



HAL
open science

L'effet d'une contamination de cellules avec des nanoparticules

Jean-Luc Ravanat

► **To cite this version:**

Jean-Luc Ravanat. L'effet d'une contamination de cellules avec des nanoparticules : Le déséquilibre du pool de nucléotides comme biomarqueur de stress. Les cahiers de la Recherche : Santé, Environnement, Travail, 2021, Microplastiques et nanomatériaux, 17, pp.22-23. anses-03349948

HAL Id: anses-03349948

<https://anses.hal.science/anses-03349948>

Submitted on 21 Sep 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.

L'effet d'une contamination de cellules avec des nanoparticules

Le déséquilibre du pool de nucléotides comme biomarqueur de stress

Jean-Luc RAVANAT, CEA, IRIG/SyMMES/CIBEST, Grenoble

Équipe partenaire : Caroline Desvergne, CEA, DRT/SPNS/LBM, Grenoble

Étude de faisabilité (de 2016 à 2018) – Financement : 49.887 € – Contact : jravanat@cea.fr

Mots-clés : étude faisabilité, méthode, dosage, argent, toxicité, nucléotide, nanoparticule, détection, spectrométrie masse, biomarqueur, stress oxydant, génotoxicité, enzyme, déséquilibre, dérégulation, cellule, ADN, ARN, *in vitro*, argent, chromatographie HPLC, protocole

Les organismes vivants sont continuellement exposés à des substances dites « génotoxiques », c'est-à-dire qui peuvent altérer l'information génétique portée par l'ADN. Ainsi, de nombreuses approches expérimentales physico-chimiques et/ou biochimiques ont été développées au cours de ces dernières décennies pour déterminer l'effet génotoxique de divers composés chimiques (ex. présence de dommages à l'ADN, aberrations chromosomiques, mutations).

Le « pool » de nucléotides

Les nucléotides sont des molécules constitutives des acides nucléiques comme l'ADN et l'ARN - leur liaison déterminant la succession des bases impliquées, par exemple, dans la formation de la double hélice de l'ADN. Dans les cellules, les nucléotides participent à la régulation de l'expression génétique et bien évidemment à la synthèse des acides nucléiques. Le maintien de la balance du « pool » de nucléotides est très finement régulé tout au long du cycle cellulaire. Par conséquent, toute dérégulation de cette balance peut avoir des conséquences très délétères pour la cellule. Ainsi, la synthèse

biologique des nucléotides implique de nombreuses enzymes ; l'inhibition ou l'activation d'une d'entre elles peut entraîner un déséquilibre comme en témoignent certaines maladies (ex. syndrome de Lesch-Nyhan⁶⁹). Récemment, nous avons montré⁷⁰ en utilisant une approche protéomique que des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides étaient dérégulées suite à une contamination avec des nanoparticules (NPs). Il paraît donc opportun de vérifier ces résultats préliminaires en appliquant la méthode développée dans ce projet. Ceci permettra notamment de comparer les résultats obtenus avec ceux d'études déjà réalisées sur la toxicité des NPs d'argent sur des cellules alvéolaires pulmonaires (A549), qui sont une cible potentielle aux nanoparticules.

Le projet de recherche : NucPoolNanoTox

Le projet consiste à développer une méthode analytique permettant le dosage quantitatif des nucléotides intracellulaires, et à appliquer cette méthode pour étudier l'effet d'une contamination, *in vitro*, de cellules A549 avec des nanoparticules d'argent.

Méthodologie

Une méthodologie basée sur la chromatographie liquide couplée⁷¹ à la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS) a été développée pour détecter les différents nucléotides endogènes, à savoir les quatre bases nucléiques dans l'ADN (désoxyribonucléotide) et les quatre bases différentes dans l'ARN (ribonucléotide) sous forme mono-, di-, ou tri-phosphate.

⁶⁹ Maladie héréditaire du métabolisme des purines. Due à un déficit de l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT), elle entraîne un retard de développement de l'enfant (troubles neurologiques et comportementaux).

⁷⁰ En collaboration avec l'équipe de Thierry Rabilloud du CEA Grenoble. Aude-Garcia, C., et al. (2016) A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. *J. Proteomics* 134, 174_185.

⁷¹ Par le biais d'une ionisation électrospray.

1. La première étape consistait à préparer des solutions calibrées (standards ou étalons⁷²) des nucléotides en utilisant principalement des produits commerciaux ;
2. La deuxième phase consistait à déterminer, à partir de protocoles déjà décrits, des conditions de séparation chromatographique compatibles avec la spectrométrie de masse ;
3. L'étape suivante concernait la mise au point d'un protocole d'extraction des nucléotides à partir des cellules en culture, tout en minimisant le problème de déphosphorylation (perte d'un groupe phosphate)⁷³ ;
4. La dernière partie du projet visait à déterminer si un traitement de cellules avec des NPs d'argent pouvait induire un déséquilibre du « pool » de nucléotides. Ainsi, des cellules ont été traitées avec deux types de NPs d'argent (inférieurs à 20 ou 100nm) et à deux concentrations ou bien avec un sel d'argent servant d'élément de comparaison car la toxicité des NPs d'argent semble provenir de leur solubilisation.

Ce projet a permis de développer et valider une approche analytique basée sur la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem pour détecter et quantifier, après extraction, les nucléotides intracellulaires. Cette méthode a permis de montrer qu'un traitement des cellules (A549) par des nanoparticules entraîne une baisse significative des nucléotides triphosphates intracellulaires (notamment, ATP et GTP) alors que ces taux ne sont pas impactés lors du traitement des mêmes cellules par des sels d'argent.

Résultats

Dans ces conditions, une diminution significative de guanosine triphosphate (GTP) et d'adénosine triphosphate (ATP) a été observée. Une baisse de thymidine triphosphate (TTP) et d'uridine triphosphate (UTP) a été également mesurée. Les effets sont plus importants suite au traitement par les plus grosses nanoparticules, celles dont la dissolution est la plus faible. À noter que ces baisses sont beaucoup moins importantes (voire inexistantes) suite au traitement par les sels d'argent. Ceci suggère que l'effet observé n'est pas lié à la dissolution des nanoparticules.

⁷² Ces standards permettront ensuite de garantir l'aspect quantitatif de la méthode utilisée.

⁷³ Les premiers essais ont montré une importante déphosphorylation des nucléotides lors de l'hydrolyse des cellules, notamment en utilisant un mélange 50/50 méthanol-eau comme solution de lyse. Peu de travaux avaient fait été de ce problème auparavant, certainement parce qu'il n'est pas facile à mettre en évidence.