cadmium, semi-conducteur de la famille II-VI.
- (7) ZnS: sulfure de zinc, semi-conducteur de la famille II-VI.
- (8) MTT: MTT assay, le test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes, révélatrice de l'activité mitochondriale et donc de la vitalité de la cellule.
- (9) HEK293: Human Embryonic Kidney, lignée cellulaire d'épithélium rénal couramment utilisée en laboratoire.
- (10) nM: concentration nano molaire soit 10⁻⁹ mol L⁻¹.
- (11) STXM: Scanning Transmission X-ray Microscope, microscope à rayons X en transmission à balayage.
- (12) HeLa: cellule issue d'une lignée cancéreuse effectuée sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus.
- (13) *In vitro*: examens pratiqués sur des organes, des tissus, des cellules.

Publications de référence

- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia N.** Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*. 2004; 4 : 11-18.
- Fischer HC, Liu L, Pang KS et al.** Pharmacokinetics of nanoscale quantum dots: *in vivo* distribution, sequestration, and clearance in the rat. *Adv Funct Mater*. 2006; 16: 1299-1305.
- Hauck TS, Anderson RE, Fischer HC et al.** *In vivo* quantum-dot toxicity assessment. *Small*. 2010; 6: 138 - 144.
- Ipe BI, Lehnig M, Niemeyer CM.** On the generation of free radical species from quantum dots. *Small*. 2005; 1: 706 - 709.
- Kirchner C, Liedl T, Kudera S et al.** Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*. 2005; 5: 331 - 338.
- Parak WJ, Pellegrino T, Planc C et al.** Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*. 2005; 16: R9 - 25.
- Su Y, He Y, Lu H et al.** The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase-synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating. *Biomaterials*. 2009; 30: 19 - 25.
- Su Y, Hu M, Fan C et al.** The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties. *Biomaterials*. 2010; 31: 4829 - 4834.

Revue de la littérature

- Hardman R.** A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 2006; 114: 165 - 172.
- Le Hecho I, Potin-Gauthier M, Lespes G.** Défis analytiques liés aux nanomatériaux. Éditions Techniques de l'Ingénieur. 2010; NM8015: 1 - 9.
- Walkey C, Sykes EA, Chan WCW.** Application of semiconductor and metal nanostructures in biology and medicine. *ASH Education Books*; 2009.

Autres publications identifiées

Mahto SV, Yoon TH, Rhee SW. A new perspective on *in vitro* assessment method for evaluating quantum dot toxicity by using microfluidics technology. *Biomicrofluidics*. 2010; 4: 03411- 03418. *Les tests de nanotoxicité sont plus aisés sur des cultures cellulaires plutôt que sur des animaux. C'est encore plus vrai si on prend en compte les considérations éthiques. Malheureusement, les résultats obtenus entre ces deux approches sont assez différents. Un premier niveau d'explication pourrait être lié à l'aspect statique de l'interaction des QDs avec les cellules, créant un biais lié par exemple à la sédimentation des nanoparticules. Pour y remédier, une approche mimant mieux une circulation de fluide pourrait être envisagée à l'aide de puces microfluidiques. Les cellules sont alors soumises à un renouvellement permanent garantissant un pH constant et une alimentation continue. Cette étude repose sur la comparaison entre méthodes statique et dynamique avec un niveau de concentration de 40 pM de QD. Les résultats obtenus sont alors sensiblement différents au niveau du détachement et de la déformation des cellules. Les résultats montrent donc que les profils de cytotoxicité des QDs changent en fonction de la méthode d'exposition. Cette étude est encore préliminaire, avec un biais possible lié à l'interaction avec les parois en polymère des canaux microfluidiques, mais c'est une orientation méthodologique intéressante qui permettrait de faire converger les mesures *in vivo* et *in vitro*.*

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Aqueous synthesis quantum dots, Cadmium based quantum dots, Cytotoxicity, *In vitro*, *In vivo*, Microfluidic, Nanomaterials, Nanotoxicity, Nanotoxicology, Quantum dots.