

Localisation et accumulation intracellulaire des nanoparticules : méthodes d'études *in vitro*

Période : avril 2012 à août 2012

Béatrice L'AZOU et Isabelle PASSAGNE

Université Bordeaux Segalen – Pharmacochimie, Biologie Cellulaire, Toxicologie – FRE CNRS 3396 – Bordeaux – France

Mots clés : nanoparticules, localisation, accumulation, spectrométrie, microscopie, cytométrie en flux, imagerie élémentaire, nanosonde

Les nanoparticules (NPs⁽¹⁾) sont susceptibles de traverser des barrières physiologiques, notamment la barrière alvéolo-capillaire et de se distribuer dans l'organisme. Pour les localiser dans les tissus ou les cellules, il est nécessaire de disposer de méthodes de détection très sensibles. Certaines de ces méthodes sont basées sur les propriétés spécifiques des NPs (susceptibilité magnétique, auto-fluorescence) ou de traceurs greffés sur les NPs, si ceux-ci ne modifient pas leur comportement et y restent liés. La microscopie électronique est une technique incontournable pour visualiser les NPs dans la cellule (1). Pour les quantifier, la spectroscopie⁽²⁾ à plasma induit (ICP/AES⁽³⁾) ou de masse (ICP/MS⁽⁴⁾), la microscopie confocale⁽⁵⁾ et la cytométrie en flux⁽⁶⁾ sont largement utilisées.

Ainsi, il nous est apparu important, dans le premier article, de décrire ces méthodes classiquement utilisées, mais aussi de présenter, dans la deuxième publication, d'autres méthodologies comme la microscopie NanoSISM⁽⁷⁾.

Internalisation, localisation et cytotoxicité de nanoparticules de 1,9 nm d'or en fonction du type cellulaire

Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, Taggart LE, Dickson GR, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Trainor C, Hounsell AR, O'Sullivan JM, Schettino G, Currell FJ, Hirst DG. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2673-85.

Résumé

Très utilisées comme agents de contraste et comme vecteurs de médicaments, les nanoparticules (NPs) d'or sont aussi décrites comme agents thérapeutiques de par leurs propriétés radiosensibilisatrices⁽⁸⁾ (2-3).

Dans cette publication, Coulter *et al.* étudient les interactions entre des NPs d'or (1,9 nm de diamètre) et des cellules immortalisées de tissu pulmonaire sain (L132⁽⁹⁾) ou de tissus malins du cancer du sein (MDA-MB-231⁽¹⁰⁾) ou de la prostate (DU145⁽¹¹⁾).

Après exposition aux NPs d'or, la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses, déterminée par le test MTT⁽¹²⁾, est significativement diminuée. Cette cytotoxicité est liée à un phénomène apoptotique, mis en évidence par western blot⁽¹³⁾ et qui montre une activation de l'apoptose⁽¹⁴⁾ par expression de la procaspase⁽¹⁵⁾ 9 et clivage de la PARP⁽¹⁶⁾. Cette activation, très rapide pour les cellules saines MDA-MB-231, n'est cependant détectée qu'après 24h pour les DU145 et n'est pas retrouvée avec les cellules saines L132. En complément, la cytométrie de flux confirme, sur cellules cancéreuses, une production d'ERO⁽¹⁷⁾.

L'accumulation intracellulaire des NPs, mesurée par ICP/AES, est dose- et temps-dépendant. Les auteurs modélisent le nombre d'atomes d'or par cellule et comparent ainsi pour chacune des cellules, leur capacité d'internalisation. La quantité internalisée augmente régulièrement pour atteindre un plateau au bout de six heures. La vitesse d'internalisation calculée à partir de la pente des six premières heures est comparable pour les cellules DU145 et L132. Cependant, ramenée en quantité totale de NPs accumulées sur 24h, les études montrent que les cellules tumorales MDA-MB-321 et DU145 en accumulent majoritairement plus. La microscopie confocale confirme ces résultats en utilisant des NPs d'or rendues fluorescentes par greffage d'un thiol⁽¹⁸⁾ avec le fluorochrome⁽¹⁹⁾ AlexaFluor⁽²⁰⁾. Une plus forte intensité du signal dans les cellules cancéreuses est mesurée. Les NPs d'or s'accumulent majoritairement dans les cellules cancéreuses qui, de ce fait, après irradiation, reçoivent plus d'énergie que les cellules saines. Les électrons⁽²¹⁾ générés à la surface des NPs d'or conduisent alors à la destruction de la tumeur (4). Des études complémentaires clonogéniques⁽²²⁾ montrent que la présence de NPs d'or augmente la radiosensibilité des cellules cancéreuses MDA-MB-231.

Détectées par microscopie électronique à transmission (MET⁽²³⁾), les NPs d'or apparaissent localisées dans de larges vésicules de densités différentes selon que les cellules sont cancéreuses ou saines. Il semble qu'aucune NP ne soit détectée au niveau d'autres organites intracellulaires ou dans le noyau.

Dans cette stratégie thérapeutique ciblée, il est indispensable de localiser avec précision les NPs dans les cellules. En effet, l'irradiation des NPs, localisées à proximité de l'ADN⁽²⁴⁾ pourrait conduire à des effets génotoxiques⁽²⁵⁾ indésirables.

Commentaire

Cette première publication décrit des méthodes classiquement utilisées pour localiser avec précision et quantifier les NPs dans les cellules. Les auteurs utilisent la spectrométrie ICP/AES couplée à un compteur de particules. Cette méthode invasive nécessite la digestion des échantillons et ne permet donc pas une quantification *in situ*⁽²⁶⁾. Cette technique est très différente de la cytométrie en flux, où la quantification des NPs est réalisée sur cellules isolées, et de l'imagerie réalisée avec la MET sur échantillons fixés et coupés mais non digérés.

Dans cette étude, les auteurs utilisent des cellules très différentes en termes d'origine tissulaire (cellules de poumons, de sein et de prostate) et d'état physiologique (cellules saines et cellules cancéreuses). Connaissant les sensibilités différentes des cellules, il aurait été judicieux dans un premier temps de comparer des cellules saines et cancéreuses issues d'un même organe ou d'étudier des cellules d'origine tissulaire différente mais toutes cancéreuses.

Identification et localisation par spectrométrie de masse des nanoparticules dans les tissus

Audinot JN, Georgantzopoulou A, Piret JP, Gutleb AC, Dowsett D, Migeona HN, Hoffmann L. Identification and localization of nanoparticle in tissues by mass spectrometry. *Surf Interface Anal* 2012 ; DOI:10.1002/sia.5099

Résumé

Devant la nécessité de développer des méthodes toujours plus sensibles, Audinot *et al.*, proposent des nanosondes⁽²⁷⁾ SIMS qui sont de véritables microscopes ioniques permettant une analyse de surface en mode image pour cartographier la distribution des ions⁽²⁸⁾. Pour validation, une comparaison avec la MET est proposée. La MET est la méthode de référence mais elle doit être complétée par une analyse élémentaire⁽²⁹⁾. Cette analyse élémentaire peut être réalisée par ICP/AES, mais cette technique invasive globale ne permet pas la localisation des NPs dans les compartiments cellulaires. La NanoSIMS50 permet cette imagerie élémentaire. Les études présentées par Audinot *et al.*, sont réalisées après 48h d'exposition aux NPs de dioxyde de titane, d'argent ou, d'oxyde de silicium et de cuivre dans un organisme entier, la daphnie⁽³⁰⁾, et après 24h d'exposition à des NPs de cuivre dans des cellules humaines hépatiques (HepG2)⁽³¹⁾.

La SIMS est une technique de caractérisation chimique par balayage avec un faisceau d'ions primaires à l'origine d'une cascade de collisions atomiques et d'un déplacement des éléments de l'échantillon mesurable en énergie et en masse. Son principe réside dans l'utilisation d'une source de césium érodant un échantillon sous ultraviolet et permettant la cartographie des éléments. La distribution des éléments de base ¹²C, ¹⁴N (carbone, azote) des protéines, ³¹P (phosphore) des acides nucléiques⁽³²⁾ plus concentrés dans le noyau et ³²S (soufre) sont obtenus en parallèle des éléments des NPs (5). Ainsi, la structure des tissus peut facilement être identifiée. Le NanoSIMS comporte plusieurs collecteurs et permet d'obtenir simultanément des

images de plusieurs éléments ou isotopes. Le NanoSIMS avec une résolution en masse au-dessus de 4 000 M/ Δ M⁽³³⁾, permet une discrimination isotopique⁽³⁴⁾ d'éléments de faible masse majoritairement présents dans les échantillons biologiques.

Le titane, comme la silice, sont détectés uniquement dans la lumière de l'intestin des daphnies amenant la preuve que ces éléments ne traversent pas la barrière intestinale. De l'argent est retrouvé dans l'intestin mais la sensibilité du NanoSIMS permet aussi de détecter des traces d'argent dans des tissus avoisinants. Les NPs de cuivre entraînent une diminution de la viabilité des cellules HepG2. Cependant, aucune modification morphologique n'est observée par MET à l'exception de structures denses dans le cytoplasme des cellules. Aucune information complémentaire ne peut être obtenue par microscopie électronique classique. Seule la NanoSIMS50 permet de détecter un faible signal et de confirmer la présence de cuivre.

Commentaire

Le NanoSIMS fait partie de ces microscopes dynamiques capables de restituer à très haute résolution une image représentative de la distribution d'ions élémentaires à faibles concentrations dans un échantillon. Cependant, l'interprétation des images provenant du NanoSIMS est complexe et la confirmation des résultats biologiques par d'autres techniques d'analyse reste encore nécessaire. De plus, les méthodes décrites restent complémentaires car la microscopie électronique (MET en particulier) permet une analyse des nanoparticules intactes alors que la spectrométrie quantifie les ions et les éléments.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Devant la volonté de toujours mieux comprendre les effets des NPs et d'évaluer le pourcentage de pénétration dans les tissus, il est nécessaire de développer des méthodologies plus sensibles. La combinaison d'une imagerie à haute résolution permettant d'obtenir des cartographies quantitatives des éléments et des algorithmes de quantification numérique permettra, en effet, de corrélérer le lieu précis, les effets des NPs et la dose administrée.

Lexique

- (1) Nanoparticules (NPs) : objet correspondant à un assemblage d'atomes dont au moins une des dimensions se situe à l'échelle nanométrique c'est-à-dire est inférieur à 100 nm
- (2) Spectrométrie : méthode d'analyse spectrale permettant d'accéder à la composition et à la structure de la matière
- (3) ICP/AES : Inductively Coupled Plasma/Optic Emission Spectrometry : spectrométrie d'émission optique couplé à plasma induit
- (4) ICP/MS : Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry : spectrométrie de masse couplé à plasma induit

- (5) Microscope Confocal: microscope optique à balayage en lumière réfléchi ou à fluorescence qui permet de réaliser des images à faible profondeur de champs, c'est-à-dire de fabriquer des coupes optiques
- (6) Cytométrie en flux: permet de mesurer (-métrie) les propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse
- (7) SIMS ou NanoSIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry: Spectrométrie de masse à ionisation secondaire
- (8) Radiosensibilisateur: relatif à une substance susceptible d'augmenter l'effet des rayonnements ionisants sur un organe, tissu ou cellule
- (9) L132: lignée de cellules humaines embryonnaires d'épithélium pulmonaire
- (10) MDA-MB-231: lignée humaine de cellules très invasives issues d'un cancer du sein.
- (11) DU145: lignée de cellules épithéliales humaines de prostate
- (12) MTT: test classiquement utilisé pour évaluer la cytotoxicité et la prolifération cellulaire. Ce test est basé sur le clivage des sels de tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. L'intensité de la coloration du tétrazolium est proportionnelle au nombre de cellules vivantes
- (13) Western Blot: méthode permettant, par électrophorèse et transfert sur membrane, de détecter et d'identifier des protéines spécifiques d'un échantillon biologique
- (14) Apoptose: mort cellulaire programmée
- (15) (Pro)caspases: enzymes à cystéine capables de cliver d'autres protéines à des niveaux spécifiques. Elles jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisation de l'apoptose
- (16) PARP: enzyme (poly ADP-ribose polymérase) produite quand une cassure survient sur un brin d'ADN à la suite d'expositions à des rayons ultraviolets ou à des produits toxiques et qui participe aux mécanismes de réparation
- (17) ERO: espèces réactives de l'oxygène
- (18) Thiol: groupement sulfhydryle (SH) attaché à un atome de carbone.
- (19) Fluorochrome: substance capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation
- (20) AlexaFluor: nom spécifique du fluorochrome utilisé dans cette étude
- (21) Électron: particule élémentaire ayant une charge électrique négative
- (22) Étude Clonogénique: test de survie globale d'une population basé sur la capacité des cellules à former des colonies
- (23) MET: microscope Electronique à Transmission
- (24) ADN: Acide DésoxyriboNucléique
- (25) Génotoxiques: se dit d'agents d'origine physique ou chimiques susceptibles de provoquer des lésions de l'ADN pouvant éventuellement conduire à des mutations.
- (26) *In Situ*: observation d'une structure ou examen d'un effet à l'endroit où il se déroule
- (27) Nanosonde: sonde de taille nanométrique (100 nm)
- (28) Ions: espèces chimique électriquement chargées
- (29) Imagerie ou analyse élémentaire: cartographie d'atomes ou d'ensemble d'atomes qui composent un échantillon

- (30) Daphnie: petit crustacé d'eau douce, parfois appelé puce d'eau
- (31) HepG2: lignée de cellules issues d'un hépatome humain
- (32) Acides Nucléiques: les acides nucléiques sont des macromolécules formées par un enchaînement de nucléotides.
- (33) M/ Δ M: masse/Différence de masse, souvent appelé défaut de masse
- (34) Isotopiques: éléments chimiques identiques mais dont le nombre de masse diffère.

Publications de référence

- (1) **Brandenberger C, Clift M, Vanhecke D, et al.** Intracellular imaging of nanoparticles: Is it an elemental mistake to believe what you see? *Part Fibre Toxicol* 2010; **7**, 15. *Doi* 10.1186/1743-8977-7-15
- (2) **Chen J, Saeki F, Wiley BJ, et al.** Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano Lett* 2005; **5**(3): 473-477.
- (3) **Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, et al.** Gold nanoparticles: a new x-ray contrast agent. *Br J Radiol* 2006; **79** (939): 248-253.
- (4) **Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, et al.** Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res* 2010; **173** (6): 719-728.
- (5) **Eybe, T, Bohn JN, Audinot T, et al.** Uptake visualization of deltamethrin by NanoSIMS and acute toxicity to the water flea *Daphnia magna*, *Chemosphere* 2009; **76**, 134-140.

Revue de la littérature

- Tantra R and Knight A.** Cellular uptake and intracellular fate of engineered nanoparticles: A review on the application of imaging techniques. *Nanotoxicology* 2011; **5** (3), pp. 381-392.
- Larguinho M and Baptista PV.** Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics. *J Proteomics* 2012; **75** (10): 2811-23.

Autres publications identifiées

- Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y.** Flow Cytometric Evaluation of Nanoparticles Using Side-Scattered Light and Reactive Oxygen Species-Mediated Fluorescence-Correlation with Genotoxicity. *Env Sci Technol* 2012; **46**: 7629-7636.
- Cet article présenté par Toduka et al., confirme l'intérêt de la cytométrie en flux dans l'étude de l'internalisation des NPs dans les cellules, celle-ci étant directement calculée proportionnellement à l'intensité de la lumière diffusée SSC (side-scattered light). Cette publication n'a pas été retenue car les auteurs présentent surtout la cytométrie de flux pour mettre en évidence la production d'un stress oxydant par la sonde DCFH-DA.*
- Zucker R M, Massaro E J, Sanders K M, et al.** Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry Part A* 2010; **77A**, (7): 677-685.

Zucker et al., utilisent la microscopie à fond noire et la cytométrie en flux comme méthodes de référence. La diffusion latérale et axiale de la lumière est significativement modifiée après exposition à différentes concentrations de NPs de TiO_2 . Pour mettre en évidence les effets cytotoxiques, la cytométrie en flux peut être utilisée grâce aux sondes fluorescentes calceine et iodure de propidium.

Thurn KT, Paunesku T, Wu A, et al. Labeling TiO_2 nanoparticles with dyes for optical fluorescence microscopy and determination of TiO_2 -DNA nanoconjugate stability. *Small* 2009; 5 (11): 1318-1325. Thurn et al., décrivent la possibilité d'étudier des NPs de TiO_2 couplées à des agents fluorescents grâce à la microscopie à rayons X (XFM) qui permet de localiser avec précision les NPs dans les cellules. En complément de l'XFM, deux autres méthodes sont décrites dans cette publication, la cytométrie en flux et la microscopie confocale.

Montes MO, Hanna SK, Lenihan HS, et al. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J Hazardous Mat* 2012; 225-226 : 139-145. Pour évaluer la quantité de NPs (CeO_2 et ZnO), les auteurs utilisent la spectrométrie ICP AES et calculent après destruction des tissus, la quantité de métaux ingérée par les organismes (moules méditerranéennes). Cette technique invasive est couramment utilisée dans les études en écotoxicologie.

Osman O, Zanini LF, Frénéa-Robin M, et al. Monitoring the endocytosis of magnetic nanoparticles by cells using permanent micro-flux sources. *Biomedical Microdevices* 2012: 1-8. DOI 10.1007/s10544-012-9673-4. Dans cet article, Osman et al. utilisent les propriétés magnétiques de NPs pour étudier l'endocytose. Les cellules sont exposées à différentes concentrations de NPs puis soumises à un champ magnétique. Cet article n'a pas été retenu car les auteurs n'utilisent pas cette méthode pour localiser les NPs dans les cellules. L'internalisation des NPs est étudiée par microscopie confocale et par MET.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt;
- avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt.