

TOXICITÉ DES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES ET MITOCHONDRIE : CAS DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC

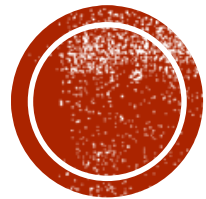
Mireille Chevallet

Equipe BioMet

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux

URM5249–CNRS–CEA–UGA





INTRODUCTION

Les nanoparticules métalliques



Définitions

Nanomatériaux:
Assemblage d'atomes dont
au moins 1 dimension $< 100\text{nm}$

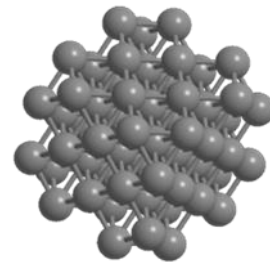
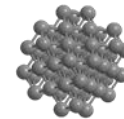
Nanoparticules:
Assemblage d'atomes dont
les 3 dimensions $< 100\text{ nm}$



Pourquoi utilise-t-on des nanomatériaux ?

Propriétés particulières dues à leur petite taille et à une forte proportion d'atomes de surface

- ⇒ Forte réactivité (notamment de surface)
- ⇒ Résistance mécanique
- ⇒ Propriétés physiques particulières (magnétique, conductivité)

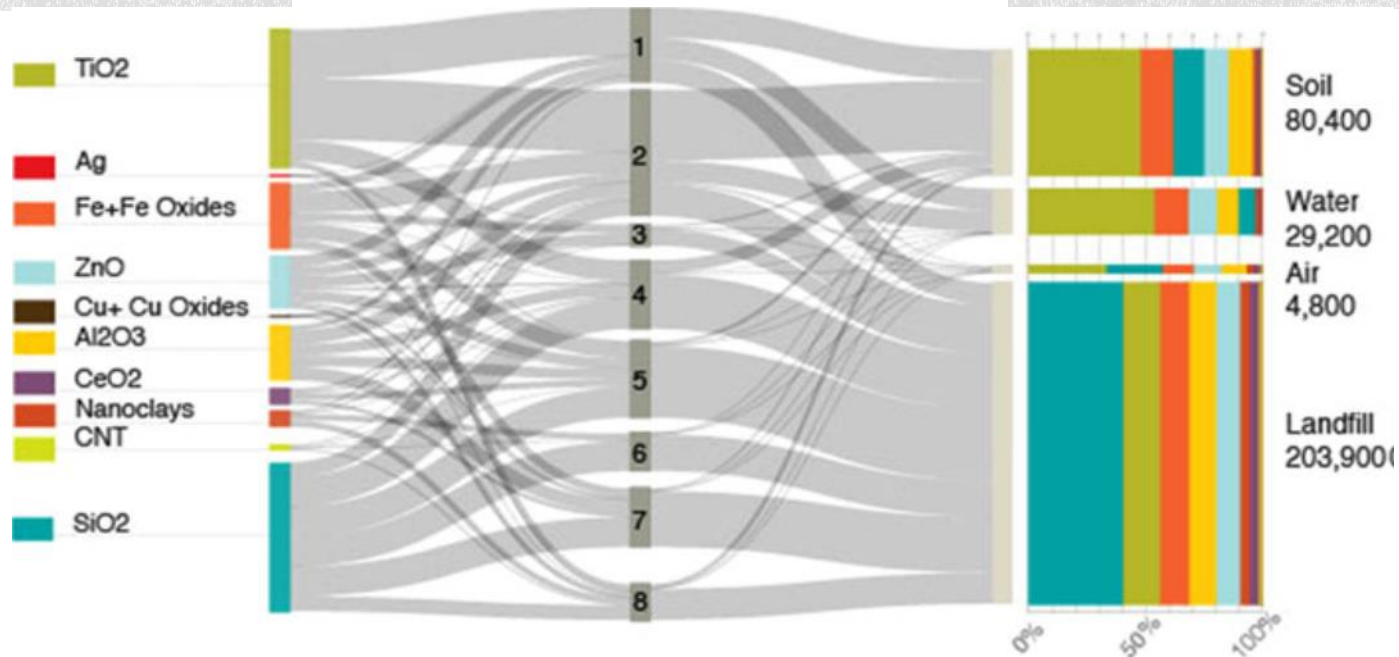


nb atome de surface / nb atome total

Flux global de nanomatériaux d'ingénierie en 2010

Production des NPs Top 10

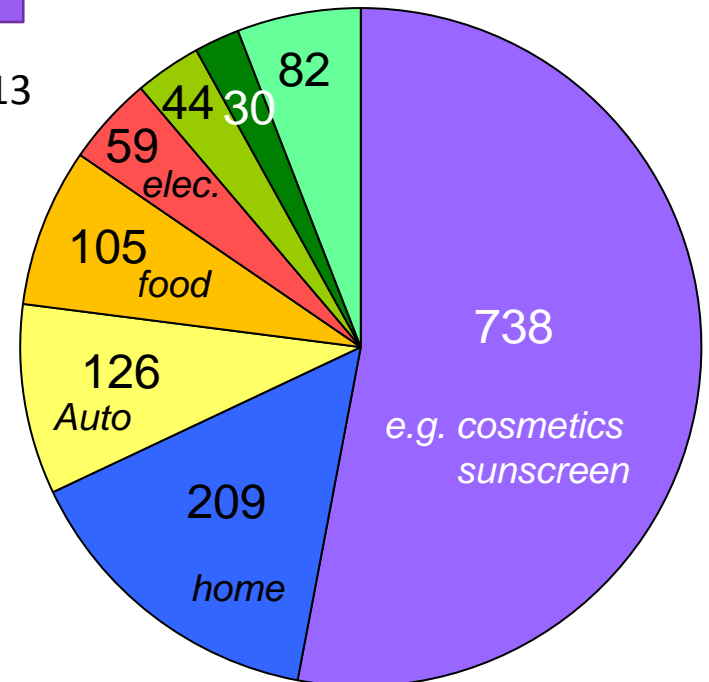
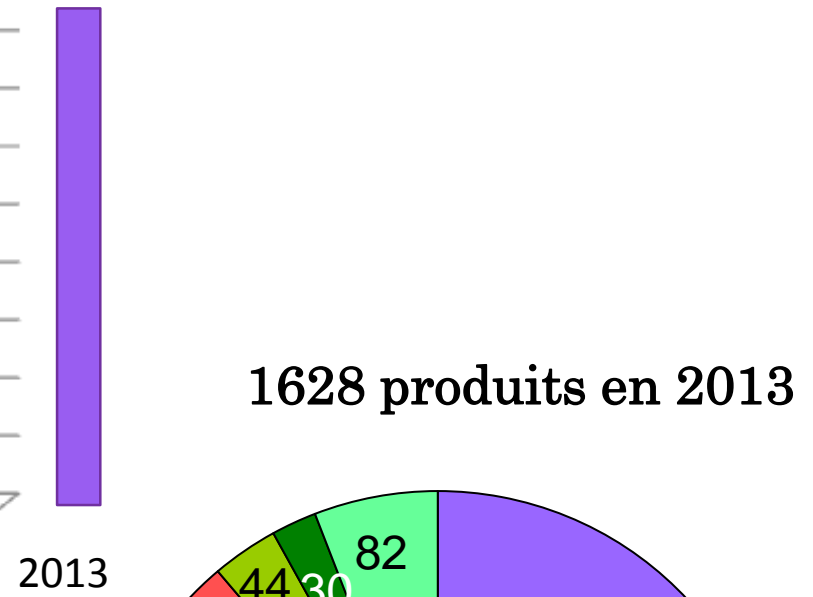
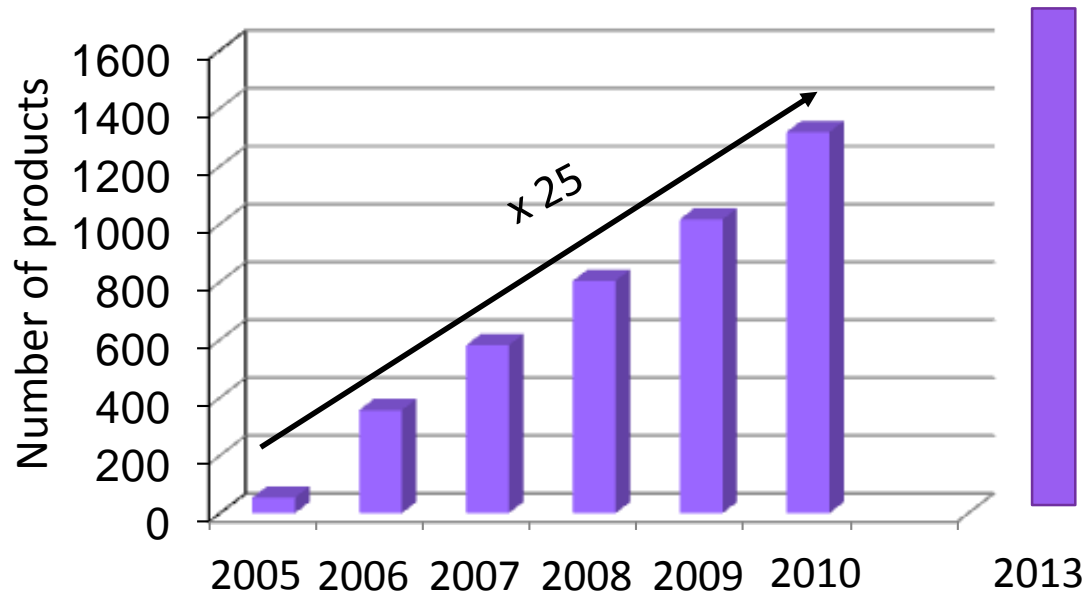
Relargage des NPs



1. Cosmetics	48,000	5. Electronics & Optics	48,700
2. Coatings, Paints, & Pigments	80,500	6. Automotive	23,500
3. Medical	13,400	7. Catalysts	37,500
4. Energy & Environment	43,700	8. Other	22,900

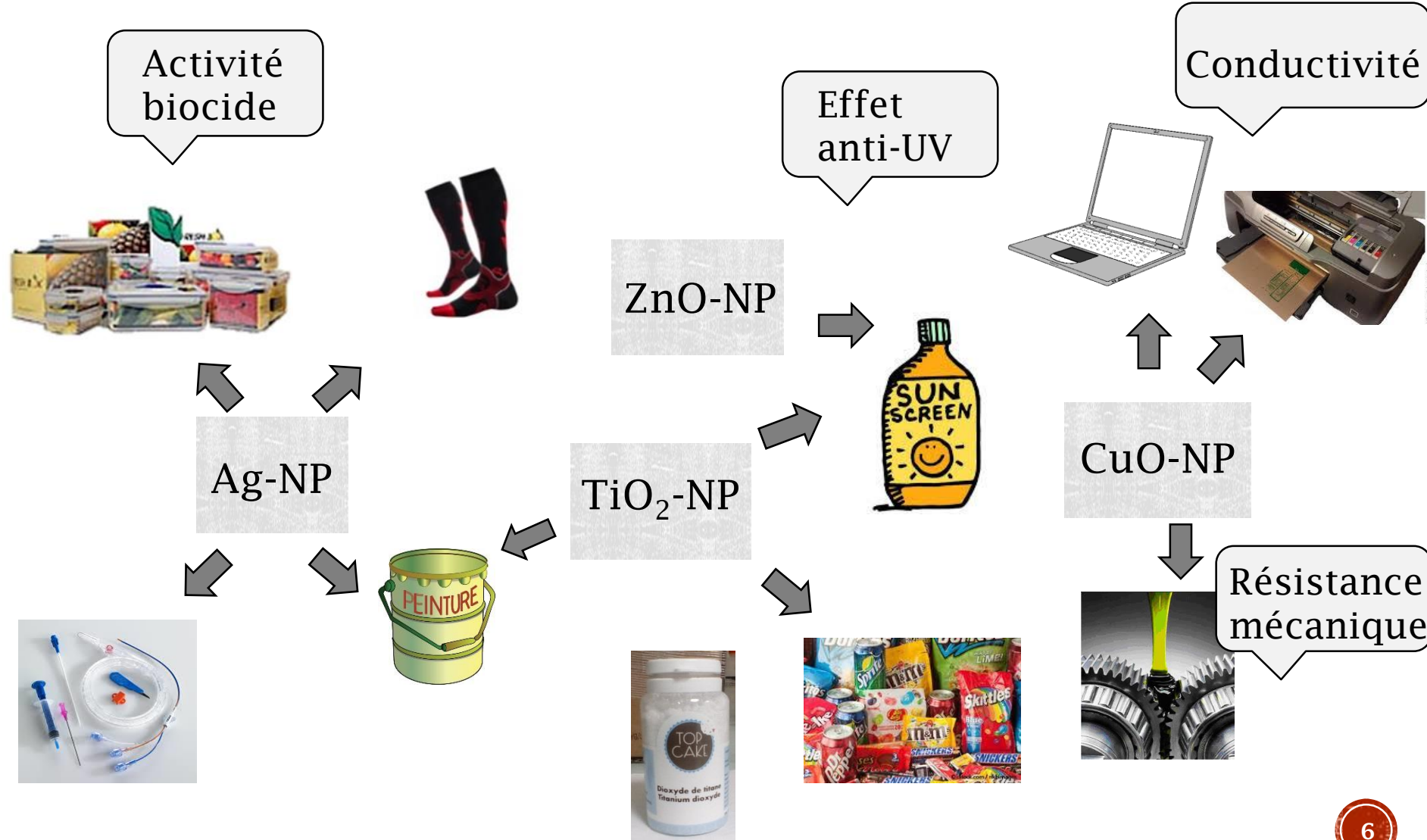
Domaines d'applications
(tonnes/an)

Evolution du nombre de produits commerciaux contenant des nanomatériaux

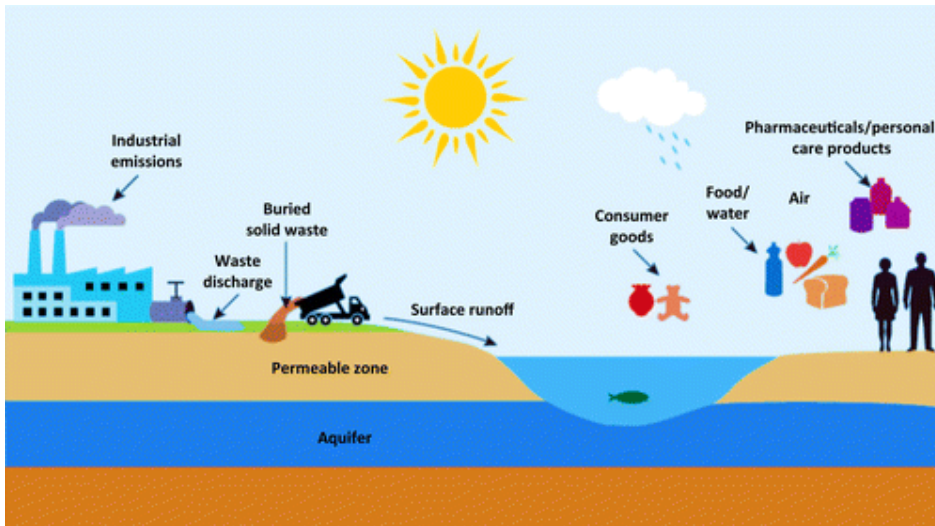


- Health & Fitness
- Home & Garden
- Automotive
- Food and Beverage
- Electronics and Computer
- Appliances
- Products for children
- Others

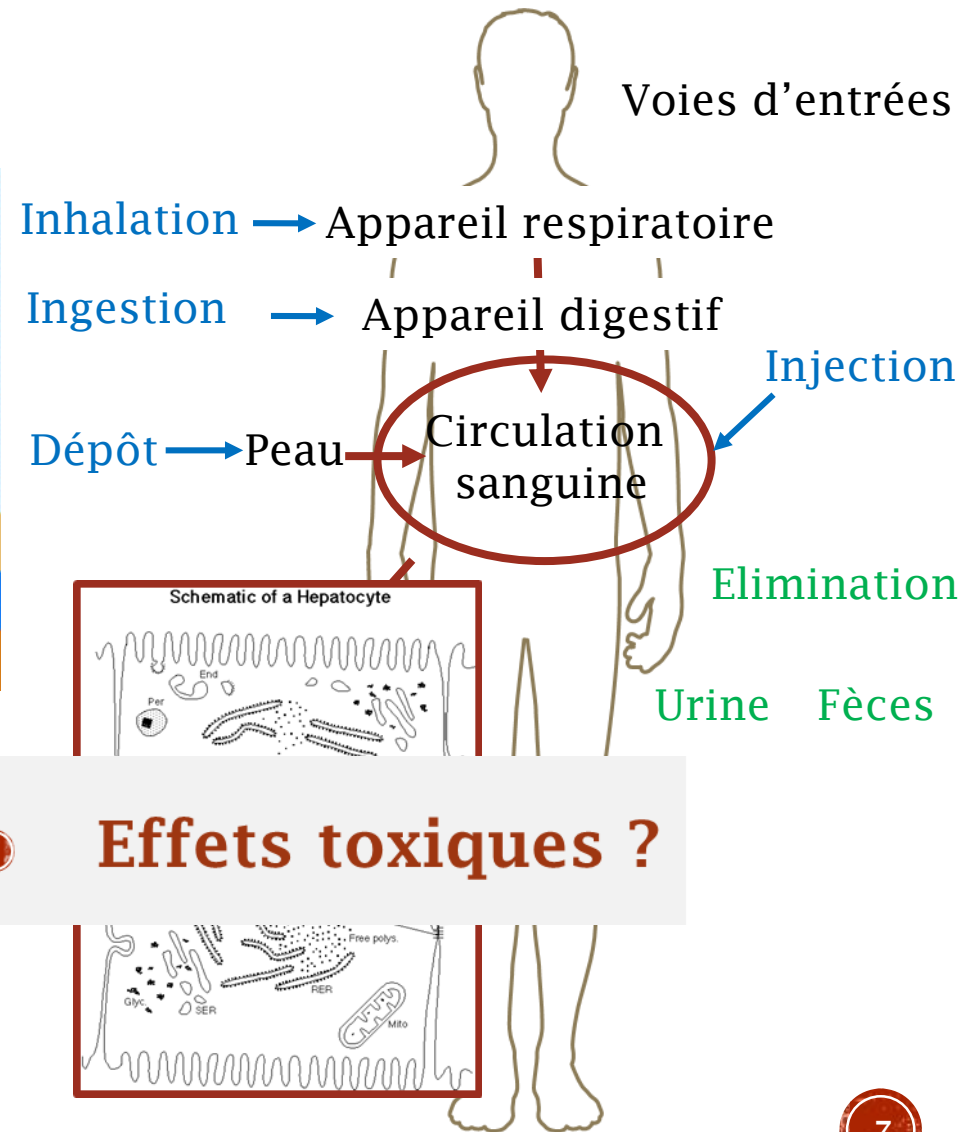
Exemples de produits commerciaux contenant des nanomatériaux



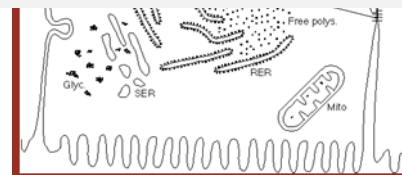
Impact des nanoparticules sur l'environnement et l'homme ?

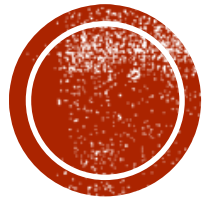


Kurwadkar, J. Hazard. Toxic Radioact. Waste, 2014



Effets toxiques ?





EFFETS DE DOSES SOUS- TOXIQUES DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC SUR UN MODÈLE D'HÉPATOCTES.

Impact sur l'homéostasie du zinc et
les mitochondries

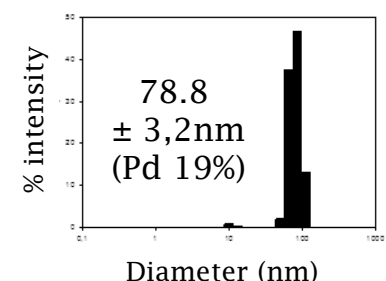
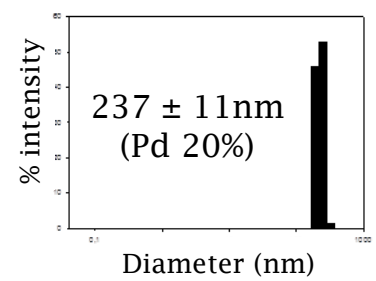
<p>● Nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NP):</p>	<p>ZnO-NP-SVF Sigma 544906</p>	<p>ZnO-NP-silane Sigma 721077</p>
<p>Taille primaire Modification Enrobage</p>	<p>< 100 nm Non 50% SVF</p>	<p>35 nm Groupement cationic non</p>

Méthodes

● Caractérisation des dispersions de ZnO-NPs:

Diffusion de la lumière (DLS)

Détermination du diamètre hydrodynamique des particules



Mesure du potentiel zeta

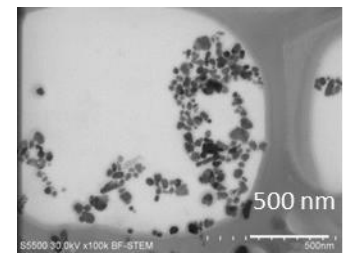
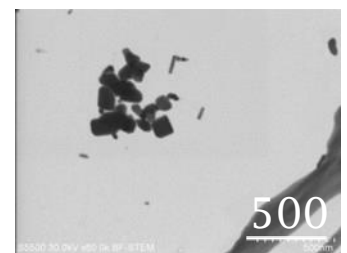
Détermination de la charge globale

- 25 mV

19,3 mV

Microscopie électronique

Détermination de la forme et de la taille réelle de NP



Agrégation

ZnO-NP

Dissolution

Enrobage

Ion zinc

Entrée

Altération

Interaction

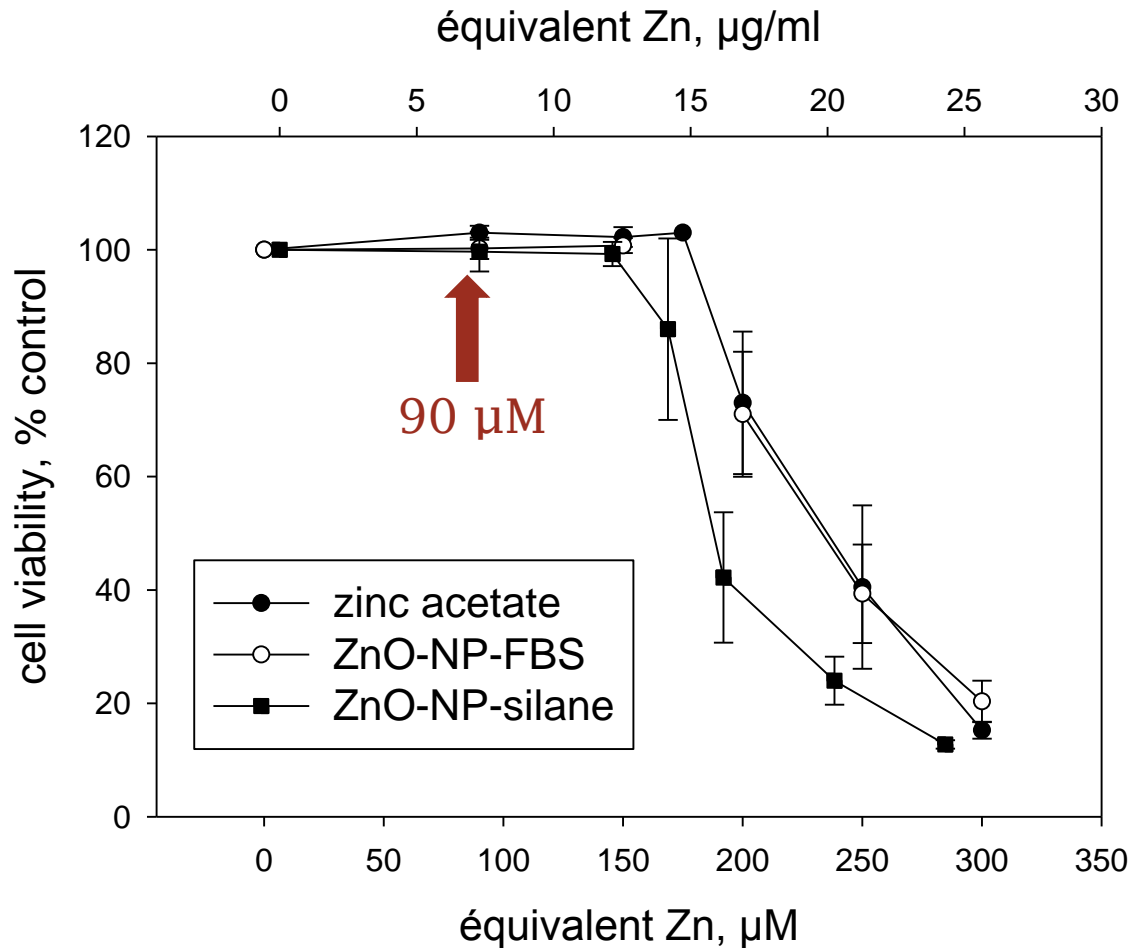
Perturbations ?

Homéostasie des métaux

- De la balance des ROS
- Des mitochondries
- Du RE
- Expression des gènes
- Génotoxicité

Etude de la toxicité in-vitro

Devenir des nanoparticules métalliques dans le milieu de culture et les cellules



Etude de la toxicité des ZnO-NPs

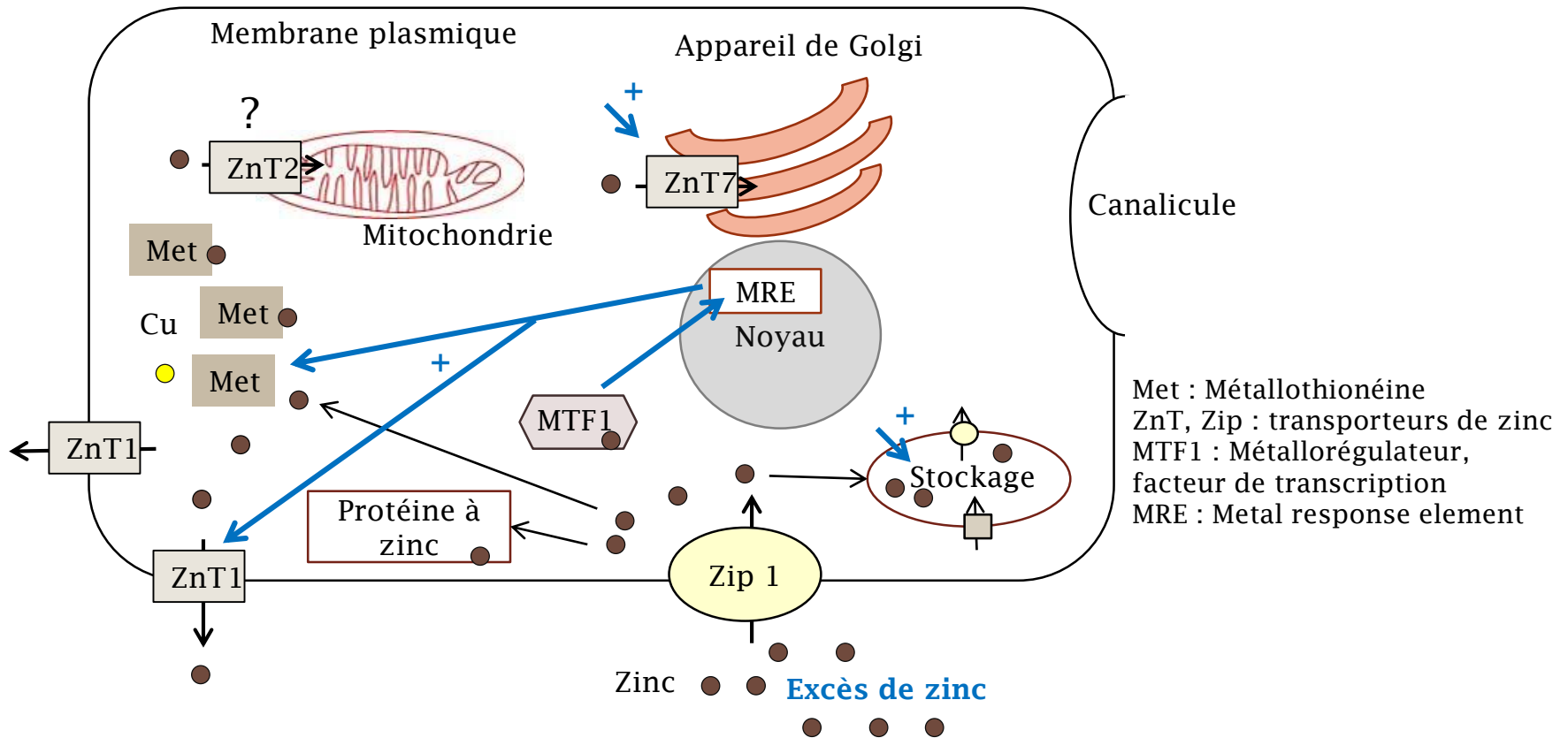
Viabilité de cellules HepG2 après 24h d'incubation avec des ZnO-NPs ou de l'acétate de zinc



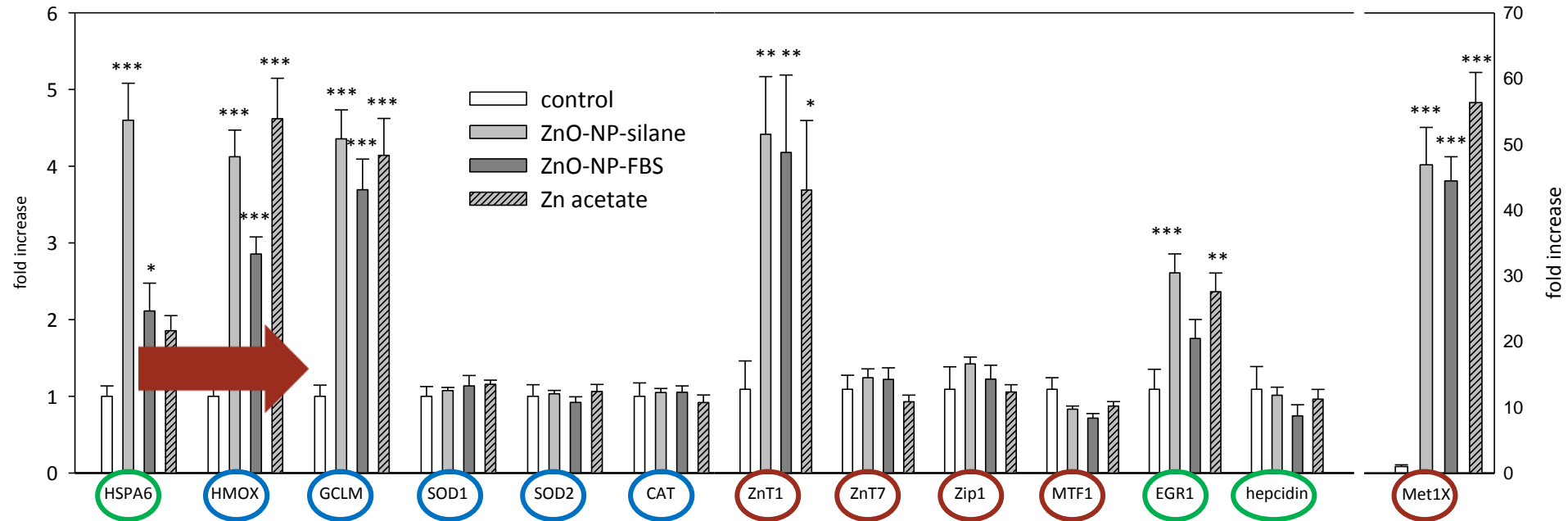
Toxicité des ZnO-NPs équivalente à celle du sel de zinc



Homéostasie du zinc dans un hépatocyte



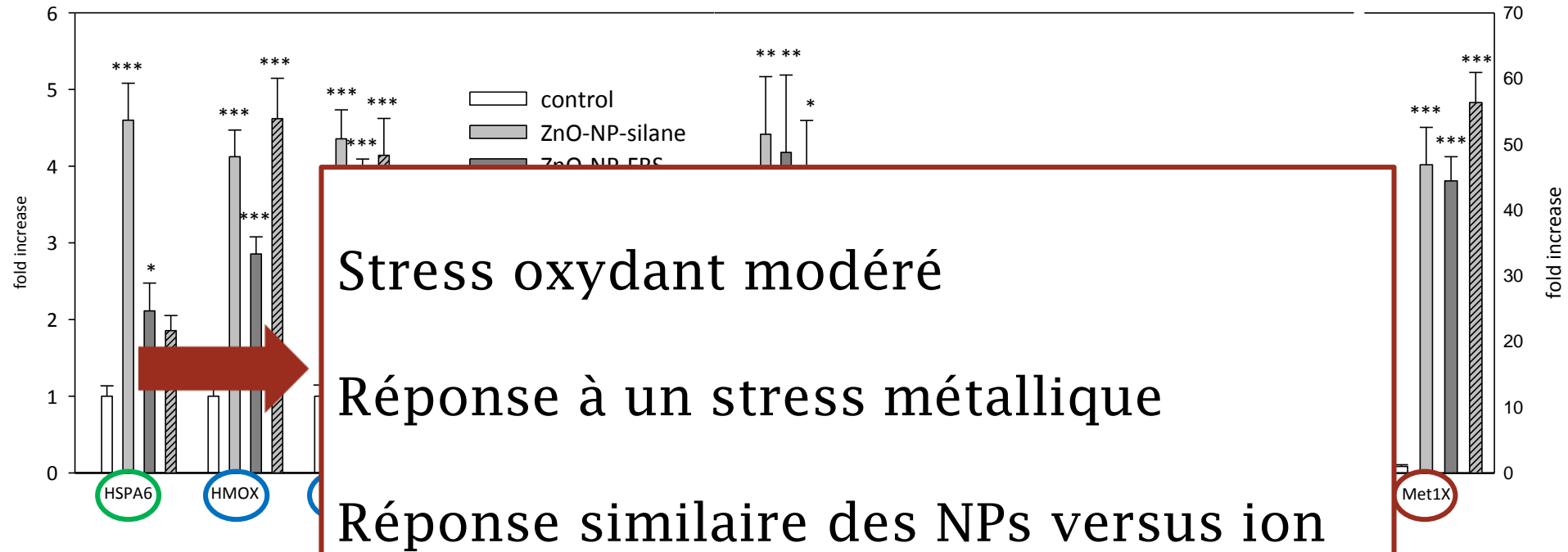
Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie des métaux et la réponse au stress oxydant



- Homéostasie des métaux
- Réponse au stress oxydant
- Autres

Facteur d'amplification de l'expression de gènes d'intérêts après 6h d'incubation avec 90µM ZnO-NPs ou acétate de zinc. Moyenne +SEM de trois expériences indépendantes *: p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs. contrôle

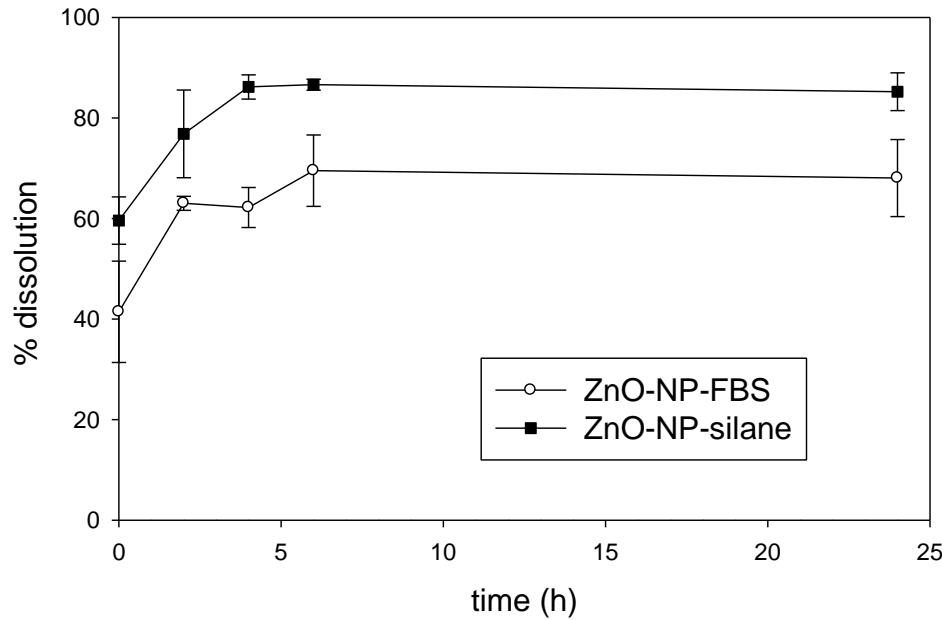
Etude de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie des métaux et la réponse au stress oxydant



- Homéostasie des métaux
- Réponse au stress oxydant
- Autres

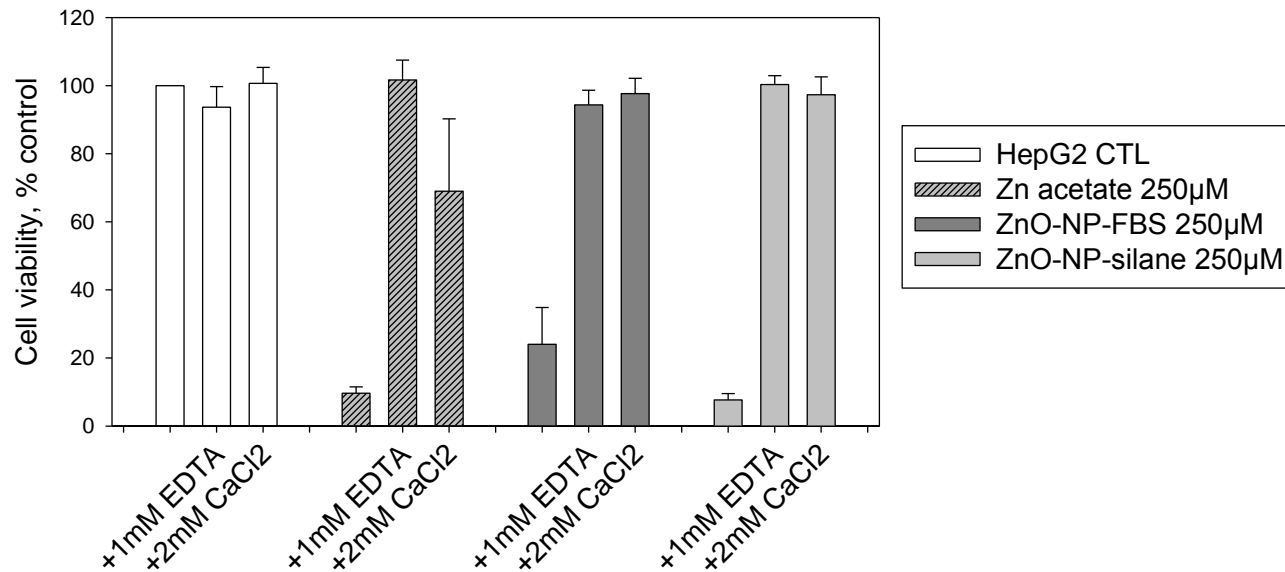
Facteur d'amplification de l'expression de gènes d'intérêts après 6h d'incubation avec 90µM ZnO-NPs ou acétate de zinc. Moyenne +SEM de trois expériences indépendantes *: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. contrôle

Dissolution des ZnO-NPs dans les milieux de culture au cours du temps.



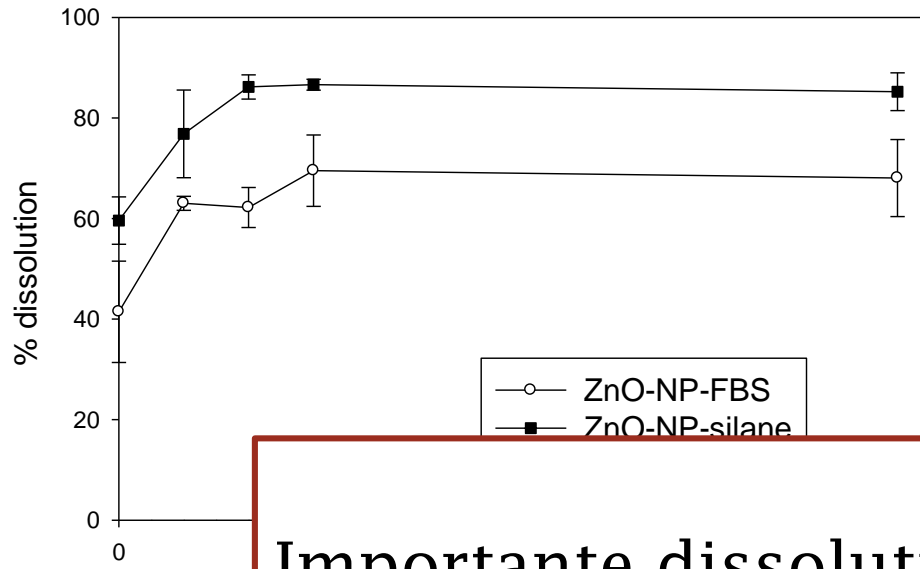
Incubation 90µM ZnO-NP dans du milieu complet, prélèvements à différents temps, filtration 0.1 µm et ultracentrifugation puis dosage ICP-OES

Protection contre la toxicité du zinc par l'EDTA et le calcium



Les cellules HepG2 sont prétraitées à l'EDTA ou au calcium avant d'être exposées 24h à la dose toxique de 250 µM de ZnO-NPs

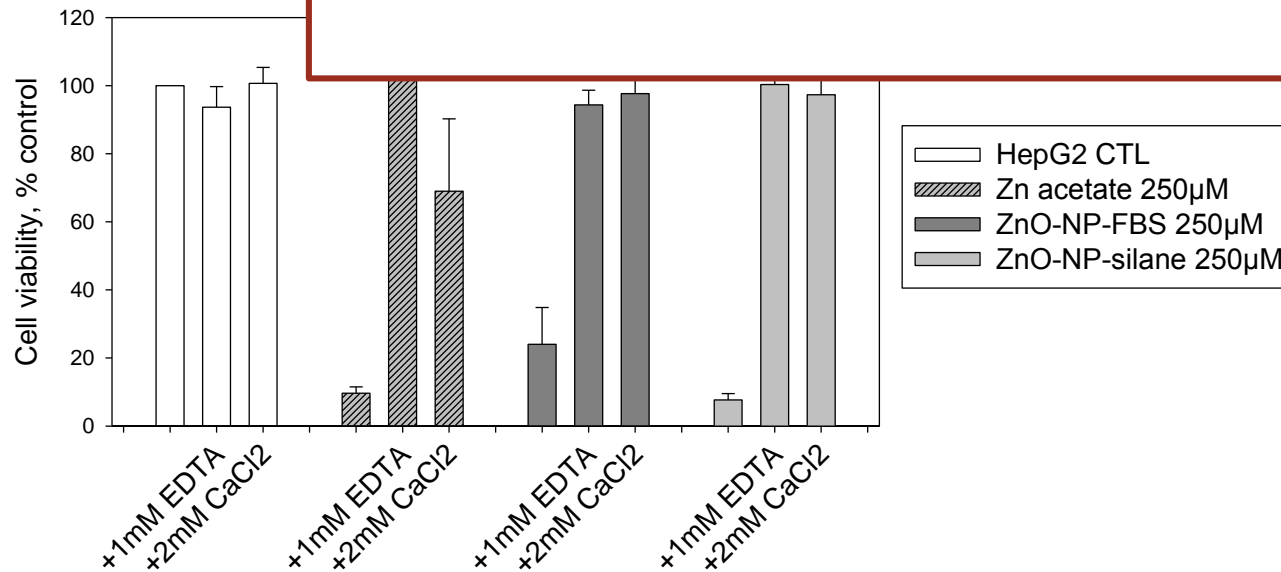
Dissolution des ZnO-NPs dans les milieux de culture au cours du temps.



Incubation 90µM ZnO-NP dans du milieu complet, prélèvements à différents temps, filtration sur 0.1 µm et centrifugation puis analyse par ICP-OES

Importante dissolution des ZnO-NPs

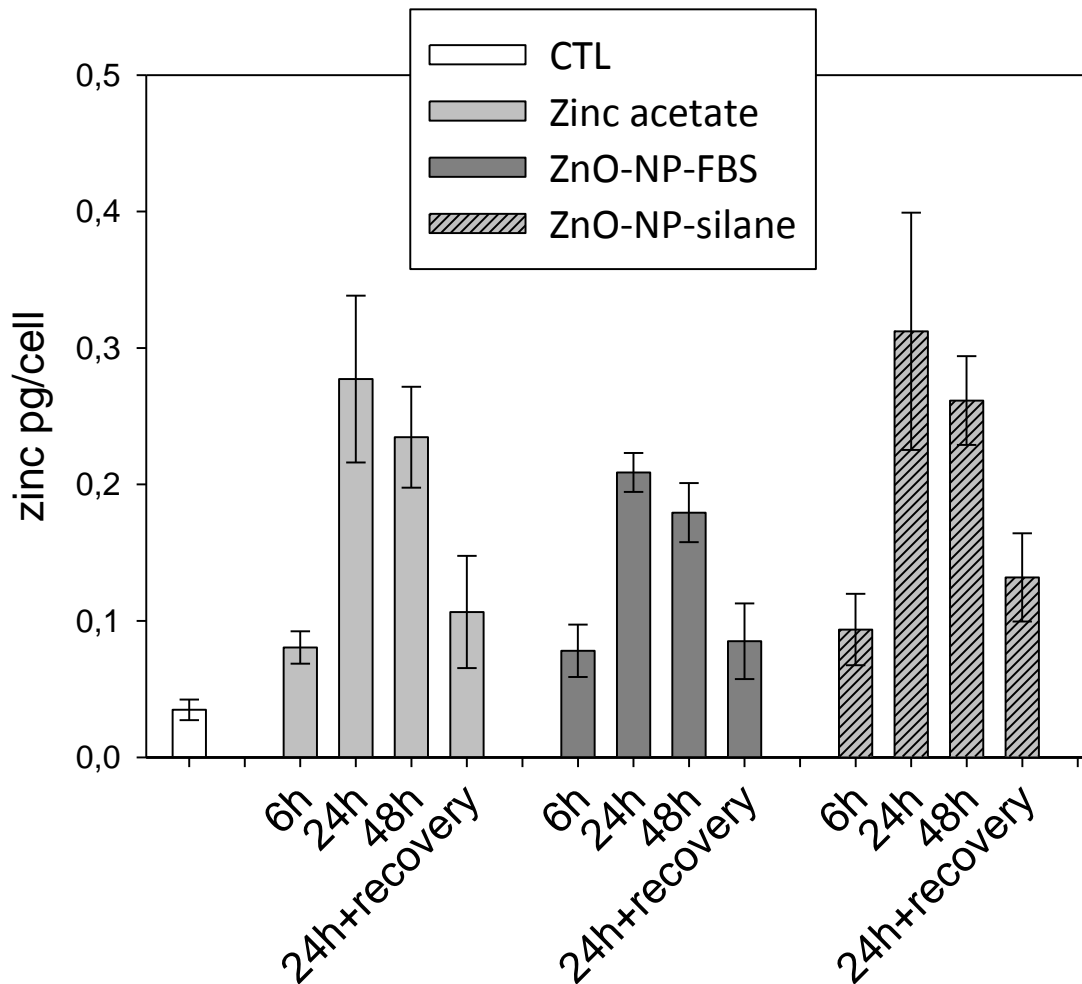
Toxicité lié à l'ion zinc



Protection contre la toxicité du zinc par l'EDTA et le calcium

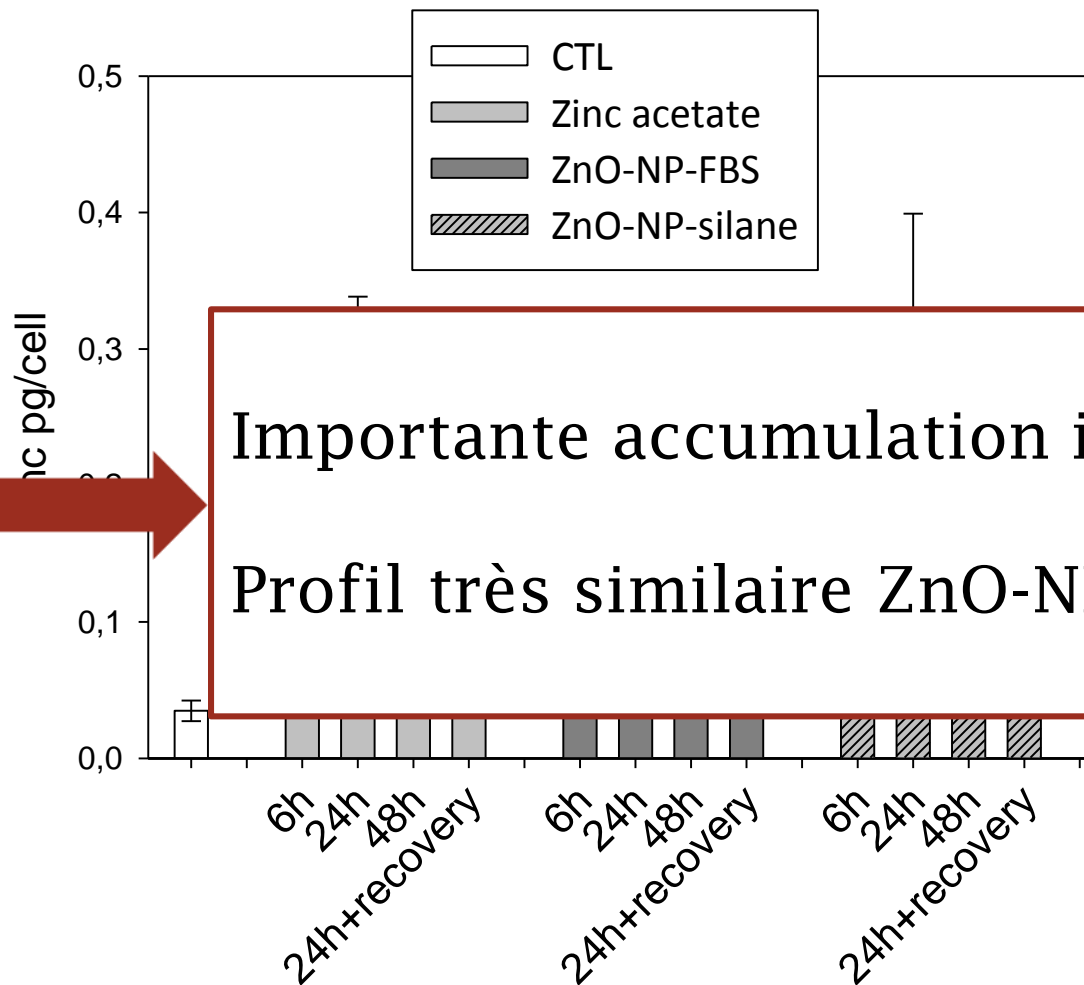
Les cellules HepG2 sont prétraitées à l'EDTA ou au calcium avant d'être exposées 24h à la dose toxique de 250 µM de ZnO-NPs

Mesure de l'accumulation de zinc intracellulaire



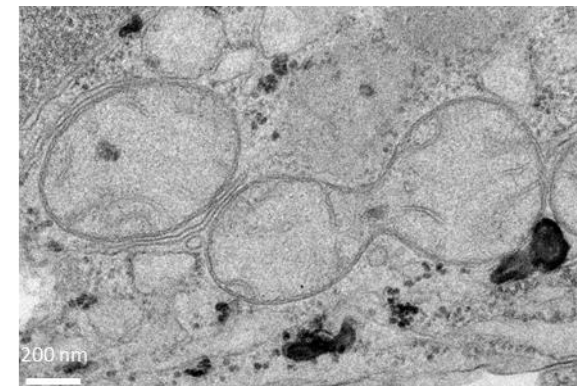
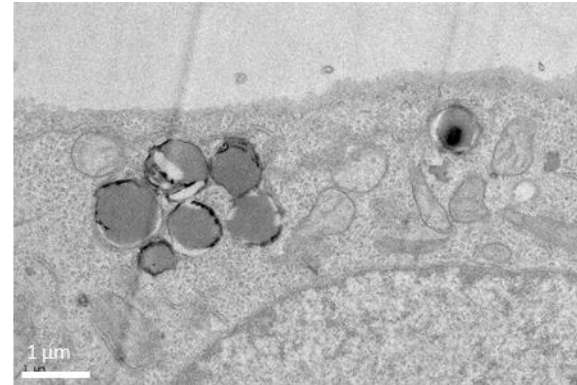
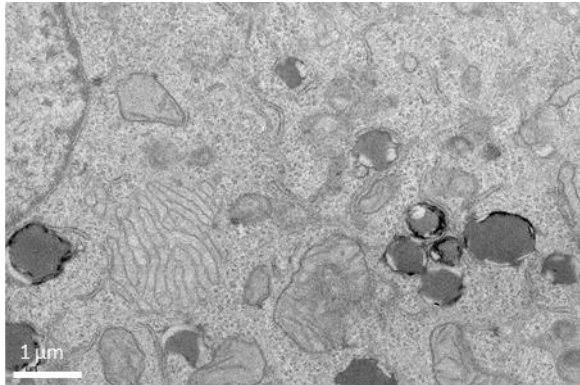
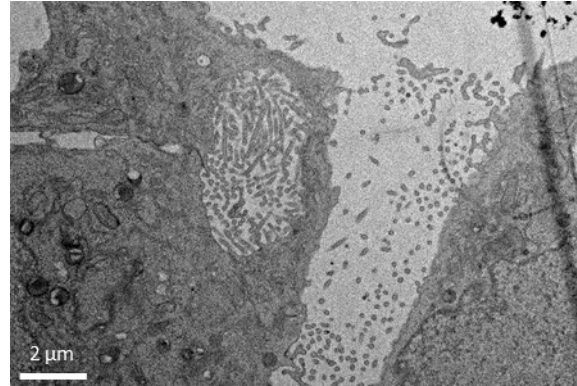
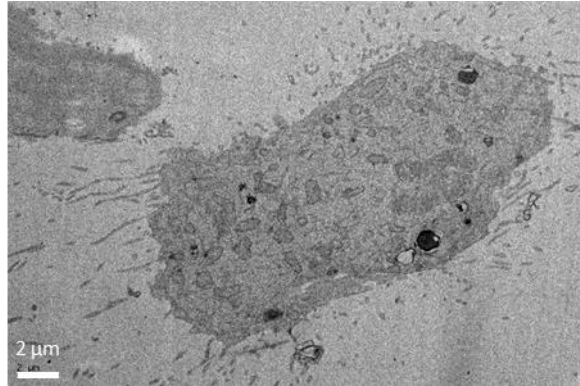
- Le zinc intra-cellulaire est mesuré par ICP-OES après différentes incubations en présence de ZnO-NPs ou zinc acétate 90 μ M

Mesure de l'accumulation de zinc intracellulaire



Importante accumulation intracellulaire de zinc
Profil très similaire ZnO-NPs / acétate de zinc

après différentes incubations en présence de ZnO-NPs ou zinc acétate 90 μ M

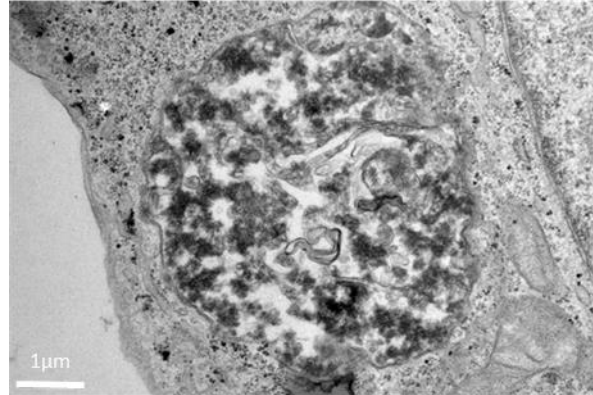
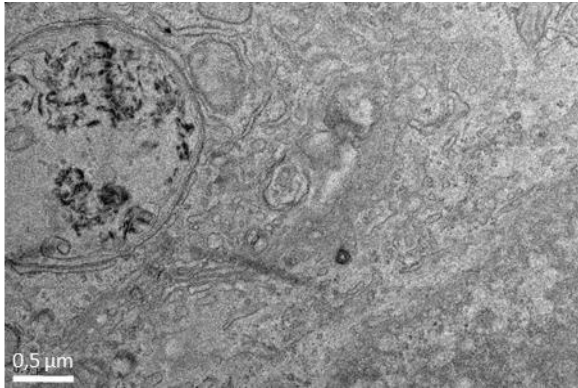


Images de microscopie électronique à transmission (TEM) de cellules hepG2 Contrôles

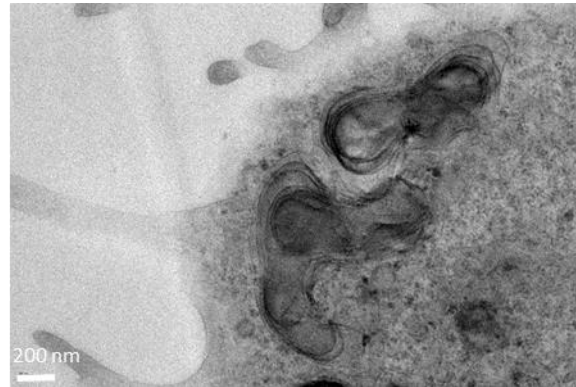
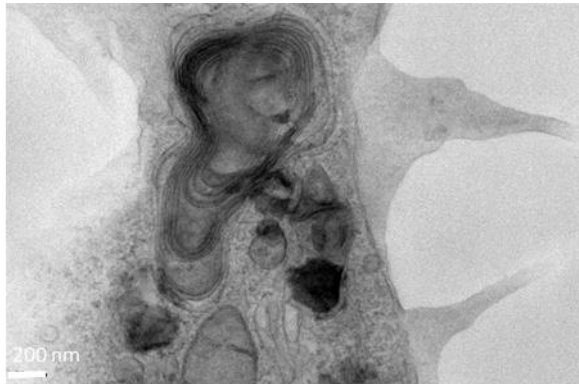
Les cellules HepG2 sont
fixées, colorées,
déshydratées et incluses
en résine.

Les images de coupes
de 80 à 240 nm sont
réalisées avec un Tecnai
G2 Spirit BioTwin à 120
kV

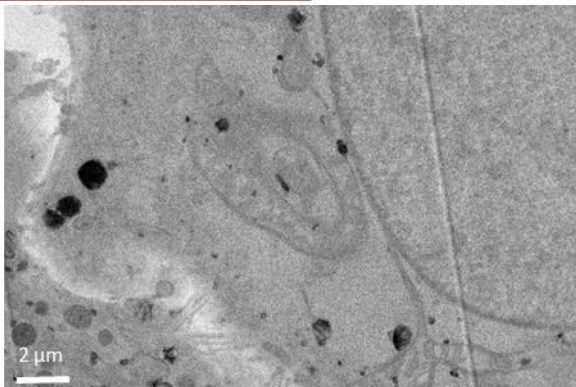
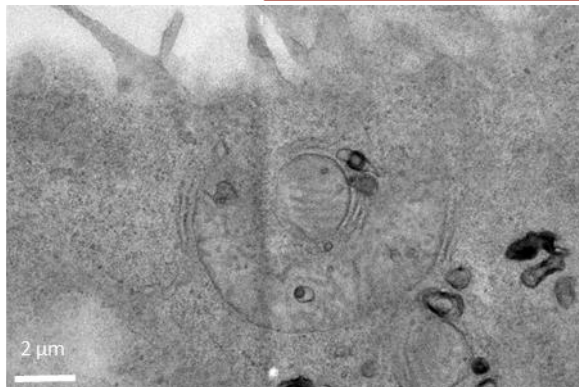
Lysosomes



Corps multilamellaires



Mitochondries anormales

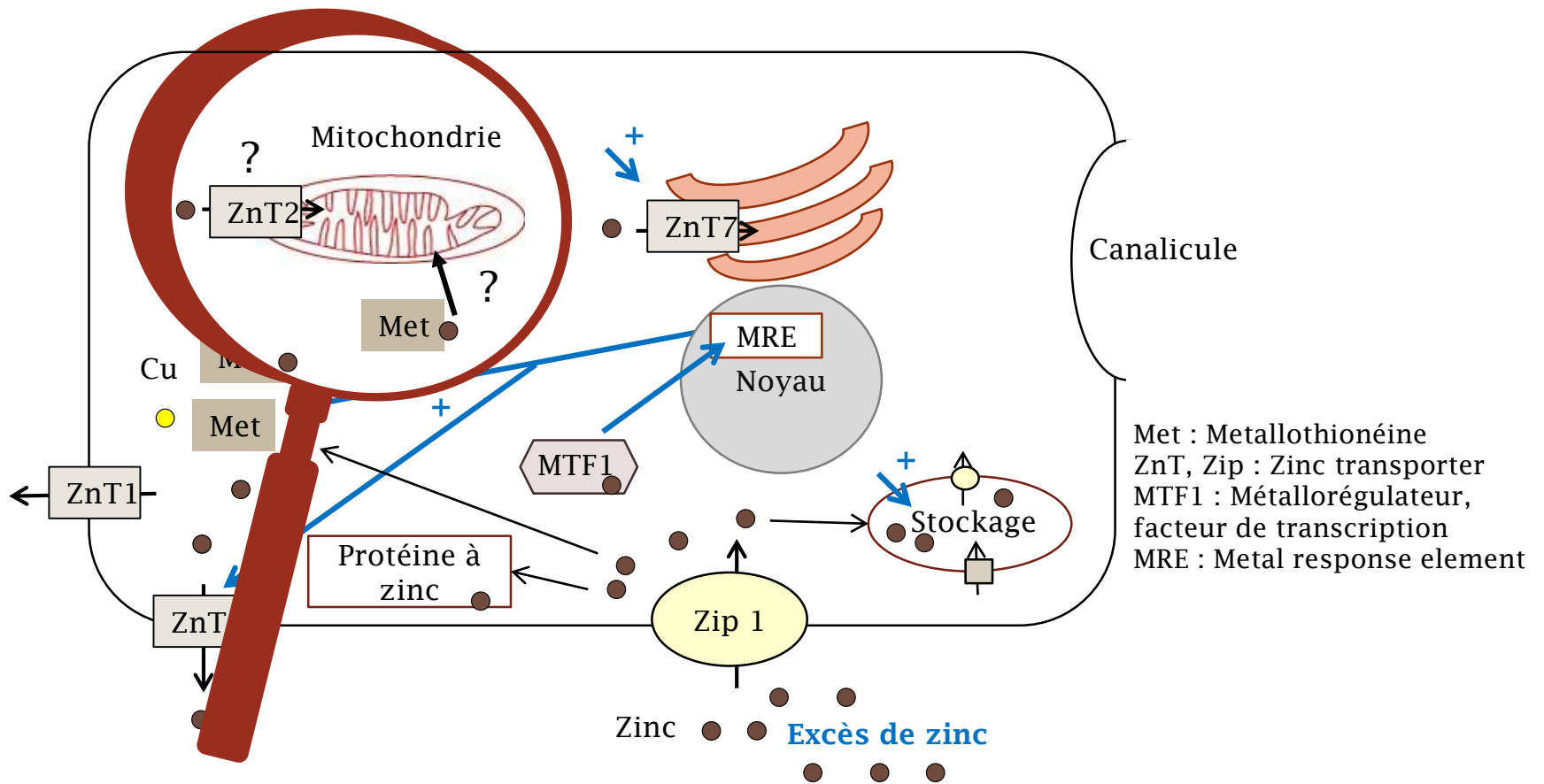


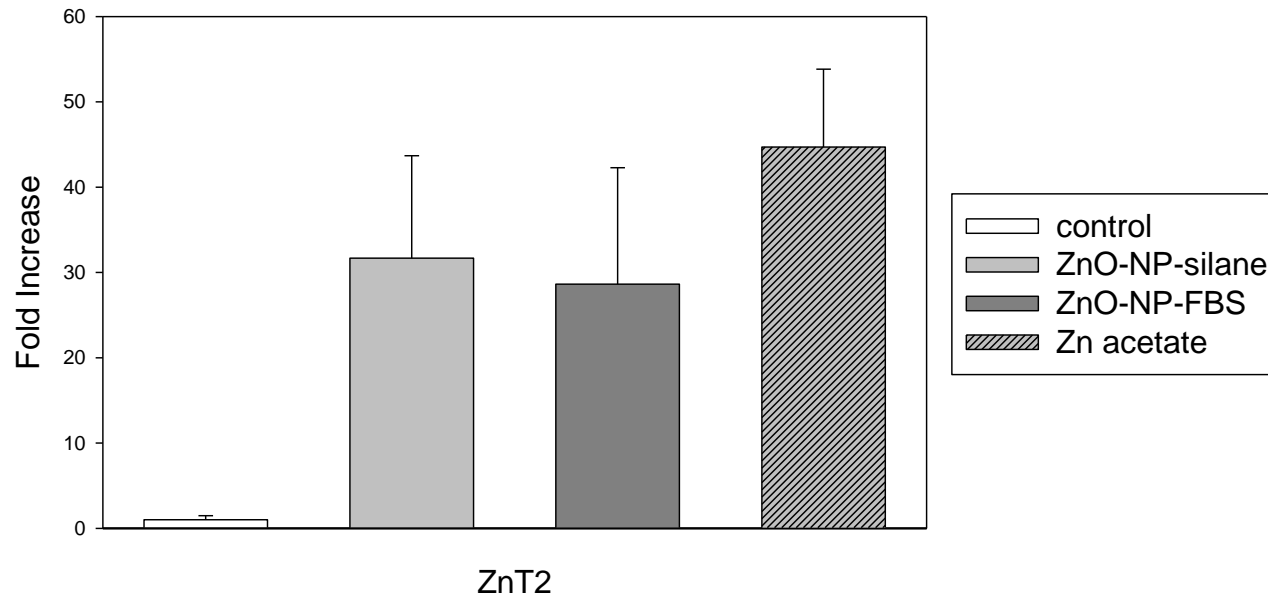
Images de microscopie électronique à transmission (TEM) de cellules hepG2 traitées ZnO-NPs ou acétate de zinc

Après traitements les cellules HepG2 sont fixées, colorées, déshydratées et incluses en résine.

Les images de coupes de 80 à 240 nm sont réalisées avec un Tecnai G2 Spirit BioTwin à 120 kV

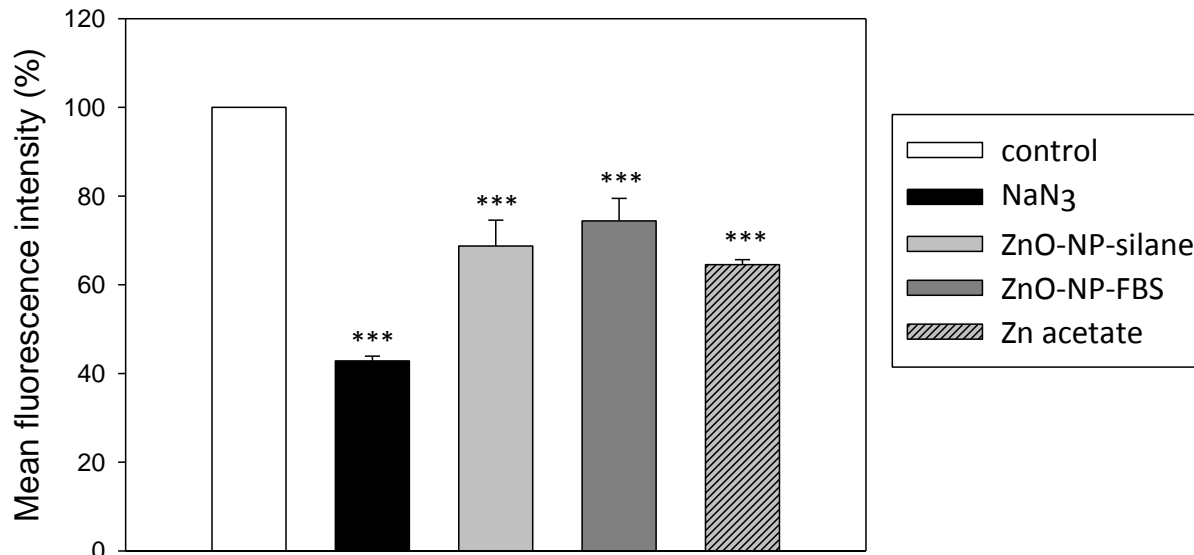
● Entrée du zinc dans la mitochondrie ?





▪ Etude de l'expression du gène codant pour le transporteur ZnT2

Facteur d'amplification de l'expression de ZnT2 après 6h d'incubation avec des ZnO-NPs ou de l'acétate de zinc.



Mesure du potentiel mitochondrial après 24h de traitement ZnO-NPs/zinc acétate

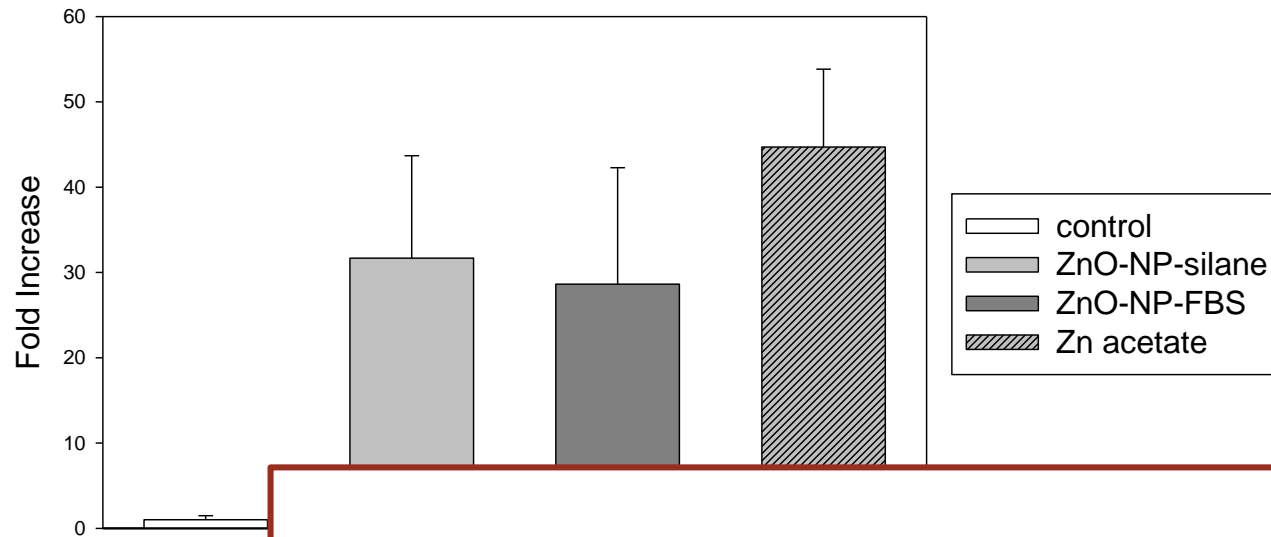
Quantité de rhodamine 123 internalisée dans les cellules, exprimée en % de fluorescence par rapport au contrôle.

Etude de l'expression du gène codant pour le transporteur ZnT2

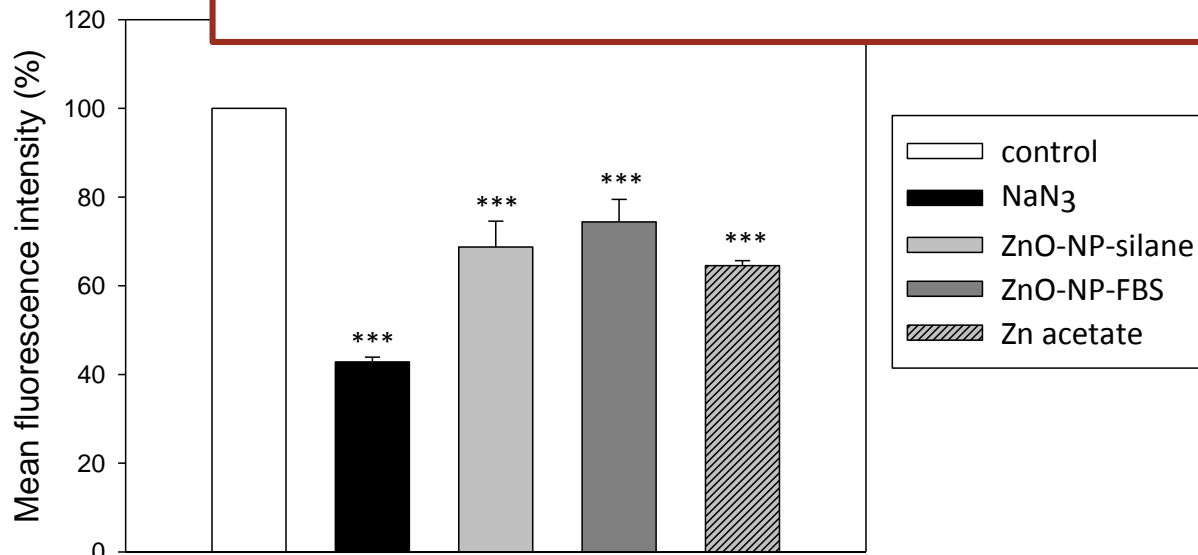
Facteur d'amplification de l'expression de ZnT2 après 24h d'incubation avec des ZnO-NPs ou de l'acétate de zinc.

Mesure du potentiel mitochondrial après 24h de traitement ZnO-NPs/zinc acétate

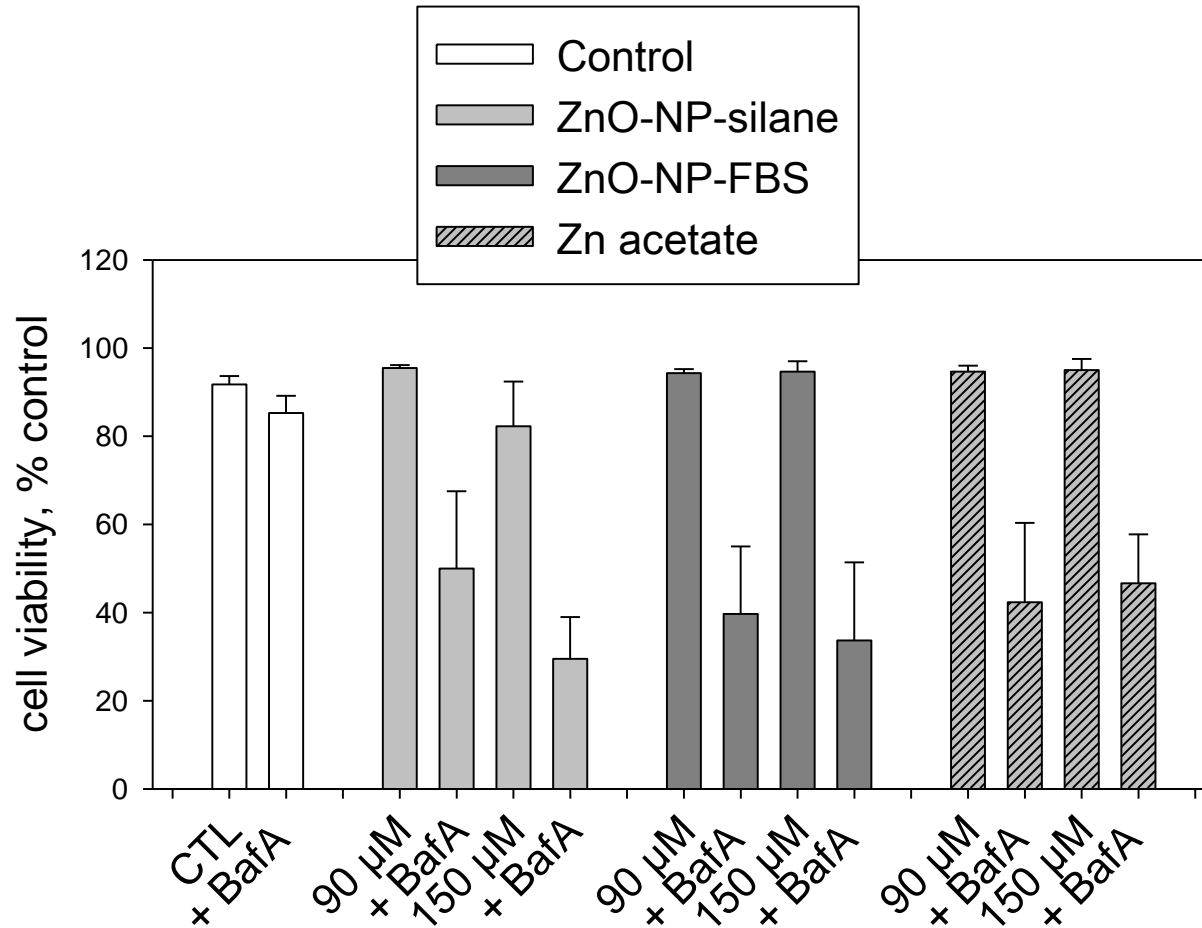
Quantité de rhodamine 123 internalisée dans les cellules, exprimée en % de fluorescence par rapport au contrôle.



Implication de la mitochondrie dans la réponse à un stress zinc

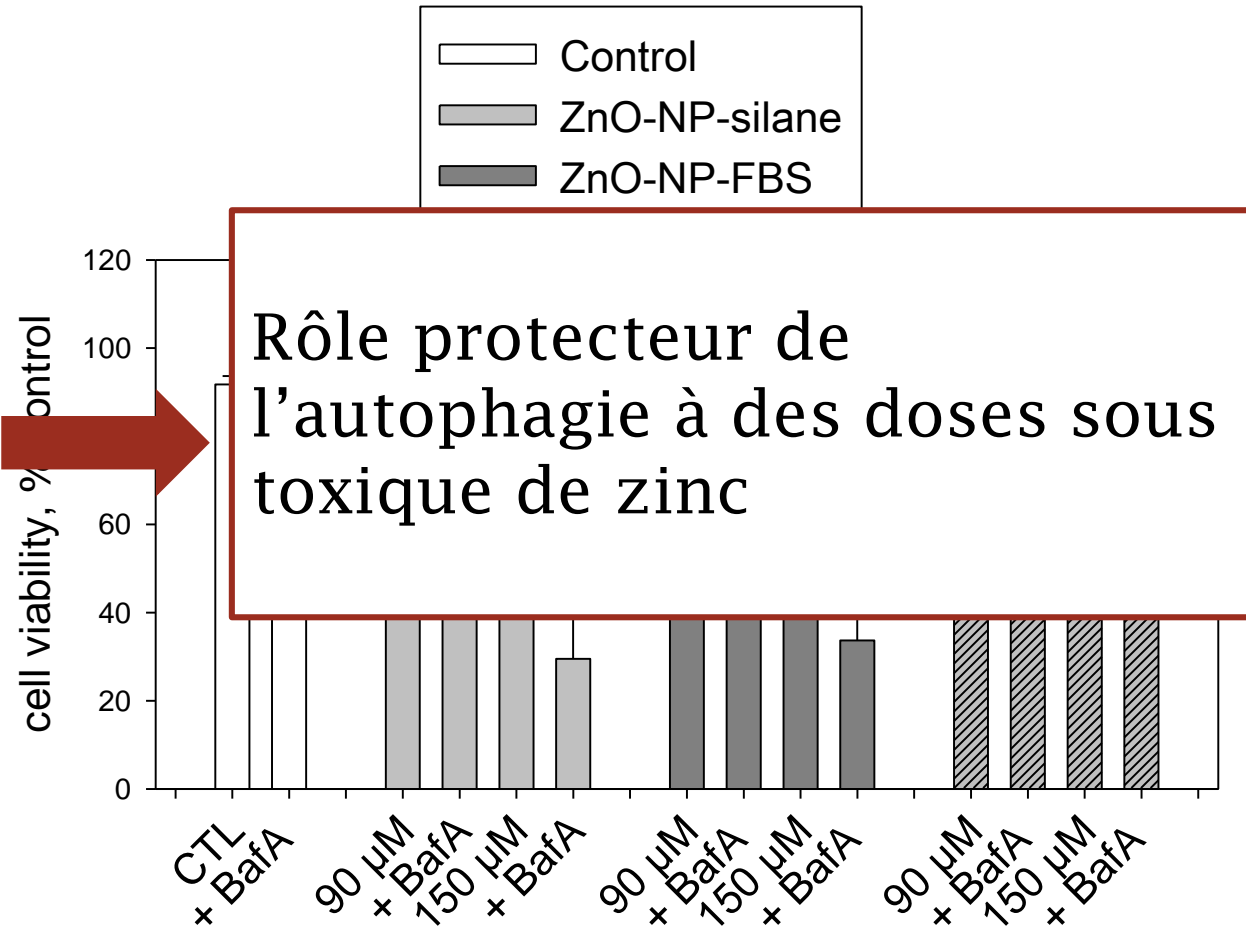


Rôle de l'autophagie dans la réponse au stress zinc



- Les cellules HepG2 sont prétraitées avec la bafilomicyn A avant d'être exposées 24h à 90 ou 250 µM de ZnO-NPs ou d'acétate de zinc

Rôle de l'autophagie dans la réponse au stress zinc



Les cellules HepG2 sont prétraitées avec la bafilomicyn A avant d'être exposées 24h à 90 ou 250 μM de ZnO-NPs ou d'acétate de zinc



CONCLUSIONS



● Remerciements

Isabelle Michaud-Soret

**Khémary Um
Elisabeth Mintz**

**Aurélien Deniaud
Peggy Charbonnier**

CEA, BIG, LCBM, BioMet

**Benoit Gallet
(IBS, EM-platform)**

**Pierre-Henri Jouneau
(DSM, INAC, MEM, LEMMA)**

**Alexandra Fuchs
(CEA, BIG)**