



Université de Strasbourg et Université de Carthage

THESE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences Biologiques

Spécialité : Physiologie animale

Option : Nanotoxicologie

Présentée Par :

Yosra Baratli

**ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER (Fe_3O_4)
CHEZ LE RAT
ANALYSES MITOCHONDRIALES ET DU STRESS OXYDANT**

Thèse soutenue le 06 juin 2015 devant le jury composé de :

Mr. Kamel Kacem	Rapporteur	Faculté des Sciences de Bizerte
Mr. Stephan Kraehenbuehl	Rapporteur	Université de Bâle
Mme. Olfa Tebourbi	Examineur	Faculté des Sciences de Bizerte
Mr. Hafedh Abdelmelek	Directeur de thèse	Faculté des Sciences de Bizerte
Mr. Bernard Geny	Directeur de thèse	Faculté de Médecine de Strasbourg

Année Universitaire 2014 - 2015

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Bernard GENY de m'avoir accueilli dans son unité de recherche « Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire » de la faculté de médecine de Strasbourg et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions. Je voudrais également le remercier d'avoir accepté de diriger ma thèse malgré ses nombreuses charges.

Je remercie également le Professeur Mohsen SAKLY de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Physiologie Intégrée de la faculté des sciences de Bizerte. Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur Hafedh ABDELMELEK d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir proposé un sujet aussi innovateur.

J'adresse tous mes remerciements au Docteur Olfa TEBOURBI pour son aide, ses corrections et ses directives qui m'ont été d'un grand soutien pour mener à terme cette thèse.

Je tiens aussi à remercier le docteur Joffrey ZOLL et le docteur Anne Laure CHARLE pour leur aide et leur soutien durant toutes les périodes de mes séjours au niveau du laboratoire « Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire » de Strasbourg et je remercie madame Fabienne GOUPILLEAU, madame Isabelle BENTZ et madame Anne-Marie KASPROWICZ pour leurs aides précieux.

Je remercie vivement les professeurs Kamel Kassem et Stephan KRAEHENBUEHL pour avoir consacré du temps à la lecture de ce document en tant que rapporteurs de ce travail et membres du comité de thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de Synthèse et Structures de Nanomatériaux de la faculté des sciences de Bizerte et notamment les professeurs Leila SMIRI et Lotfi BEN TAHAR pour m'avoir fournis les nanoparticules d'oxyde de fer.

Je remercie également le docteur Mohamed Tahar YACOUBI (laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques, CHU Farhat Hached Sousse) pour l'aide qu'il m'a apporté dans la confection des coupes histologiques et Monsieur Béchir AZIB pour son aide précieuse durant les périodes de ma thèse.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Pour finir, je remercie toute ma famille pour son soutien tout le long de cette thèse notamment mon mari Hedi CHAKROUN pour ses encouragements dans les moments les plus difficiles.

PUBLICATIONS

Baratli, Y., Charles, A.L., Wolff, V., Ben Tahar, L., Smiri, L., Bouitbir, J., Zoll, J., Piquard, F., Tebourbi, O., Sakly, M., Abdelmelek, H., Geny, B., 2013. Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling. *Toxicol In Vitro* 27, 2142-2148.

Baratli, Y., Charles, A.L., Wolff, V., Ben Tahar, L., Smiri, L., Bouitbir, J., Zoll, J., Sakly, M., Auger, C., Vogel, T., Abdelmelek, H., Tebourbi, O., Geny, B., 2014. Age modulates Fe₃O₄ nanoparticles liver toxicity: dose-dependent decrease in mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling in middle-aged as compared to young rats. *Biomed Res Int* 2014, 474081.

Kucukoglu, K., Gul, H.I., Cetin-Atalay, R., Baratli, Y., Charles, A.L., Sukuroglu, M., Gul, M., Geny, B., 2013. Synthesis of new N,N'-bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides and evaluation of their cytotoxicity against human hepatoma and breast cancer cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 29, 420-426.

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'Environnement Et du travail
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AESA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
ASAT	Aspartate Amino Transférase
ALAT	Alanine Amino Transférase
ATP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Al ₂ O ₃	Oxyde d'aluminium
CAT	Catalase
CoQ10	Ubiquinone
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FSA	Food Standard Agency
Fe ₃ O ₄	Magnétite
Fe ₂ O ₃	Maghémite
FAD	Flavine adénine dinucléotide

LISTE DES ABREVIATIONS

Fe ³⁺	Fer ferrique
Fe ²⁺	Fer ferreux
GM	Glutamate-Malate
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GR	Glutathion réductase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H&E	Hématoxyline et Eosine
Hcl	Acide chlorhydrique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KHz	Kilohertz
LDH	Lactate déshydrogénase
MDH	Malate Déshydrogénase
MDA	malonedialdéhyde
mPTP	pore de transition mitochondrial
Nacl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ EDTA	Sel de disodium acide éthylènediaminetétraacétique
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO [*]	Monoxyde d'azote

LISTE DES ABREVIATIONS

O_2^-	Anion superoxyde
$OH^\bullet$	Radical hydroxyl
1O_2	Oxygène singlet
SOD	Superoxyde Dismutase
SiO_2	Dioxyde de silicium
TBS	Tris-Buffered Saline
Tris-Hcl	Trishydroxyméthylaminométhane Hydrochloride
TMRE	Tetramethylrhodamine ethyl ester
TBA	Acide Thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TNB	Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
tmpd	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
TiO_2	Dioxyde de Titane
TOM	Translocase of the Outer Membrane
US EPA	U.S. Environmental Protection Agency
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
ZnO	Oxyde de Zinc

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LES NANOPARTICULES	4
1. 1. Définition	4
1. 2. Les sources des nanoparticules	6
1. 3. Les nanoparticules d'oxyde métallique	6
1. 4. Les applications cliniques des nanoparticules d'oxyde de fer	7
1. 4. 1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	8
1. 4. 2. Attraction magnétique des cellules.....	9
1. 4. 3. Hyperthermie.....	10
1. 5. Les risques pour l'homme et l'environnement.....	12
1. 5.1. Effet des nanoparticules sur l'environnement.....	13
1. 5. 2. Effet des nanoparticules sur l'homme	16
a. Voies d'entrée dans l'organisme	17
b. Translocation et devenir dans l'organisme.....	19
c. Effet sur la santé humaine	21
1. 6. Toxicologie.....	24
1. 6. 1. Toxicité des oxydes métalliques	25
2. LA MITOCHONDRIE.....	27
2. 1. Structure	27
2. 1. 1. La membrane externe	28
2. 1. 2. L'espace inter-membranaire.....	28
2. 1. 3. La membrane interne.....	28
2. 1. 4. La matrice mitochondriale.....	29
2. 2. Distribution des mitochondries dans les différents organes de l'organisme	30
2. 3. Fonctionnement de la mitochondrie	31
2. 3. 1. La chaîne de transport des électrons.....	31
2. 3. 2. La phosphorylation oxydative	32
a. Complexe I : NADH déshydrogénase	33
b. Complexe II : Succinate déshydrogénase.....	34
c. Complexe III : Complexe b-c1 ou ubiquinone-cytochrome c réductase	35
d. Complexe IV : Cytochrome c oxydase	35
e. ATP synthase.....	36

3. LE STRESS OXYDANT	37
3. 1. Définition	37
3. 2. Classification des marqueurs	38
3. 3. Différentes formes des radicaux libres	39
3. 4. Sources cellulaires des radicaux libres	41
3. 4. 1. L'auto-oxydation de petites molécules	41
3. 4. 2. La xanthine oxydase	41
3. 4. 3. La NADPH oxydase	41
3. 4. 4. Le réticulum endoplasmique	42
3. 4. 5. Les peroxysomes	42
3. 4. 6. La mitochondrie	42
3. 5. Les défenses cellulaires contre le stress oxydant	43
3. 5. 1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	44
a. La superoxyde dismutase (SOD)	44
b. Glutathion peroxydase (GPX) et réductase (GR)	44
c. La catalase (CAT)	45
3. 5. 2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	46
a. Les oligoéléments	46
b. Les caroténoïdes	46
c. Le glutathion	46
d. Les ubiquinones et cytochrome c	47
e. Les vitamines E et C	47
f. Acide α -lipoïque	47
g. Métaux de transition et protéines de transport	48
3. 6. Les conséquences du stress oxydant	48
3. 6. 1. La peroxydation lipidique	48
3. 6. 2. Oxydation des protéines	49
3. 6. 3. Dommages de l'ADN	49
3. 6. 4. Activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)	50

MATERIELS ET METHODES

1. Nanoparticules étudiées	52
1. 1. Synthèse de Fe_3O_4 par la méthode polyol	52
1. 2. Préparation des suspensions de nanoparticules	54
1. 2. 1. Préparation des suspensions de nanoparticules pour le protocole d'étude du stress oxydant	54
1. 2. 2. Préparation des suspensions de nanoparticules pour le protocole d'étude la respiration mitochondriale	54
2. Tampons et produits	54
3. Animaux	55
4. Traitement des animaux	55
5. Dosage des protéines	56

6. Mesure des paramètres du stress oxydant	57
6. 1. Dosage des activités des enzymes antioxydantes.....	57
6. 1. 1. La superoxyde dismutase (SOD).....	57
a. Principe	57
b. Mode opératoire	57
c. Calcul de l'activité de la SOD	58
6. 1. 2. Glutathion peroxydase (GPx).....	58
a. Principe	58
b. Mode opératoire	59
c. Calcul de l'activité de la GPX	59
6. 1. 3. La catalase (CAT)	59
a. Principe	59
b. Mode opératoire	60
c. Calcul de l'activité de la catalase	60
6. 1. 4. Mesure de la peroxydation lipidique (MDA)	61
a. Principe	61
b. Mode opératoire	61
c. Calcul de la concentration de la MDA	62
6. 1. 5. Mesure des taux des sulfhydriles non protéiques.....	63
a. Principe	63
b. Mode opératoire	63
c. Calcul du taux des sulfhydriles non protéiques	63
7. Détermination de l'activité plasmatique des transaminases hépatiques.....	64
7. 1. Mesure de l'activité de l'aspartate amino transférase (ASAT)	64
7. 2. Mesure de l'activité de l'alanine amino transférase (ALAT).....	65
8. Détermination de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH)	66
a. Principe	66
b. Mode opératoire	66
c. Calcul de l'activité du lactate déshydrogénase.....	67
9. Techniques histologiques	67
10. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale.....	68
10. 1. Préparation des mitochondries isolées	68
10. 2. Exposition des mitochondries aux nanoparticules	68
10. 3. Protocole d'étude de la chaîne respiratoire mitochondriale	69
11. Calculs statistiques	71

RESULTATS

CHAPITRE I. Techniques de caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe₃O₄)

1. Objectifs	72
--------------------	----

2. Caractérisation par diffraction de rayons X (DRX) sur poudre	73
3. Caractérisation par microscopie électronique à transmission	74

CHAPITRE II. Toxicité hépatique aigue des nanoparticules d'oxyde de fer *in vivo* sur le système antioxydant

1. Objectifs	75
2. Rôle du stress oxydant dans la toxicité hépatique des nanoparticules Fe ₃ O ₄	75
2. 1. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD).....	75
2. 2. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPX).....	76
2. 3. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de la catalase (CAT).....	76
2. 4. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur la peroxydation lipidique (MDA).....	77
2. 5. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le taux des groupements sulfhydriles non protéiques hépatiques	78
3. Evaluation biochimique de l'atteinte hépatique après exposition aux nanoparticules oxyde de fer	79
4. Effet de l'exposition orale aigue aux nanoparticules oxyde de fer sur l'architecture hépatique	81

CHAPITRE III. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer *in vitro* : Effet sur la respiration mitochondriale

1. Objectifs	88
2. Evaluation de la ligne de base des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein	88
3. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe ₃ O ₄) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cerveau.....	90
4. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe ₃ O ₄) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cœur	91
5. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe ₃ O ₄) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du poumon	92
6. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe ₃ O ₄) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du rein	93

7. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe_3O_4) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du foie	94
--	----

CHAPITRE IV. Effet de l'âge sur la toxicité mitochondriale hépatique des nanoparticules de Fe_3O_4

1. Objectifs	96
2. Effet de l'âge sur la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et sur le couplage Mitochondrial	96
3. Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats jeunes	97
4. Effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés	98
5. Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le couplage mitochondriale hépatique chez les rats jeunes et âgés	99
6. Effet de l'oxyde de fer sous sa forme non particulaire sur l'activité et le couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés	100
DISCUSSION GENERALE	102
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIE	116

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique, 2005).

Figure 2 : Structure cristalline des nanoparticules Fe_3O_4 .

Figure 3 : Nanoplateformes magnétiques pour la nanomédecine.

Figure 4 : Principe de l'échauffement sélectif de cellules tumorales ciblées par des nanoparticules magnétiques.

Figure 5 : Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement. En rouge sont indiquées les voies de contaminations primaires et en bleu les voies de dégradation hypothétiques.

Figure 6 : Effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de masse (d'après Yean et al., 2005).

Figure 7 : Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme.

Figure 8 : Effets potentiels des particules ultrafines inhalées (Oberdorster et al., 2005).

Figure 9 : Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine décrit dans la littérature (d'après Ostiguy et al., 2008).

Figure 10 : structure mitochondriale.

Figure 11 : Espace inter-membranaire.

Figure 12 : Localisation des mitochondries au niveau du muscle cardiaque et du flagelle spermatique.

Figure 13 : Sens du déplacement de la mitochondrie.

Figure 14 : Structure schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Figure 15 : Chaîne de transport des électrons mitochondriale dans la cellule.

Figure 16 : Structure de l'ATP synthase (Wang and Oster, 1998).

Figure 17 : Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes.

Figure 18 : Schéma des différentes formes d'ERO.

Figure 19 : Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant. D'après Grandjean (2005).

Figure 20 : Structure du mPTP.

Figure 21 : Schéma du montage à reflux pour la synthèse par la méthode polyol.

Figure 22 : Photo prise sur la poudre des nanoparticules magnétite (Mgn).

Figure 23 : Courbe d'étalonnage des protéines dosées par la méthode de Lowry (1951)

Figure 24: (A) Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. (B) Schéma d'un tracé oxygraphique de mitochondrie isolé.

Figure 25 : Diffractogramme DRX sur poudre de nanoparticules Fe_3O_4 superposé avec le diffractogramme calculé (bâtonnets) du massif de Fe_3O_4 .

Figure 26 : Morphologie des nanoparticules Fe_3O_4 observées par MET (a) et histogramme correspondant de tailles (b)

Figure 27 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD) hépatique.

Figure 28 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique.

Figure 29 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la catalase hépatique.

Figure 30 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le taux de la peroxydation lipidique hépatique.

Figure 31 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le taux du sulfhydryle hépatique.

Figure 32 : Architecture microscopique du foie témoin

Figure 33 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 24h.

Figure 34 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 48h.

Figure 35 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 5jours.

Figure 36 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 15jours.

Figure 37 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 30jours.

Figure 38 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 24h.

Figure 39 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 48h.

Figure 40 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 5jours.

Figure 41 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 15jours.

Figure 42 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 30jours.

Figure 43 : Tracé oxygraphique représentatif avec les nanoparticules et les principaux substrats mitochondriaux.

Figure 44 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du cerveau.

Figure 45 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du cœur.

Figure 46 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du poumon.

Figure 47: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du rein.

Figure 48: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du foie.

Figure 49: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats jeunes.

Figure 50: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés.

Figure 51: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le couplage mitochondrial hépatique chez le rat jeune (A) et âgé (B).

Figure 52: Effet de 350 $\mu\text{g/ml}$ de Fe_3O_4 sous sa forme non particulaire sur l'activité et le couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des principaux marqueurs du stress oxydant. D'après Powers and Jackson (2008).

Tableau 2 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'activité catalase

Tableau 3 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de la peroxydation lipidique

Tableau 4 : Quantités des réactifs et conditions de mesure des taux des sulfhydriles non protéiques

Tableau 5 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'aspartate amino transférase

Tableau 6 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'alanine amino transférase.

Tableau 7: Quantités des réactifs et conditions de mesure du lactate déshydrogénase.

Tableau 8 : Les différentes étapes de préparation des coupes histologiques

Tableau 9 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la LDH et des transaminases hépatiques

Tableau 10: Ligne de base des activités des complexes de la chaîne respiratoire au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein.

Tableau 11: Le couplage mitochondrial : les valeurs de base et les réponses aux différentes concentrations de nanoparticules 100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein.

Tableau 12: Les valeurs témoins des activités de la chaîne respiratoire mitochondriale du foie et le couplage mitochondriale

INTRODUCTION GENERALE

L'exposition humaine à des particules atmosphériques ultrafines (PUF < 100 nm) est devenue au cours des dernières années une question importante de santé publique, mise en lumière par l'analyse de la composition des particules atmosphériques et de leurs effets biologiques (Peters et al., 1997). Celles-ci, en milieu urbain, peuvent être formées de plus de 80% de suies fines (<1µm) et ultrafines provenant de la combustion des carburants fossiles (Baulig et al 2004). Ces particules, émises notamment par les véhicules Diesel, les véhicules à essence et les chauffages urbains, ont rapidement été suspectées d'être à l'origine de la morbidité et de la mortalité cardiorespiratoires observées dans les études épidémiologiques sur les effets à court terme de la pollution atmosphérique (Atkinson et al., 2001 ; Le Tertre et al., 2002). Elles seraient principalement à l'origine de réponses inflammatoires pouvant aggraver des pathologies pulmonaires telles que l'asthme (Gong et al., 2003 ; Pietropaoli et al., 2004) et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Elles auraient également un effet prothrombotique et pourraient être à l'origine d'athérosclérose et de pathologies cardiovasculaires (Schultz et al., 2005).

Le développement récent des nanotechnologies va élargir les sources de pollution avec la production accrue de nanomatériaux manufacturés, dont des nanoparticules, qui vont se retrouver en milieu professionnel et, vraisemblablement, en environnement général. Il existe différentes sources de production des nanoparticules : les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques ...), les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage,...) et les sources industrielles (nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme).

Il existe plusieurs voies d'entrée potentielle des nanoparticules dans les organismes vivants. Le système respiratoire est généralement la première voie venant à l'esprit du fait de l'analogie avec les particules atmosphériques ultrafines. Mais d'autres voies d'exposition comme l'ingestion (système gastro-intestinal), la voie cutanée (système dermique) et les injections de nanoparticules dans la circulation sanguine sont également à prendre en considération compte tenu des modes d'utilisations des nanoparticules manufacturées. Des études ont montré que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoire ou digestive (Oberdörster et al., 2005).

La conséquence, c'est que des nanoparticules indésirables pourraient se retrouver distribuées un peu partout dans l'organisme des travailleurs exposés. Or, plusieurs de ces nanoparticules ont démontré d'importants effets toxiques.

Parmi tous les types de nanomatériaux disponibles, notre étude s'est restreinte à un type de nanoparticules à savoir des nanoparticules d'oxydes de fer (Fe_3O_4) pour leur importance dans le développement actuel des nanotechnologies.

Les nanoparticules d'oxydes de fer et plus spécifiquement la magnétite Fe_3O_4 et la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ont de nombreuses applications biomédicales (Gupta et al., 2005 ; Ngomsik et al., 2005). Elles sont utilisées dans le diagnostic médical par imagerie IRM, le traitement des tumeurs par hyperthermie (Puppi et al., 2011; Rumenapp et al., 2012), ou la vectorisation de médicaments pour un ciblage intracellulaire (Chen et al., 2010) car ces oxydes sont dotés de propriétés magnétiques leur permettant d'être manipulés par un champ magnétique extérieur. Les nanoparticules métalliques de fer sont étudiées et commencent à être employées pour la dépollution des eaux souterraines et des sols contaminés (Wei-Xian et al., 2003).

En mars 2009, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA, aujourd'hui ANSES) a déclaré que les études de toxicité des nanoparticules par voie orale sont lacunaires, le plus souvent limitées à des conditions d'ingestion par gavage sur une période courte. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules testées et leur interaction avec la matrice alimentaire sont insuffisamment documentées. Les quelques résultats rapportés sont souvent discordants et ne permettent pas de conclure à un effet dose, à un effet taille, à une relation entre les caractéristiques physico-chimiques de la particule et la toxicité.

Les rares données de toxicocinétique ont montré que le tube digestif puis tous les organes sont des cibles potentielles des nanoparticules. Seules quelques études ont abordé la toxicité des nanoparticules après ingestion orale. Ces études ont été menées essentiellement avec des métaux ou des oxydes de métal comme le sélénium, le cuivre et le zinc (Wang et al., 2006, Warheit et al., 2007, Kim et al., 2008). Aussi sur le plan, *in vitro*, les résultats des études réalisées sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer au niveau cellulaire sont différents. En effet, il y a des études qui montrent que ces nanoparticules ne présentent aucune toxicité (Soenen et al., 2011 ; Karlsson et al., 2008) alors que d'autres études montrent un effet toxique aux fortes concentrations (Naqvi et al., 2010 ; Hussain et al., 2005).

Dans ce cadre, la présente étude s'est intéressée aux effets des nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 , *in vitro*, plus particulièrement à la respiration mitochondriale et, *in vivo*, au stress oxydant.

La première partie de notre étude s'est intéressée à la caractérisation des propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 utilisées à l'aide des méthodes de microscopie électronique à transmission et de diffraction de rayons X.

La seconde partie s'est intéressée à l'étude des effets des nanoparticules Fe_3O_4 *in vivo*. A savoir, étudier leurs effets au cours du temps sur le système antioxydant hépatique après exposition aigue par voie orale.

La troisième partie s'est intéressée à l'étude des effets des nanoparticules Fe_3O_4 *in vitro*. Plus particulièrement, étudier leurs effets sur la respiration mitochondriale de différents organes (cerveau, cœur, poumon, foie et rein).

La quatrième partie s'est intéressée à l'étude de l'effet de l'âge sur la toxicité mitochondriale hépatique des nanoparticules Fe_3O_4 en comparant les activités et le couplage des chaînes respiratoires mitochondriales des rats jeunes (3mois) et des rats âgés (18mois)

Le présent manuscrit est organisé en quatre parties : Une première partie intitulée « SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE » qui a fait l'état des différents travaux réalisés et les résultats obtenus par d'autres auteurs sur les mêmes thématiques du travail. Une deuxième partie intitulée « MATÉRIELS ET MÉTHODES » présentant les différentes techniques d'analyses, de toxicologie et de physiologie utilisées dans ces travaux. Une TROISIÈME PARTIE « RESULTATS » présentant les résultats obtenus et Une QUATRIÈME PARTIE qui concerne la discussion générale des résultats, la conclusion générale et les perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES NANOPARTICULES

1. 1. Définition

On appelle nanoparticules des particules de matière de quelques millièmes de millimètre. Les nanoparticules sont des particules ultra-fines (PUF) dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres (milliardième de mètre) (figure 1). Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. La définition par l'échelle ne suffit cependant pas à décrire tous les aspects des nanoparticules.

En effet, leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques particulières sont liées en plus à leur surface spécifique qui est la surface totale de la particule normalisée par la masse. Ainsi, une particule de 10 nm de diamètre aura une surface spécifique 10 fois plus importante qu'une nanoparticule de 300 nm de diamètre. Cela représente une surface disponible 10 fois plus grande à masse égale pour interagir avec les membranes, les molécules biologiques ou les organites cellulaires et enfin leur réactivité de surface qui est également fortement liée à leur composition qui peut être très variée. On distingue par exemple les nanoparticules organiques (constituées majoritairement de polymères), des métalliques (ex : nanoparticules d'or ou d'argent), d'oxydes métalliques (ex : Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , TiO_2) ou encore des composites (ex : quantum dots CdSe-ZnS).

Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux nanoparticules Fe_3O_4 qui grâce à leurs caractéristiques particulières, les nanoparticules d'oxyde de fer font l'objet de nombreuses recherches sur leurs applications potentielles dans la médecine. Il est donc nécessaire de faire un point sur les risques encourus lors de l'exposition à ces nanoparticules *in vitro* et *in vivo*.

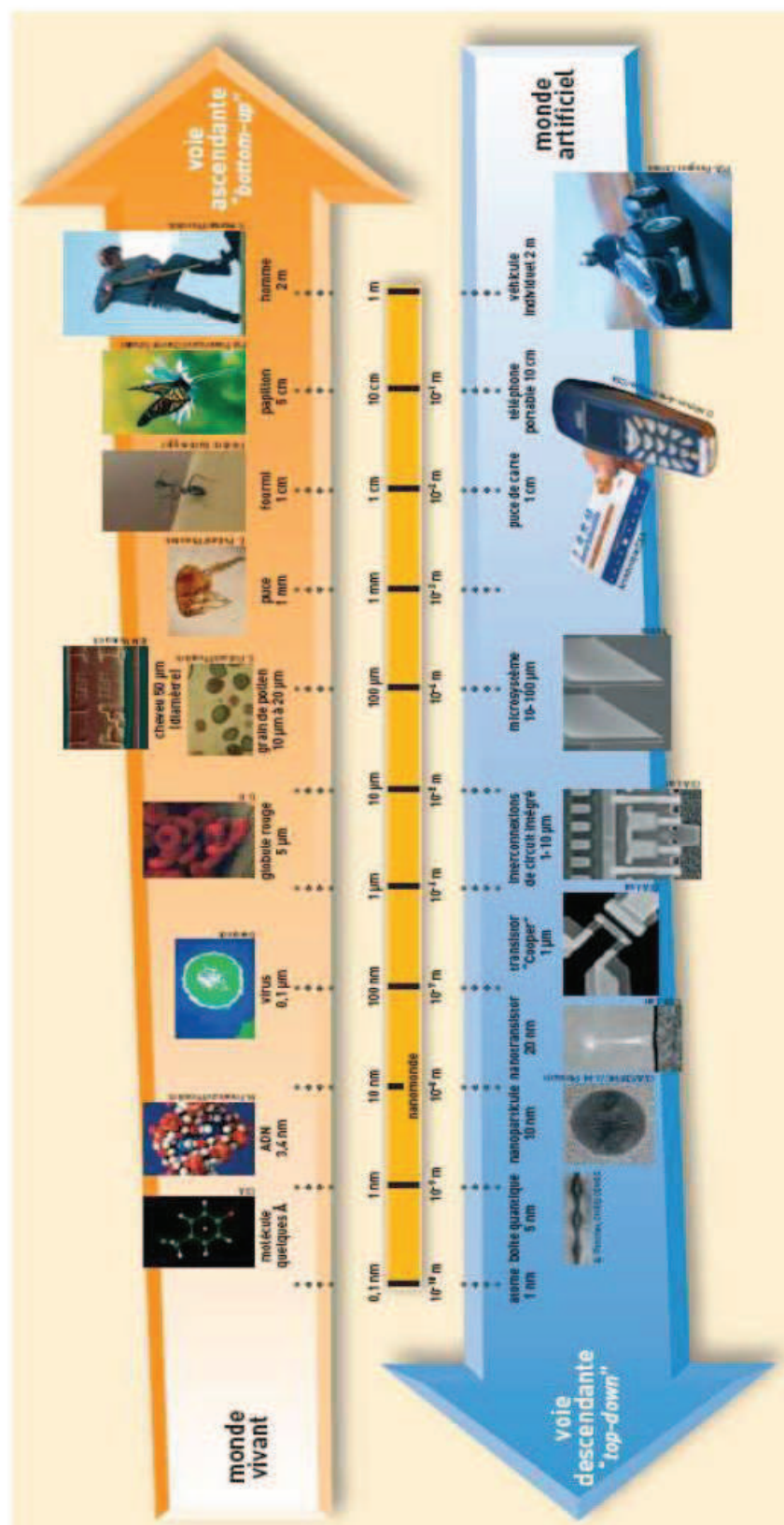


Figure 1 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique, 2005).

1. 2. Les sources des nanoparticules

On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance :

- les nanoparticules d'origine naturelle résultant essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère (feux de forêt, lave de volcan).
- les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs.
- les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées.

Les Hommes sont exposés depuis toujours à des nanoparticules naturelles. Cependant, c'est seulement depuis la révolution industrielle que cette exposition est devenue élevée. Plus récemment, l'essor des nanotechnologies a entraîné la production de plus en plus importante de nanoparticules manufacturées auxquelles les travailleurs peuvent être exposés mais aussi les populations en cas de dissémination dans l'environnement (Jankowska and Lukaszewska, 2013; Wu et al., 2014).

1. 3. Les nanoparticules d'oxyde métallique

Il en existe de nombreuses natures, mais les plus courantes sont : les oxydes de titane (TiO_2), les oxydes de fer (Fe_2O_3 et Fe_3O_4), les oxydes de zinc (ZnO), les oxydes d'aluminium (Al_2O_3) et la silice (SiO_2).

La magnétite (Fe_3O_4) est un oxyde de Fe^{3+} et Fe^{2+} possédant une structure spinelle inverse. Elle se compose d'un réseau cubique à face centrée (CFC) d'atomes d'oxygène qui délimitent des sites tétraédriques (Td) et octaédriques (Oh) dans lequel se logent les atomes de fer selon la formule suivante : $[\text{Fe}^{3+}] \text{ Td } [\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}] \text{ OhO}_4$ (Jolivet et al., 2004) (Figure 2).

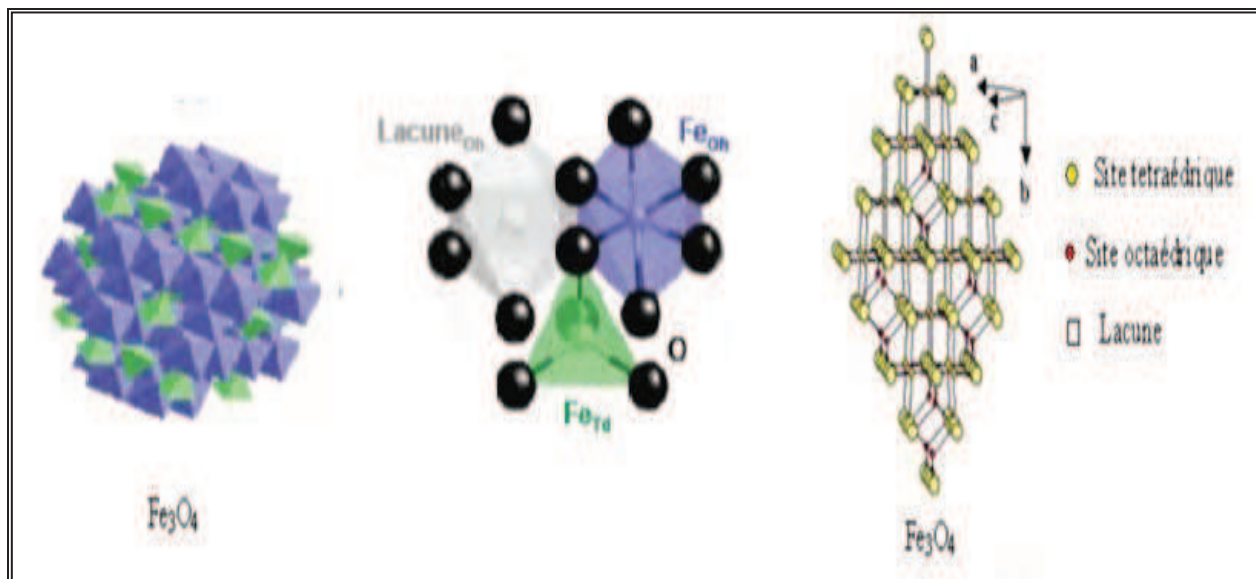


Figure 2 : Structure cristalline des nanoparticules de Fe_3O_4

1. 4. Les applications cliniques des nanoparticules d'oxyde de fer

Aujourd'hui, beaucoup d'argent est investi dans les recherches et des chercheurs espèrent un jour obtenir des implants de revêtements nanoparticules ou même des traitements contre la surdité à base de nanoparticules, mais ce ne sont que des applications potentielles qui n'ont pas encore été soumises à des expériences réelles. Cependant, il existe des applications médicales qui ont déjà été pratiquées ; le plus grand nombre d'applications concerne le domaine du traitement des tumeurs (Jayakumar et al., 2009; Liu et al., 2013). L'utilisation du magnétisme en médecine suscite depuis l'antiquité les plus grands espoirs. Ces dernières années, le développement de nano-aimants « exogènes » injectables dans l'organisme et capables d'interagir intimement avec les constituants du vivant ouvrent de nouvelles perspectives. Elles reposent toutes sur la possibilité d'activer à distance ces nano-aimants grâce à un champ magnétique externe. On distingue différents types de réponse selon le stimulus magnétique (Figure 3).

Dans un champ magnétique uniforme (comme celui utilisé en IRM), les nano-aimants (monodomaines ferro- ou ferrimagnétiques) créent localement une inhomogénéité de champ, qui perturbe la dynamique magnétique des protons environnants et engendre un contraste sur l'image. Les nanoparticules magnétiques se comportent alors comme des traceurs cellulaires ou moléculaires pour l'imagerie IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

- Dans un champ magnétique non uniforme dans l'espace (comme celui créé au voisinage d'un aimant), un vecteur de drogue, une cellule ou tout objet biologique contenant un nombre suffisant de nanoparticules magnétiques se verra soumis à une force magnétique, qui tendra à le rapprocher de l'aimant. On peut ainsi manipuler physiquement des entités biologiques par attraction magnétique, les trier, les retenir ou encore les attirer vers une cible spécifique.
- Enfin, dans un champ magnétique dépendant du temps (à des fréquences de quelques centaines de KHz), les nanoaimants oscillent en échauffant leur environnement. L'hyperthermie locale qui en résulte peut affecter des cellules malignes, potentialiser un traitement de chimio- ou de radiothérapie ou bien aider à la délivrance de médicaments sur une cible bien précise de l'organisme. L'hyperthermie magnétique appliquée au traitement de certaines tumeurs (glioblastome, tumeur de la prostate...) fait actuellement l'objet de plusieurs études cliniques.

1. 4. 1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM compte parmi les méthodes d'imagerie biomédicale les plus intéressantes car elle permet d'obtenir des informations à la fois morphologiques et fonctionnelles, tout en évitant l'utilisation de radiations ionisantes. Parallèlement, les agents de contraste IRM - paramagnétiques (comme les chélates de gadolinium) ou super paramagnétiques (comme les nanoparticules d'oxyde de fer) ont été considérablement développés car ils permettent, en créant des champs magnétiques locaux, de modifier les temps de relaxation des protons environnants et d'augmenter la sensibilité pour repérer une cible avec précision (Tanimoto and Kuribayashi, 2006; Wang, 2011). Lorsqu'on injecte par voie intraveineuse des nanoparticules d'oxyde de fer dans l'organisme, ces dernières sont rapidement capturées par les macrophages qui sont les cellules chargées d'éliminer les éléments pathogènes, exogènes ou encore les débris présents dans l'organisme.

Les nanoparticules ciblent donc très spécifiquement ces cellules phagocytaires et permettent de les détecter par IRM. Les macrophages étant impliqués dans les nombreuses pathologies associant une réaction inflammatoire (et donc un recrutement de macrophages), leur détection par IRM peut permettre le diagnostic de ces pathologies et l'évaluation de différents traitements (Corot et al., 2006). Il s'agit par exemple de maladies cardiovasculaires, telle que

l'athérosclérose, ou bien d'épisodes inflammatoires faisant suite à un rejet de greffe ou une attaque cérébrale (Beckmann et al., 2009). Certains de ces agents de contraste IRM sous forme de nanoparticules d'oxyde de fer sont déjà utilisés en clinique humaine, d'autres sont en cours d'évaluation (Corot et al., 2006).

Dans un champ magnétique uniforme (comme celui utilisé en IRM), les nano-aimants (monodomaines ferro- ou ferrimagnétiques) créent localement une inhomogénéité de champ, qui perturbe la dynamique magnétique des protons environnants et engendre un contraste sur l'image. Les nanoparticules magnétiques se comportent alors comme des traceurs cellulaires ou moléculaires pour l'imagerie IRM.

1. 4. 2. Attraction magnétique des cellules

Parallèlement au suivi par imagerie, l'idée d'utiliser des forces magnétiques pour retenir ou attirer des cellules thérapeutiques sur un organe cible a récemment émergé (Jayakumar et al., 2009). Les cellules marquées par des nanoparticules magnétiques peuvent être manipulées à distance par des gradients du champ magnétique. La force magnétique appliquée sur la cellule est alors proportionnelle au gradient de champ magnétique et à l'aimantation de la cellule dans le champ appliqué, c'est-à-dire au nombre de nanoparticules transportées par la cellule (Wilhelm et al., 2007). De simples aimants permettent de mettre en mouvement des cellules en suspension et de les diriger dans une direction donnée avec des vitesses de l'ordre de quelques $\mu\text{m/s}$. Une des techniques pour quantifier la capture en nanoparticules est d'ailleurs de mesurer la vitesse des cellules dans un gradient de champ donné (Wilhelm et al., 2002).

L'intérêt d'une attraction magnétique des cellules s'est récemment illustré dans le domaine cardiovasculaire. Le défi est de contrebalancer l'effet d'entraînement du flux sanguin en appliquant à distance des forces magnétiques sur les cellules. Des modèles *in vitro* ont d'abord été réalisés. Des substituts synthétiques de vaisseaux ont pu être recouverts d'une couche uniforme de cellules progénitrices endothéliales grâce à l'utilisation de forces magnétiques sur les cellules marquées par des nano-aimants (Pislaru et al., 2006). Poursuivant la même stratégie *in vivo*, des stents magnétisables (Polyak et al., 2008) ont été proposés pour retenir des cellules endothéliales après injection dans une artère lésée. Le concept de thérapie génique couplée à l'attraction magnétique a également été testé *in vivo*. En présence d'un flux hydrodynamique, la force magnétique potentialise la transfection génique et favorise le positionnement des cellules transfectées dans l'endothélium (Hofmann et al., 2009).

Toutes ces études montrent une augmentation significative du nombre des cellules, même en présence d'un fort cisaillement. Chaudeurge et al. (2011), ont également montré qu'on pouvait favoriser l'implantation de cellules progénitrices endothéliales dans un tissu cardiaque endommagé par l'effet de forces magnétiques. Une étude similaire a démontré un bénéfice thérapeutique du ciblage magnétique de cellules souches dans la thérapie cellulaire cardiaque (Cheng et al., 2010). Des cellules souches autologues provenant directement d'une biopsie du tissu cardiaque ont été marquées par des particules magnétiques et implanté en présence d'un aimant externe dans la zone infarctée d'un cœur de souris. Trois semaines après injection, le groupe d'animaux soumis à l'aimant présentait une meilleure régénération du tissu cardiaque et des fonctions améliorées par rapport au groupe témoin (Cheng et al., 2010). D'après les auteurs, ce type de technique chirurgicale, pourrait facilement être translatée en clinique humaine. D'autres stratégies de thérapie cellulaire pourraient dans l'avenir bénéficier d'un guidage magnétique de cellules.

1. 4. 3. Hyperthermie

Les progrès de nanotechnologie suscite l'espoir de nouveaux traitements du cancer, plus efficaces, mieux ciblés et sans effet secondaire. En fait les nanoparticules magnétiques sont des nanoparticules composées d'un cœur en fer dur et créées pour se fixer sélectivement sur une tumeur (en particulier sur des zones qui ont résisté à la radiothérapie). Leurs propriétés magnétiques sont d'une grande utilité. En effet, ces propriétés leur confèrent des caractéristiques additionnelles par rapport aux nanoparticules habituelles biodégradables en silice. On peut donc parler d'une double action dans leur utilisation.

Une des techniques faisant appel aux nanoparticules consiste à chauffer localement une tumeur (élévation de la température de l'ordre de 45°C) et à la rendre ainsi plus sensible à la radiothérapie ou à la chimiothérapie : c'est la technique d'hyperthermie.

Une des approches de l'hyperthermie utilise des nanoparticules superparamagnétiques (Maier-Hauff et al., 2011). Les nanoparticules sont greffées à un « ligand » qui joue le rôle de vecteur en reconnaissant la tumeur concernée, et s'y attache. Lorsqu'on applique un champ magnétique alternatif sur la nanoparticule, le renversement de l'aimantation de celle-ci, en phase avec celui du champ appliqué, a pour conséquence un échauffement de la nanoparticule, et donc de la tumeur (Figure 4).

Pour cette application particulière, la taille nanométrique des particules (environ 5 nm) réduit les effets de sédimentation dus à l'action de la pesanteur et facilite le passage des nanoparticules des veines à l'intérieur des tissus. Aussi, le caractère superparamagnétique associé aux dimensions nanométriques évite l'agglomération des nanoparticules, propriété résultant des interactions dipolaires entre particules ferromagnétiques aimantées.

Nanoparticules magnétiques (5-20 nm)

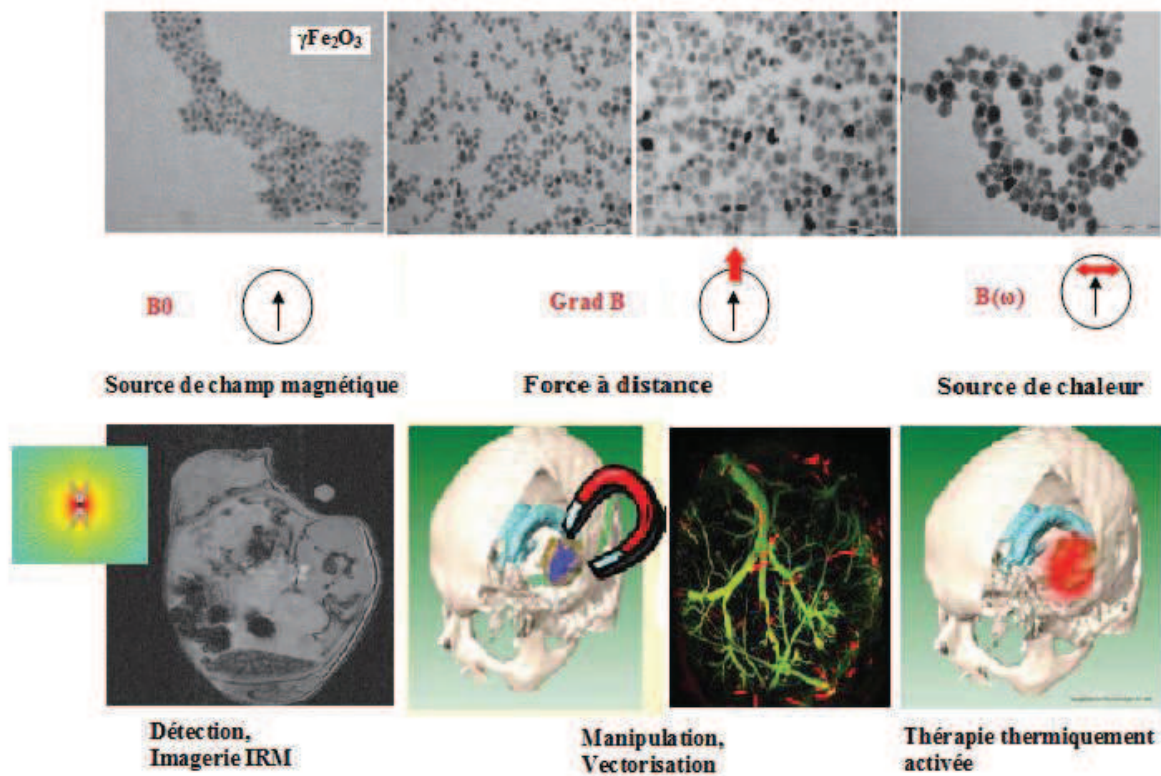


Figure 3 : Nanoplateformes magnétiques pour la nanomédecine

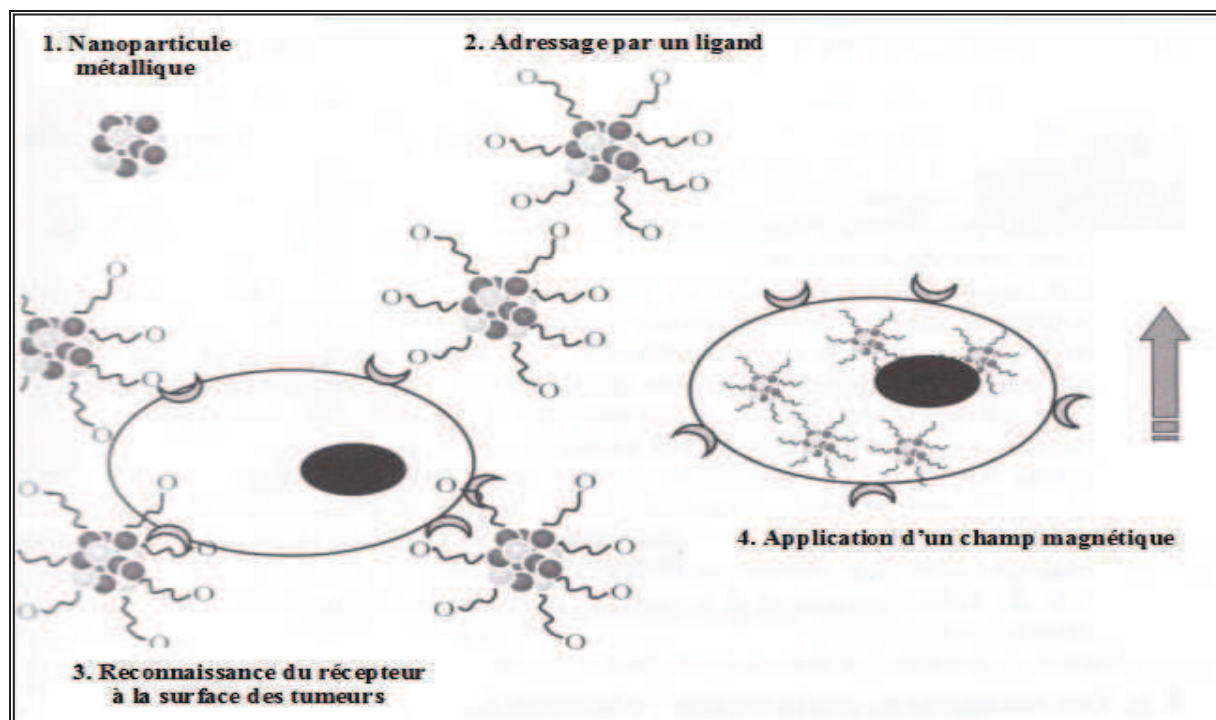


Figure 4 : Principe de l'échauffement sélectif de cellules tumorales ciblées par des nanoparticules magnétiques.

1. 5. Les risques pour l'homme et l'environnement

Les propriétés particulières des nanoparticules sont à l'origine d'interrogations sur de possibles risques pour l'environnement et pour l'homme. Afin d'apporter des éléments de réponse à ces interrogations, des travaux et réflexions ont été engagés par diverses instances au niveau national et international. Ces travaux portent en particulier sur l'état des connaissances générales, les besoins de recherche et d'acquisition de données, l'adéquation ou l'adaptation des dispositifs réglementaires actuels, notamment dans le champ alimentaire. Ainsi peuvent être cités les travaux de la FDA (U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force), de l'US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), de l'AFSSET (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail), de la FSA (Food Standard Agency), du BFR (Bundesinstitut für Risikobewertung) et du RIKILT (Institute of Food Safety, Wageningen UR).

Au niveau communautaire, notamment de la DG SANCO (Direction Générale de la santé et des Consommateurs), sont à noter les documents suivants :

- Plan d'action européen 2005-2009 sur nanosciences et nanotechnologies (adopté en juin 2005).
- Rapport du Parlement européen sur la mise en œuvre du Plan d'action (septembre 2007).
- Soutien dans le cadre du 7ème PCRD à la sécurité des nanotechnologies.
- Communication de la Commission sur les aspects réglementaires des nanotechnologies en juin 2008 (revue de l'adéquation des réglementations actuelles aux nanotechnologies).
- Travaux du SCENIHR (EC non-food Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) : en mars 2006 Opinion sur l'adéquation des méthodologies existantes pour évaluer les risques potentiels associés aux nanotechnologies. En mars 2007 Opinion sur l'adéquation aux nanomatériaux des lignes directrices et guides techniques actuels pour l'évaluation des risques des substances nouvelles et substances existantes. En janvier 2009, Opinion sur évaluation des risques des produits issus des nanotechnologies.
- Opinion de l'AESA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) du 10 février 2009 « Opinion of the Scientific Committee on the Potential Risks arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety.

Les conclusions de l'ensemble ces réflexions soulignent l'insuffisance des données disponibles pour évaluer les risques associés aux nanoparticules dans l'alimentation en lien avec leurs propriétés particulières, et la nécessaire adaptation des méthodologies d'évaluation actuellement appliquées aux risques liés aux substances chimiques :

- Insuffisance des études permettant d'analyser la toxicité par voie orale, la plupart des informations disponibles dérivant de la toxicité par inhalation.
- Besoin de méthodes pour la détection, quantification, suivi de ces nanoparticules dans les différentes matrices (pour approcher l'exposition) et dans l'organisme (pour la toxicocinétique notamment).
- Modification des effets barrières à la pénétration des particules dans le corps et à leur circulation dans les organes.

1. 5. 1. Effet des nanoparticules sur l'environnement

Des études commencent à montrer l'impact que pourrait avoir les nanoparticules sur l'environnement, mais actuellement il est difficile de savoir si les nanoparticules vont poser un problème pour l'environnement à court ou à long terme. C'est pourquoi l'Union Européenne préconise le principe de précaution en ayant adopté un code de bonne conduite

pour une recherche responsable en nanosciences et nanotechnologies (Union Européenne, 2008).

Actuellement, les connaissances sont très pauvres sur la mise en circulation des nanoparticules manufacturées dans l'environnement. Leur relargage peut s'effectuer sous forme de poussières ou de suspension liquide au moment de leur fabrication, par l'abrasion ou l'altération des structures qui les maintiennent (ex : usure mécanique), par rejet d'effluents liquides ou gazeux par les installations de production ou de traitement. Les différentes plantes peuvent absorber, par leurs racines, les nanoparticules transportées par le sol, ainsi que les nanoparticules présentes dans l'air, par leurs stomates. La flore pourrait donc être indirectement contaminée par les nanoparticules transportant des polluants (Figure 3).

A ce jour, il n'existe ni préconisation ni suivi pour la prise en compte des risques que peuvent poser les déchets comportant des nanoparticules. Les données disponibles ne permettent pas non plus d'estimer la population qui pourra être potentiellement exposée durant la fabrication, la mise en œuvre et l'usage des nanoparticules.

Un rapport britannique estime qu'en 2015, 1500 fois plus de travailleurs qu'en 2004 seront exposés aux nanoparticules lors de leur production et de leurs utilisations industrielles (Health and Safety Executive, 2004). L'exposition des consommateurs va également croître rapidement, soit par une utilisation explicite de nanoparticules (ex : fluides magnétiques) soit par l'altération des matériaux incluant des nanoparticules sans que le consommateur soit averti (ex : crème solaire).

Dans le domaine environnemental, les nanoparticules manufacturées sont des objets prometteurs capables d'apporter des solutions à un grand nombre de problèmes comme la dépollution des eaux profondes (Lowry and Johnson, 2004) et des sols (Wei-xian et al., 2003), le traitement des eaux de consommation (Ngomsik et al., 2005), le contrôle de la pollution (Riu et al., 2006). C'est le cas des nanoparticules de fer métal qui sont injectées dans des aquifères situés en sous-sols de sites pollués américains. Grâce à leurs propriétés catalytiques, elles convertissent certains contaminants organiques (composés chlorés, pesticides...) en composés non toxiques (Choe et al., 2000; Kanel et al., 2005). Les suspensions de nanoparticules d'oxydes de fer sont également étudiées pour le traitement des eaux de surface et des effluents (Hu et al., 2005; Uheida et al., 2006). Dans ce cas, ce sont les propriétés nano-adsorbantes et superparamagnétiques qui sont mises en valeur.

Les oxydes de fer sont une voie prometteuse dans ce domaine du fait de leur forte affinité pour les polluants organiques et inorganiques et de leur superparamagnétisme (Al-badleh et al., 2003 ; Johnson and Hallberg, 2005; Stipp et al., 2002). Grâce à leurs propriétés magnétiques, les particules d'oxydes de fer ayant adsorbées les polluants peuvent être retirées des eaux polluées, régénérées et réutilisées ce qui permet de limiter la génération de déchets secondaires (Ngomsik et al., 2005).

Des techniques utilisant des microparticules d'oxydes de fer magnétiques ont déjà fait leurs preuves dans ce domaine, mais des avantages indéniables peuvent être apportés par l'utilisation de nano-oxydes de fer. En effet, pour une même masse de particules, des nanoparticules de magnétite de 10 nm de diamètre peuvent retenir à leur surface 90 à 600 fois plus d'arsenic que des particules 300 nm et 1 μm (Mayo et al., 2007; Yean et al., 2005) (Figure 6).

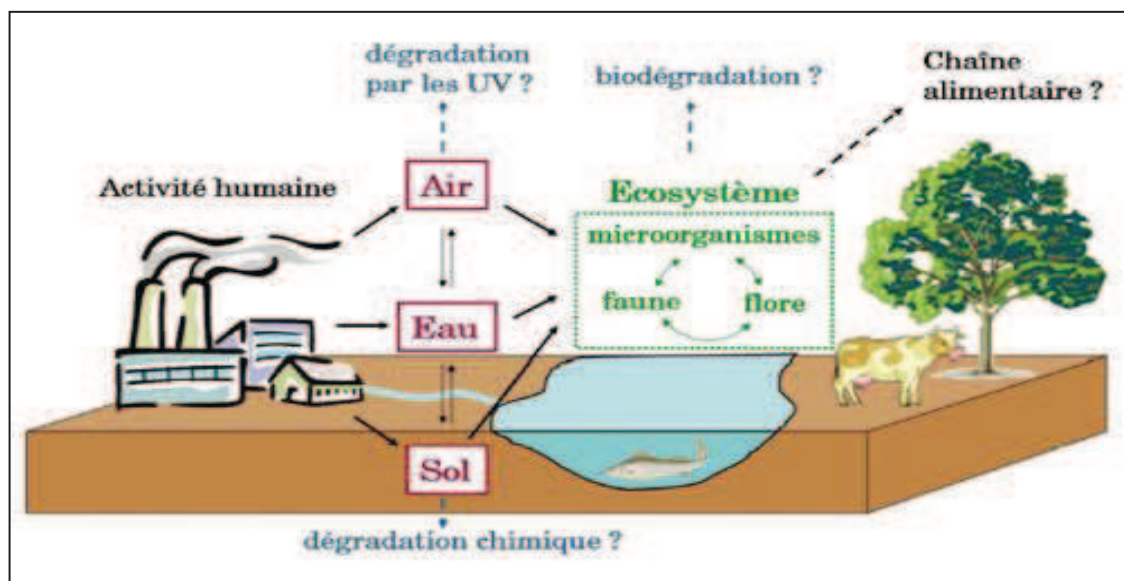


Figure 5 : Contamination et devenir des nanoparticules dans l'environnement. En rouge sont indiquées les voies de contaminations primaires et en bleu les voies de dégradation hypothétiques.

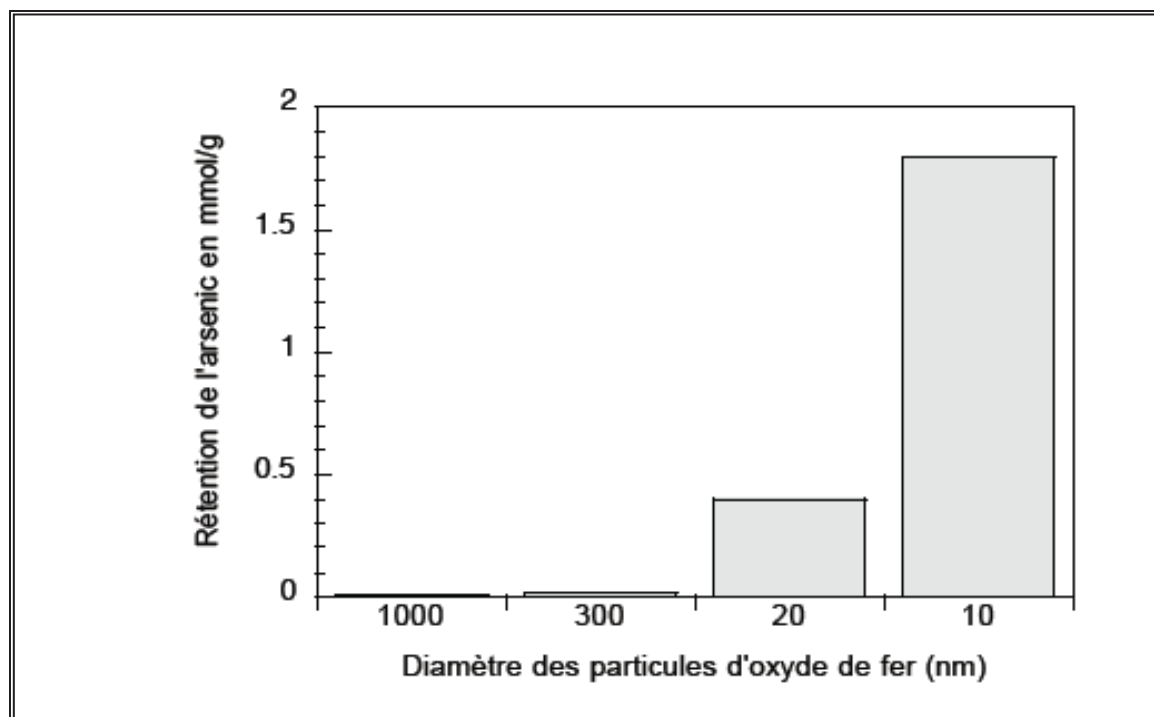


Figure 6 : Effet de la taille des particules d'oxyde de fer sur leur capacité de rétention de l'arsenic trivalent par unité de masse (d'après Yean et al., 2005).

1. 5. 2. Effet des nanoparticules sur l'homme

Il existe plusieurs voies d'entrée potentielle des nanoparticules manufacturées dans les organismes vivants. Le système respiratoire est généralement la première venant à l'esprit du fait de l'analogie avec les particules atmosphériques ultrafines. Mais d'autres voies d'exposition comme l'ingestion (système gastro-intestinal), la voie cutanée (système dermique) et les injections de nanoparticules dans la circulation sanguine sont également à prendre en considération compte tenu des modes d'utilisations des nanoparticules manufacturées (Figure 7).

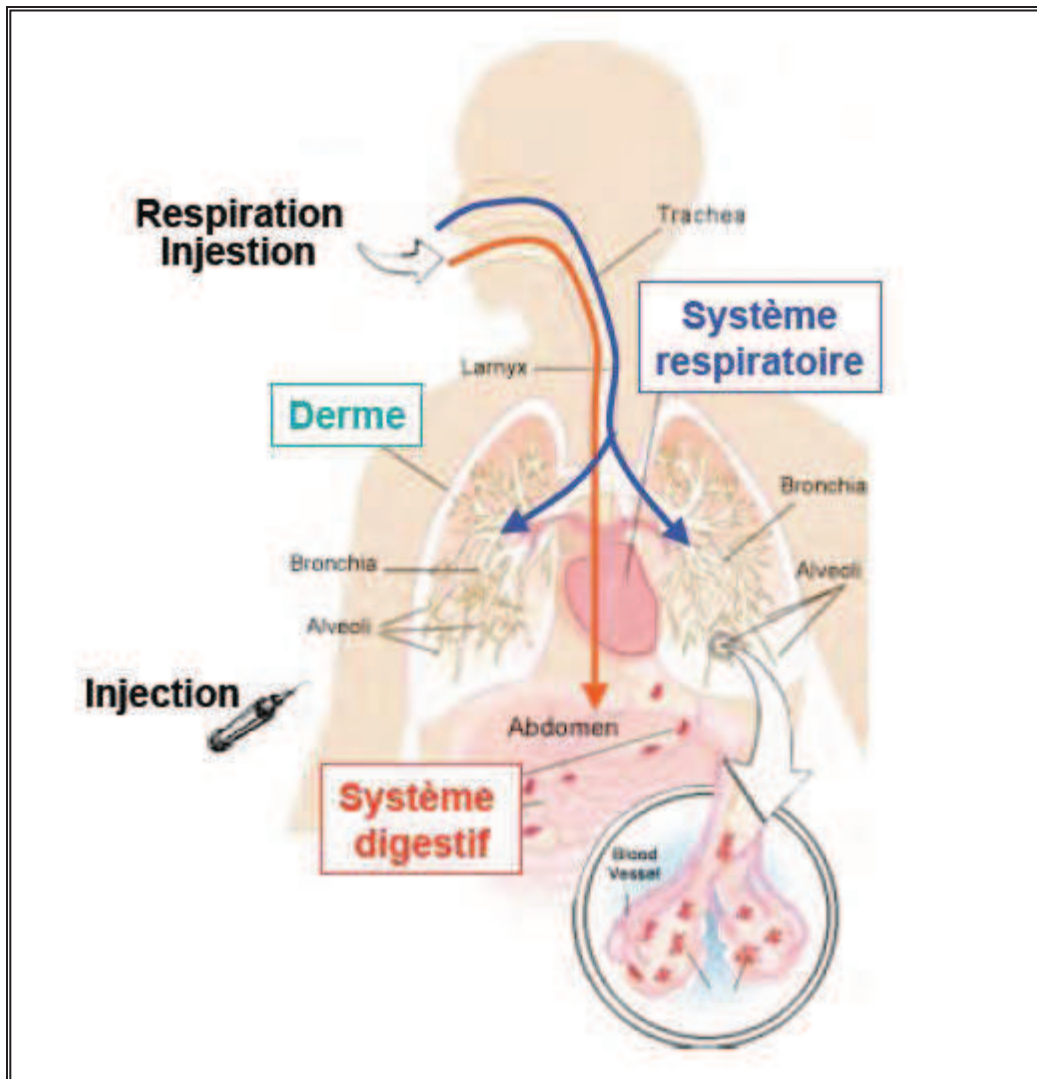


Figure 7 : Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme.

a. voies d'entrée dans l'organisme

L'homme peut entrer en contact avec les nanoparticules de plusieurs façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire). Cette dernière est probablement la plus conséquente et donc la plus étudiée. Chaque voie présente habituellement une barrière à cette pénétration (ex : la rate ou les reins). Des études ont montré que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoire ou digestive (Oberdorster et al., 2005).

- **Voies respiratoires**

Les voies respiratoires sont les principales voies de pénétration des nanoparticules dans l'organisme. En effet, pendant la phase d'inhalation, les voies respiratoires apportent l'oxygène nécessaire à l'organisme, mais constituent aussi une porte d'entrée idéale pour les polluants de l'air, dont les nanoparticules qui sont en suspension dans l'air (Wang et al., 2010)

- **Voie cutanée**

La pénétration percutanée de particules ultrafines peut sembler improbable au vu des caractéristiques de la peau. Elle a été plus particulièrement étudiée pour TiO_2 et ZnO du fait de leur utilisation dans des formulations cosmétiques. Le TiO_2 des crèmes solaires est constitué de particules de 14 à 30 nm, de surfaces spécifiques de 100 à 50 m^2/g , avec des revêtements de surface inorganiques et organiques. Wu et al (2009) a démontré que l'application de nanoparticules de TiO_2 , pour une période prolongée (comme l'est la période des vacances, par exemple), peut induire une toxicité cutanée, probablement associée avec la génération de radicaux libres, du stress oxydant et un appauvrissement en collagène qui peuvent entraîner un vieillissement de la peau.

En ce qui concerne des particules ultrafines proprement dites, il semble qu'une certaine pénétration cutanée soit possible. Il a été démontré que des flexions cutanées répétées, normales dans une activité de travail, favorisent une pénétration en profondeur et, dans le cas de particules présentant une certaine souplesse, jusqu'à la peau viable. La démonstration semble complétée par une étude de la pénétration cutanée de nanocristaux fluorescents ("quantum dots", tailles de 4 à 12 nm) de différentes formes et revêtements de surface (Ryman-Rasmussen et al., 2006).

Par ailleurs, il faut rappeler que les travaux sont effectués sur des peaux saines en bon état. En conditions réelles, les mains ne sont pas « idéales ». De simples microfissures, invisibles à l'œil nu, peuvent constituer une porte de pénétration pour n'importe quel type de particules ultrafines.

- **Voie intestinale**

Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines : les premières qui peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments, et les secondes qui sont éliminées de l'appareil respiratoire par l'escalier mucociliaire. Seulement quelques études ont été menées sur ce sujet et montrent que les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale (Yamago et al., 1995). Cependant, il a été démontré que l'internalisation des nanoparticules par les cellules intestinales dépend de la nature et la taille des nanoparticules (Hillyer and Albrecht, 2001; Win and Feng, 2005).

b. Translocation et devenir dans l'organisme

L'organisme humain dispose de différents mécanismes de défense pour éliminer ces corps étrangers indésirables. Deux procédés sont impliqués : la dissolution chimique pour les particules solubles et la translocation physique, c'est-à-dire le transport d'un endroit à un autre, pour les particules insolubles ou peu solubles.

Par la translocation, les particules insolubles ou peu solubles déposées dans l'arbre pulmonaire sont éliminées du système respiratoire en les transportant ailleurs dans l'organisme. Les particules les plus grosses qui se déposent normalement dans les parties supérieures des poumons, principalement au niveau de la trachée et des bronches, sont éliminées par le mécanisme d'ascenseur mucociliaire où les muqueuses de la trachée et des bronches sont recouvertes de cellules ciliées qui forment un ascenseur et repoussent le mucus contenant les particules vers le système digestif. C'est normalement un mécanisme efficace qui élimine les particules en moins de 24 heures, même les particules ultrafines (Kreyling et al., 2002).

Les poussières ultrafines, de mêmes dimensions que les nanoparticules, pénètrent principalement dans l'organisme via l'inhalation et se déposent dans les poumons, une partie pouvant se distribuer directement au cerveau via les nerfs olfactifs. Les poumons ne réussissent pas nécessairement à éliminer ces particules indésirables qui causent alors l'inflammation pulmonaire qui peut conduire au développement de certaines maladies pulmonaires spécifiques à la nature des poussières les ayant causées. De plus, ces très fines poussières peuvent franchir les différentes barrières de protection pulmonaire, atteindre le

système sanguin et être distribuées dans toutes les parties du corps où elles pourront causer des dommages de différentes natures. Oberdorster (2005) résume par la figure 8, les effets sur l'organisme de l'inhalation de poussières ultrafines de dimensions nanométriques.

Les particules qui ont subi une translocation peuvent alors induire divers dommages dans différentes parties de l'organisme. La translocation de particules inhalées ultrafines dans la circulation sanguine pourrait affecter la fonction endothéliale et promouvoir la thrombose et d'autres problèmes du système sanguin dont une coagulation sanguine accrue (Elder et al., 2000, 2004; Nemmar et al., 2002a; Zhou et al., 2003) . Ce phénomène a été démontré chez le hamster (Nemmar et al., 2002b, 2003) mais la situation chez l'homme demeure ambiguë.

Bien que les poumons constituent la principale voie d'entrée des nanoparticules dans l'organisme humain *via* l'inhalation, il existe d'autres voies d'exposition au niveau desquelles la distribution et la translocation des nanoparticules varie considérablement. Par exemple après absorption digestive, certaines nanoparticules sont éliminées dans les fécès et dans l'urine (Nefzger et al., 1984) et d'autres pénétreraient dans la circulation portale et le foie ou dans le système lymphatique. Le foie et la rate seraient des organes cibles, mais certaines nanoparticules sont retrouvées dans les reins, le poumon, la moelle osseuse et le cerveau (Jani et al., 1990,1994 ; Wang et al., 2007). On ne connaît pas précisément les modifications que subissent les nanoparticules dans le tube digestif, en particulier si elles restent libres ou si elles s'agrègent, si elles adsorbent des biomolécules présentes dans la matrice alimentaire ou elles sont transformées par les enzymes digestifs (Cedervall et al., 2007; Simon et al., 2008).

Ces modifications des nanoparticules peuvent influencer leur charge de surface, leur hydrophobicité ou leur lipophilie, leur diffusion dans le mucus et l'eau et leur transport cellulaire et paracellulaire. Dans les liquides biologiques, l'interaction des nanoparticules avec les protéines pourrait favoriser le franchissement des membranes cellulaires et nucléaires (Hong et al., 2006). Certaines nanoparticules passent à travers la barrière digestive essentiellement par transcytose à travers les anthérocytes ou les cellules M des plaques de Peyer, avec une vitesse inversement proportionnelle à leur taille (Hillyer and Albrecht, 2001).

c. Effet sur la santé humaine

Compte tenu des nombreuses inconnues liées aux nanoparticules, à leurs effets potentiels sur la santé et aux risques documentés de toxicité des particules ultrafines chez l'homme, l'instauration de procédures strictes de prévention demeure la seule façon de prévenir tout risque de développement de maladies professionnelles. Ainsi, les populations potentiellement exposées aux nanoparticules doivent être prudentes et appliquer des mesures sécuritaires d'élimination à la source, de contrôle de l'exposition et de protection individuelle, aussi bien au niveau de la production que de la mise en œuvre et de l'utilisation de ces produits.

Selon le rapport l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, aujourd'hui ANSES), en l'absence de caractérisation précise des dangers, d'outils métrologiques et de connaissance des usages alimentaires potentiels, il n'est pas possible, aujourd'hui, d'évaluer l'exposition du consommateur ni les risques sanitaires liés à l'ingestion de nanoparticules.

Devant les nombreuses incertitudes concernant les risques des nanoparticules dans l'alimentation, beaucoup d'organisations publiques ou parapubliques ont émis des recommandations concernant l'utilisation de nanomatériaux ou nanotechnologies dans le domaine alimentaire.

En mars 2009, l'ANSES a publiquement affirmé que "la prudence s'impose à l'égard de l'utilisation de nanotechnologies et/ou nanoparticules en alimentation humaine et animale".

Afin de répondre aux questions de la direction générale de la Santé, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'Environnement et du travail) a publié un rapport sur les nanoparticules manufacturées dans les eaux et un autre sur les nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale. Ces travaux aboutissent à des recommandations concordant avec celles d'autres instances nationales et internationales. L'usage des nanomatériaux concerne un large spectre d'applications : médicaments, produits phytosanitaires, alimentation humaine et animale, emballages, procédés de traitement des eaux et exposition par voie orale (eau ou aliments) à des nanoparticules présentes dans l'environnement. En 2009, aucun procédé de traitement des eaux utilisant des nanoparticules n'avait été mis sur le marché français et aucun médicament vétérinaire ou produit phytosanitaire relevant des nanotechnologies n'avait été soumis à autorisation en Europe.

Bien que les perspectives technologiques ouvertes par les nanotechnologies semblent immenses, notamment dans le domaine de la santé, les connaissances sur la toxicité des nanomatériaux manufacturés sont encore aujourd'hui lacunaires. En outre, il n'existe pas de méthode standardisée permettant de mesurer et de suivre le devenir de nanoparticules manufacturées dans des matrices complexes (environnement, aliments, organisme, etc.). Considérant ces incertitudes, l'ANSES, de même que d'autres instances internationales, a conclu à l'impossibilité d'évaluer l'exposition du consommateur et les risques sanitaires liés à l'ingestion de nanoparticules. En conséquence, l'ANSES a recommandé la prudence à l'égard de l'utilisation de nanotechnologies ou des nanoparticules en alimentation humaine et animale.

Elle a préconisé également que la présence de ces substances dans l'alimentation fasse l'objet d'une déclaration systématique et d'une demande d'autorisation de mise sur le marché.

Actuellement, de nombreuses études sont réalisées afin de mieux connaître le comportement des nanoparticules une fois déposées dans l'organisme de l'homme, mais aucune d'entre elles n'aboutit sur un comportement général pour toutes les nanoparticules. Cependant, des expériences ont montré que des nanoparticules pouvaient être responsables de pathologies, principalement au niveau des organes directement exposés mais aussi dans tous les autres organes (Figure 9). Cependant, il faut noter que la nature et l'intensité des effets dépendent des caractéristiques des nanoparticules. De plus ces études sont la plupart du temps réalisées avec de fortes concentrations en nanoparticules (Ostiguy et al., 2008). Enfin à l'heure actuelle, il manque beaucoup d'informations pour pouvoir établir une liste exhaustive des effets des nanoparticules manufacturées sur la santé humaine en fonction de leurs natures et/ou de leurs caractéristiques.

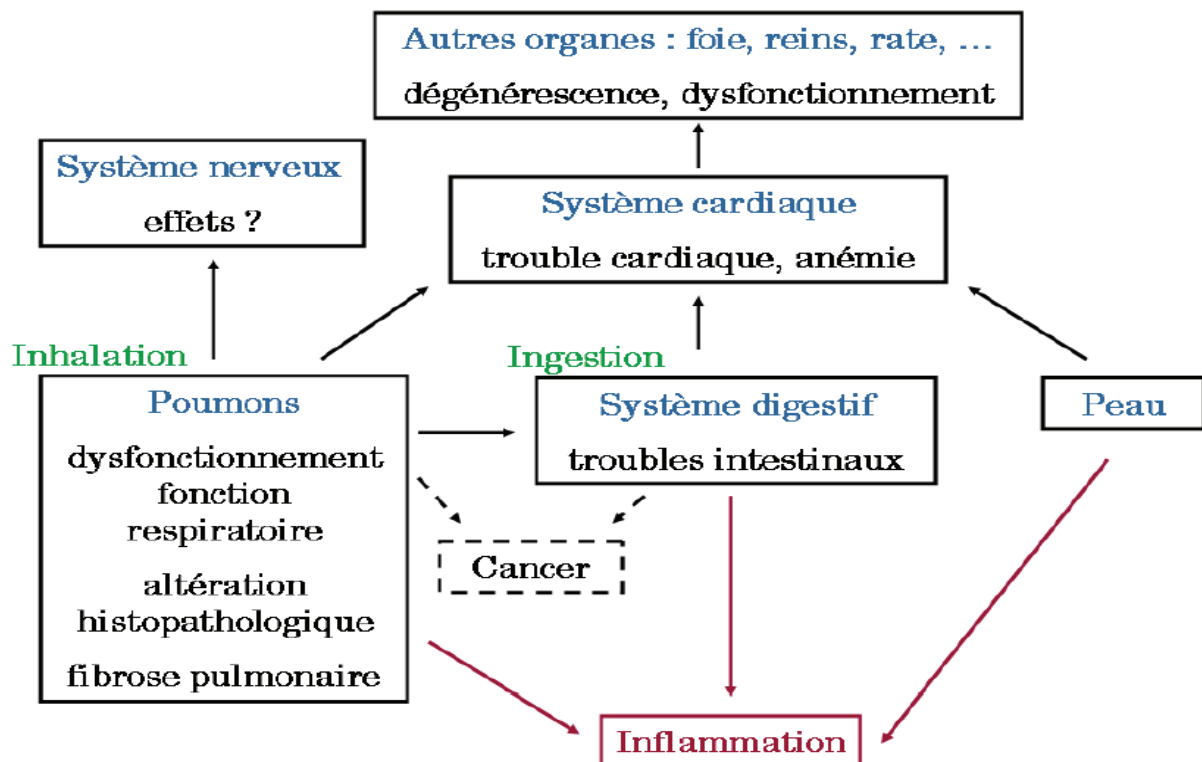


Figure 9 : Principaux effets des nanoparticules sur la santé humaine décrit dans la littérature (d'après Ostiguy et al., 2008).

1. 6. Toxicologie

La toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, élimination) et la toxicité des nanoparticules, très peu documentées par voie orale, différent de celles des matériaux conventionnels correspondants. Elles semblent dépendre de leur composition chimique, de leur taille, de leur forme, de leur réactivité de surface..., ce qui conduit à envisager des évaluations de risque au cas par cas.

Comme toute substance chimique, le devenir des nanomatériaux dans l'organisme humain et la toxicité potentielle associée dépendent notamment de leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, caractère soluble, etc). Cependant, en raison notamment des propriétés spécifiques des nanomatériaux manufacturés, les connaissances scientifiques sur les substances classiques ne sont pas directement transposables aux formes nanométriques.

Aujourd'hui, la large diffusion des nanomatériaux manufacturés à travers une multitude de produits de consommation courante nécessite de mieux connaître l'exposition des travailleurs de ce secteur, mais aussi de consommateurs et de l'ensemble de la population générale à ces nanomatériaux. De nombreux rapports scientifiques considèrent l'inhalation de nanomatériaux comme potentiellement dangereuse, aussi l'ANSES a recommandé de prendre des mesures pour éviter ou minimiser l'exposition des personnels, de créer une base de données afin d'améliorer les connaissances sur les principales utilisations de nanomatériaux sur le territoire français. En ce qui concerne le transport des nanomatériaux, elle a recommandé l'application des règles utilisées pour les matières dangereuses.

Les connaissances actuelles des effets toxiques des nanoparticules sont relativement limitées. Néanmoins, les données disponibles indiquent que les effets toxiques documentés sur des animaux de même que les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules justifient, sur la base du principe de précaution, de prendre dès à présent toutes les mesures utiles pour limiter l'exposition et protéger la santé des personnes potentiellement exposées. Dans un tel contexte, l'instauration de procédures strictes de prévention demeure la seule façon de prévenir tout risque de développement de maladies professionnelles autant au niveau des chercheurs et des étudiants qui font le développement de ces produits que des travailleurs qui œuvrent à la synthèse, à la transformation ou à l'utilisation de nanoparticules.

1. 6. 1. Toxicité des oxydes métalliques

Il en existe de nombreuses natures, mais les plus courantes sont : les oxydes de titane (TiO_2), les oxydes de fer (Fe_2O_3 ; Fe_3O_4), les oxydes de zinc (ZnO), les oxydes d'aluminium (Al_2O_3) et la silice (SiO_2).

Un effet cytotoxique est souvent constaté pour différentes nanoparticules testées sur différents modèles cellulaires (Auffan et al., 2006; Gojova et al., 2007; Wang et al., 2007). L'intensité de ces effets dépend de plusieurs paramètres comme le modèle cellulaire (Barlow et al., 2005; Gurr et al., 2005), la nature des nanoparticules (Peters et al., 2004), leur taille (Barlow et al., 2005; Gurr et al., 2005; Sayes et al., 2006) ou encore leur forme cristalline (Sayes et al., 2006). Cependant à caractéristiques et modèles cellulaires égaux, certaines études sont contradictoires. C'est le cas des études de Soto et al. (2005) et Wagner et al. (2007) qui dans le premier cas montrent que les nanoparticules d' Al_2O_3 ont un effet cytotoxique prononcé ($\text{CI}_{50} = 5,5 \mu\text{g/ml}$) et dans le deuxième cas une perte de viabilité est seulement observée à partir de 3 jours et $100 \mu\text{g/ml}$. Ainsi d'autres caractéristiques différentielles non déterminées sont probablement à l'origine de cette discordance.

- **Nanoparticules d'oxyde de fer**

Les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3 et Fe_3O_4) font l'objet de nombreuses recherches sur leurs applications potentielles dans la médecine ainsi qu'ils sont utilisées dans des procédés industriels au cours desquels une exposition professionnelle peut se produire. Malgré cela, leurs propriétés toxicologiques n'ont pas été étudiées de manière approfondie. Les premières études ont été faites sur des nanoparticules d'oxyde de fer associé au dextran (Weissleder et al., 1997). Ces premières études ont été conduites pour comprendre le mécanisme de l'assimilation cellulaire des nanoparticules (Moore et al., 1997; Neuwelt et al., 1994).

En 1996, Mueller et al. ont rapporté que les nanoparticules d'oxyde de fer pourraient induire une toxicité significative. Plusieurs années plus tard, (Berry et al., 2004; Berry et al., 2003) ont montré que les nanoparticules d'oxyde de fer non associées ou associées au dextran pourraient causer différent degré de mort cellulaire ainsi que des perturbations dans le squelette des fibroblastes dermiques. Ces observations ont été reconfirmées par Gupta et al (Gupta et al., 2003; Gupta and Curtis, 2004; Gupta and Gupta, 2005) qui ont clairement démontré la cytotoxicité des nanoparticules d'oxyde de fer non couvert.

Dans d'autres études, ont essayé de prévenir l'effet cytotoxique en associant aux nanoparticules différentes protéines comme lactoferrine et ceruloplasmine et ils ont montré que la réponse cellulaire pourrait être directement modulée par le choix de la protéine associée (Gupta and Wells, 2004; Stroh et al., 2004; van den Bos et al., 2003).

Il est important de mentionner que le destin biologique des nanoparticules d'oxyde de fer est dépendant de la composition de protéines associées à la surface des nanoparticules (Mahmoudi et al., 2011). En plus les propriétés physicochimiques des nanoparticules et le type cellulaire sont aussi reconnus comme des facteurs cruciaux pour l'assimilation cellulaire, le destin intracellulaire ainsi que la réponse toxique des nanoparticules. Par exemple Mahmoudi et al. (2011a) ont montré que selon le revêtement superficiel associé aux nanoparticules d'oxyde de fer (non couvert et cyanoethyltrimethoxysilane (CAES) et aminopropyltriethoxysilane (APTES)-couvert) avait des effets toxiques sur des cellules cérébrales humaines avec des concentrations de fer au dessus de 2,25 mM, tandis que la même concentration des nanoparticules était compatible avec des cellules humaines de rein.

Les résultats des recherches concernant la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer sont contradictoires et beaucoup reste encore à découvrir. Plusieurs études démontrent que ces nanoparticules sont biocompatibles, ne montrant pas des effets toxiques sévères (Hanini et al., 2011; Jain et al., 2008; Muller et al., 2007) alors que d'autres études montrent qu'elles mesurent un effet toxiques aux fortes concentrations (Naqvi et al., 2010 ; Hussain et al., 2005).

Jain et al. (2008) ont montré que l'administration *in vivo* de nanoparticules d'oxyde de fer n'a pas d'effet néfaste au niveau de la fonction hépatique et ils ont été même cliniquement approuvés pour leur utilisation comme agent de contraste au niveau des hépatocytes humaine (Puppi et al., 2011). Alors que d'autres études ont montré l'induction d'une hépatotoxicité causée par les nanoparticules d'oxyde de fer (Lin et al., 2008). Singh et al (2013) ont montré que des rats traités par voie orale avec des doses uniques de 500, 1000, 2000 mg/kg n'ont pas causé de génotoxicité significative. Ma et al (2012) ont montré la présence d'inflammations cellulaires et un stress oxydant accru au niveau du foie et du rein après injection intrapéritonéale de nanoparticules de Fe₃O₄ chez la souris. De même Wang et al. (2010) ont montré que les nanoparticules Fe₂O₃ ont causé une diminution significative dans les paramètres biochimiques ainsi que des dégâts sévères au niveau des tissus de foie et de poumon.

2. LA MITOCHONDRIE

La mitochondrie, du grec *mitos* (fil) et *chondros* (grain), est un organite intracellulaire de taille qui varie entre 0,5 μm et 7 μm et qui est responsable de la majorité de la production de l'énergie sous forme d'ATP pour la cellule et représente donc une structure cruciale du fonctionnement cellulaire. Elle est considérée comme une des principales sources d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Même si elle est une source d'ERO plus spécifique dans certains tissus (tissus post-mitotiques), elle reste, dans l'ensemble des tissus, une cible privilégiée des ERO. Les mitochondries sont en mouvement continu dans la cellule et subissent des phénomènes de fusion et de fission très régulés (Jakobs, 2006). Elles se déplacent également dans les zones très demandeuses en énergie (zone périnucléaire par exemple) au moyen de protéines associées au cytosquelette.

2. 1. Structure

Toute mitochondrie est constituée de deux membranes : une membrane externe et une membrane interne, délimitant trois compartiments distincts : le compartiment cytoplasmique, l'espace intermembranaire, et la matrice mitochondriale. Lorsqu'une mitochondrie est sous forme isolée, deux compartiments, délimités par deux membranes, se distinguent (Figure 10).

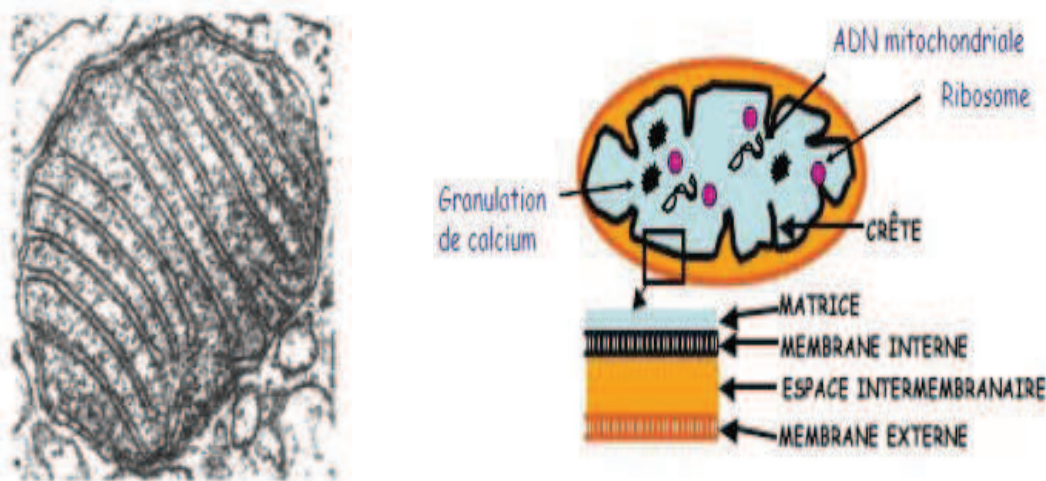


Figure 10 : structure mitochondriale

2. 1. 1. La membrane externe

La membrane externe est une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et 50% de lipides. Cette membrane a la propriété d'être perméable grâce à la présence d'une protéine transmembranaire, VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Elle forme un canal qui laisse passer les molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, pyruvate, acides gras et nucléotides par exemple). Les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa, possédant un signal d'adressage mitochondrial, peuvent traverser la membrane au niveau de complexes d'importation constitués par une zone d'accolement entre la membrane externe et interne. Cette membrane contient des translocases (TOM : Translocase of the Outer Membrane) qui permettent le transport des grosses protéines.

2. 1. 2. L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire est un espace étroit d'environ 100 angströms dont la composition est très proche de celle du cytosol. Il contient une forte concentration en protons qui lui confèrent une charge positive (Figure 11).

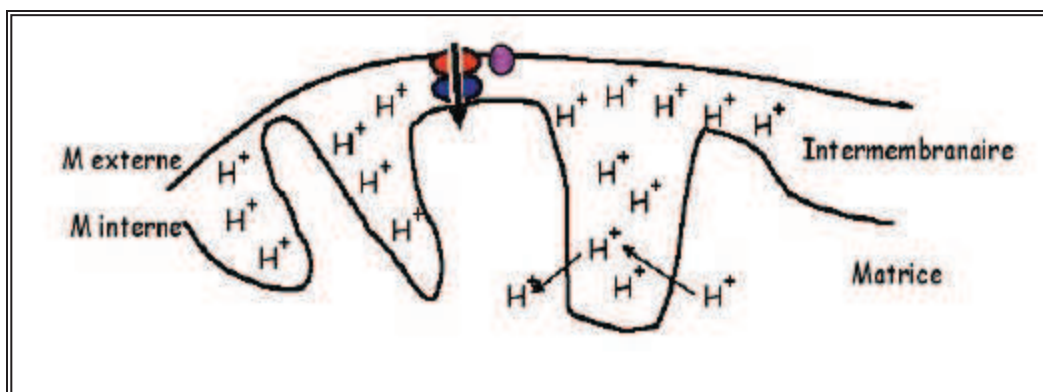


Figure 11 : Espace inter-membranaire

2. 1. 3. La membrane interne

La composition de la membrane interne diffère des autres membranes biologiques. Elle contient environ 80 % de protéines et seulement 20 % de phospholipides. A cause de sa composition lipidique particulière (riche en cardiolipine ou diphosphatidylglycérol, qui interagit avec certaines protéines de la chaîne respiratoire et détermine leur bonne orientation

et leur activité), elle est très peu perméable aux ions et le passage de molécules à travers cette membrane nécessite la présence de transporteurs. Ainsi, les principaux transporteurs sont l'ANT (qui échange l'ATP mitochondrial en échange d'ADP cytosolique), le cotransporteur de phosphate inorganique/proton, le symport pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate, la carnitine-acylcarnitine translocase. Les protéines sont importées grâce à un système de translocases, les TIM (Translocase of the Inner Membrane). La membrane interne possède de nombreux replis qui forment les crêtes mitochondriales.

Des études tomographiques (Dimroth et al., 2000; Hunte et al., 2000) ont permis de montrer que ces crêtes n'ont pas la même composition que la membrane interne. Elles seraient en fait reliées à la membrane interne par des jonctions de crêtes d'environ 30 nm de diamètre. Grâce aux crêtes, la membrane interne est multipliée par cinq. Leur nombre varie selon l'activité mitochondriales (respiration cellulaire, oxydation des acides gras...) et peuvent se présenter sous des formes variées (forme de bouteilles aplaties, sacculaires, lamellaires, tubulaires...). C'est au niveau de ces crêtes que sont préférentiellement enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase, responsable de la production d'ATP (Gilkerson et al., 2003).

2. 1. 4. La matrice mitochondriale

La matrice mitochondriale est un compartiment interne de la mitochondrie, elle est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras et contient donc toutes les enzymes nécessaires à ces deux voies. Elle renferme également l'ADN mitochondrial, des mitoribosomes et des ARN de transfert. L'ADN mitochondrial, une molécule d'environ 16 kilobases, est circulaire et dépourvu d'introns et d'histones. Chaque mitochondrie possède un nombre variable de copies de cet ADN qui code notamment pour 13 protéines composantes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

2. 2. Distribution des mitochondries dans les différents organes de l'organisme

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules des organismes eucaryotes. Leur localisation cellulaire dépend de la demande d'énergie. La plupart des cellules humaines contiennent entre 500 et 2000 mitochondries, mais ce nombre varie en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Par exemple, dans le foie les

mitochondries représentent 20% du volume cytosolique alors que dans le muscle cardiaque, ce volume peut atteindre 40% et peut arriver même à 80% dans les cellules de la rétine (Figure 12). Les globules rouges matures, eux, n'en possèdent pas. Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine (Figure 13). Dans certaines cellules les mitochondries sont immobiles comme par exemple au niveau des spermatozoïdes.

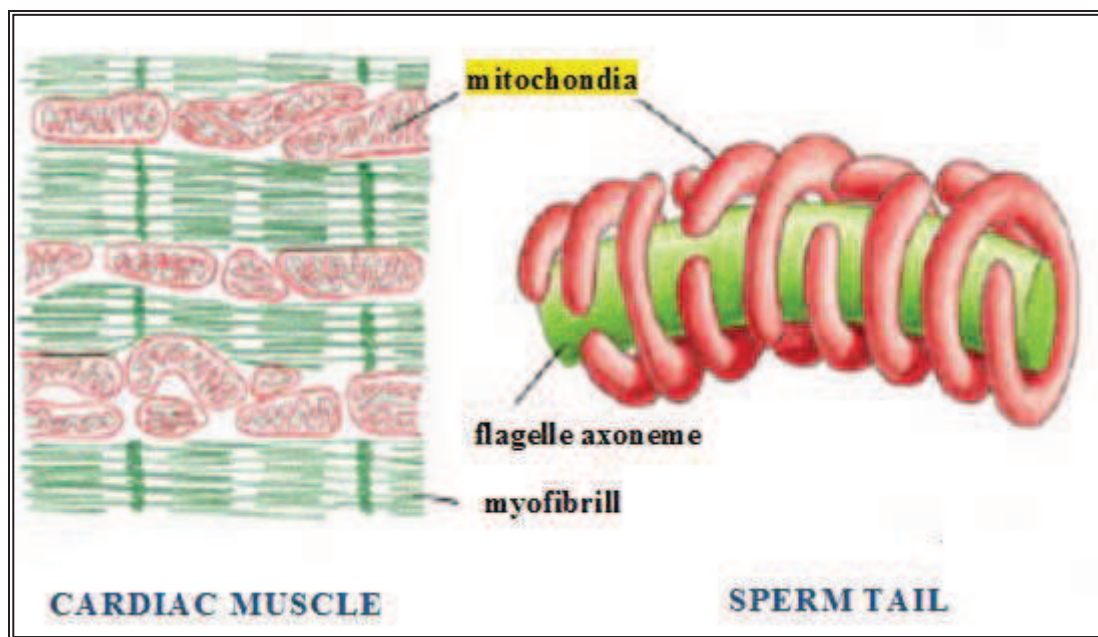


Figure 12 : Localisation des mitochondries au niveau du muscle cardiaque et du flagelle spermatique

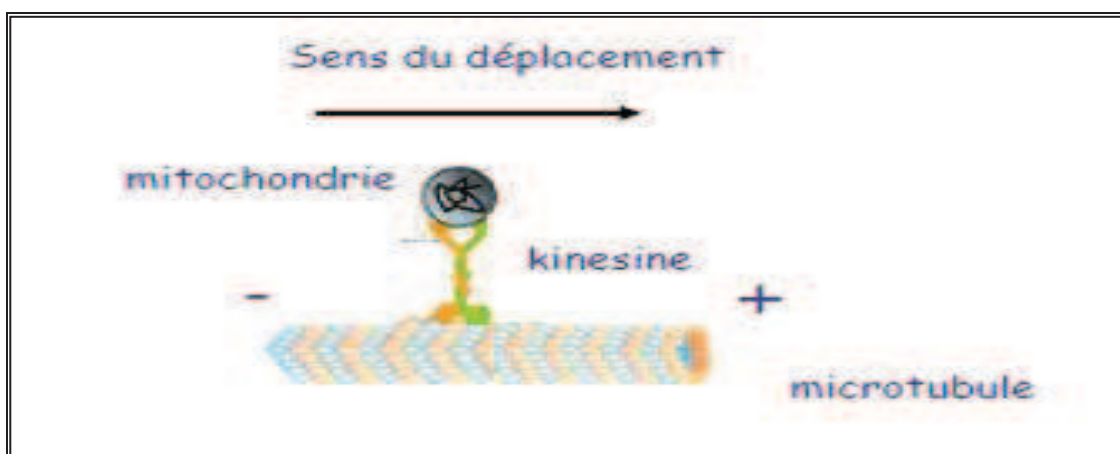


Figure 13 : Sens du déplacement de la mitochondrie

2. 3. Fonctionnement de la mitochondrie

2. 3. 1. La chaîne de transport des électrons

Les réactions de la phosphorylation oxydative, qui ont lieu au niveau de la membrane interne mitochondriale, permettent la transformation de l'énergie contenue dans les nutriments en énergie utilisable par la cellule : l'ATP. La chaîne respiratoire est une chaîne de transport d'électrons constituée de quatre complexes protéiques (Figure 14) :

- NADH ubiquinone oxydoréductase ou complexe I
- Succinate ubiquinone oxydoréductase ou complexe II
- Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase ou complexe III
- Cytochrome c oxydase ou complexe IV

Chaque complexe est composé de plusieurs sous-unités protéiques codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial, excepté pour le complexe II qui ne contient que des protéines codées par le génome nucléaire. A ces complexes protéiques, s'ajoutent des transporteurs mobiles d'électrons, l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome c.

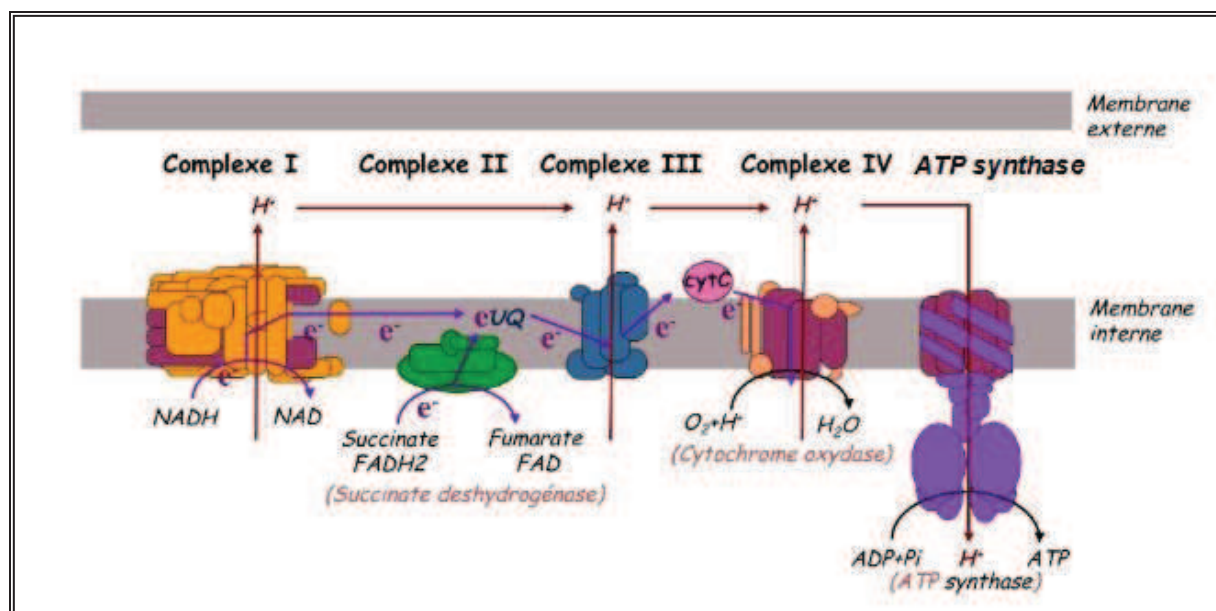


Figure 14 : Structure schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire est située dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle est composée de quatre complexes protéiques : le complexe I (NADH ubiquinol réductase), le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinol cytochrome c oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Le transfert des électrons depuis les équivalents réduits (NADH et FADH₂) le long des complexes permet le pompage des

protons par les complexes I, III et IV vers l'espace intermembranaire créant ainsi un gradient électrochimique. Le retour des protons dans la matrice par l'ATP synthase permet de coupler la respiration et la synthèse d'ATP.

2. 3. 2. La phosphorylation oxydative

Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire mitochondriale (quatre complexes protéiques, eux-mêmes composés de différentes sous unités codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial) et de l'ATP synthase. La dégradation des nutriments permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et de FADH_2 . Ces molécules sont réoxydées par transfert de leurs électrons sur un accepteur final : l'oxygène.

Cette étape est réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne de transport sur laquelle les électrons vont transiter en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. Ainsi, le NAD^+ ayant une faible affinité pour les électrons, sa forme réduite, le NADH , peut facilement perdre deux électrons. L'oxygène moléculaire possède une très forte affinité pour les électrons et capture facilement ceux des autres molécules. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydoréduction et les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel (tels que le NAD^+ qui a un potentiel de -320 mV) vers des molécules à fort potentiel (tels que l'oxygène qui a un potentiel de $+816 \text{ mV}$).

Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une force proton motrice qui est la somme du gradient de pH et du potentiel membranaire d'environ -150 mV (négatif du côté matriciel). Les protons, qui s'accumulent en dehors de la structure, accroissent la pression chimiosmotique à l'extérieur par rapport à celle qui règne à l'intérieur de la mitochondrie. Les protons qui retournent à l'intérieur passent à travers le canal ionique de l'ATP synthase, enzyme complexe dotée d'une unité rotative fonctionnant comme un rotor qui utilise l'énergie chimiosmotique de ces protons pour permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP (Figure 15).

La phosphorylation oxydative est une fonction vitale du métabolisme. Elle génère cependant des dérivés réactifs de l'oxygène tels que l'anion superoxyde O_2^- ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 lesquels génèrent en retour des radicaux libres nocifs.

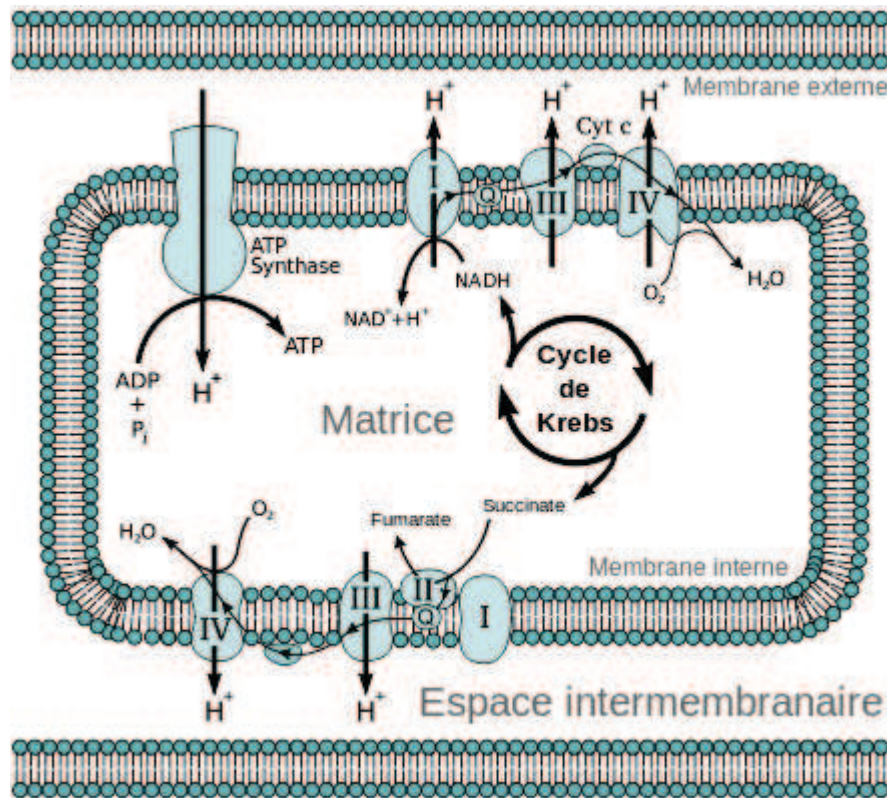


Figure 15 : Chaîne de transport des électrons mitochondriale. Le succinate et le $\text{NADH}+\text{H}^+$ issus du cycle de Krebs sont oxydés par la chaîne respiratoire, localisée, chez les eucaryotes, dans la membrane interne des mitochondries, générant le gradient de pH utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP.

a. Complexe I : NADH déshydrogénase

C'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton motrice (Sazanov, 2007). Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités (Carroll et al., 2006), la plupart (38) sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons et huit ou neuf centres Fer/Soufre (FeS) constituant le centre catalytique de l'enzyme (Sazanov, 2007). Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe (Yagi and Matsuno-Yagi, 2003).

Ce complexe étant une source majeure de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou encore ROS), les mutations le touchant conduisent à diverses pathologies neurodégénératives (Schapira, 1998). De plus, les ERO produits par ce complexe peuvent endommager l'ADN mitochondrial et être une des causes du vieillissement (Balaban et al., 2005).

b. Complexe II : Succinate déshydrogénase

Le complexe II : ou succinate deshydrogénase joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs (Briere et al., 2005). Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. Ce phénomène cause, par exemple, lors de conditions hypoxiques, une augmentation de la production de ERO dans les vaisseaux pulmonaires (Paddenbergh et al., 2003).

De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (le citrate synthase par exemple). Dans ce cas, la succinate deshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux réverse d'électrons au travers du complexe I (Briere et al., 2005), entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de ERO.

Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich (Rotig et al., 1997), la maladie de Huntington (Butterworth et al., 1985) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (Bourgeron et al., 1995). Des mutations de sous-unités du complexe II ont également été décrites à plusieurs reprises comme un facteur important de tumorigénèse (Baysal, 2006).

c. Complexe III : Complexe b-c1 ou ubiquinone-cytochrome c réductase

Le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase contient quatre groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b (b_L et b_H), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique.

La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce au cycle Q décrit par (Mitchell, 1975). Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons. Des défauts partiels du complexe III ont été identifiés chez des patients atteints de déficiences hépatiques néonatales et du syndrome de Leigh (Leshinsky-Silver et al., 2003).

d. Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont trois (COX I, COX II et COX III) sont codées par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Le site actif binucléaire de cette enzyme est composé d'un noyau hème de haut spin (hème a3) associé à un ion cuivre (CuB). En plus de ce centre binucléaire, le cytochrome c oxydase possède un hème de bas spin (hème a) et un autre centre cuivre (CuA). Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau (Abramson et al., 2001). Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire (Wikstrom and Verkhovsky, 2007).

Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de différentes myopathies (Rahman et al., 1999), mais également à des dysfonctionnements hépatiques (Edery et al., 1994) et à plusieurs types d'encéphalopathies telles que le syndrome de Leigh (Adams et al., 1997; Savasta et al., 2001).

e. ATP synthase

Les ATP synthases sont présentes dans les membranes transductrices d'énergie, comme les membranes de mitochondries, de chloroplastes ou encore dans la membrane plasmique des procaryotes. L'ATP synthase est constituée de 3 domaines distincts : un domaine hydrosoluble F1 portant les sites catalytiques, un domaine F0 membranaire formant le canal à protons et un domaine permettant l'ancrage de F1 à la membrane (Figure 16).

Le domaine membranaire F0 est un oligomère de sous-unités c qui entre en rotation lors du transfert des protons de l'espace intermembranaire à la matrice. 12 sous-unités c sont en contact avec un complexe formé des sous-unités γ et ϵ qui forment le rotor. Une sous-unité a, complexée à un dimère de sous-unités b et à une sous-unité δ forment le stator qui interagit avec le domaine F1. Le domaine F1 est constitué de 5 sous-unités différentes : $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Les sous-unités α et β , portent les sites de fixation des nucléotides adényliques, les sites catalytiques étant portés par chacune des sous-unités β .

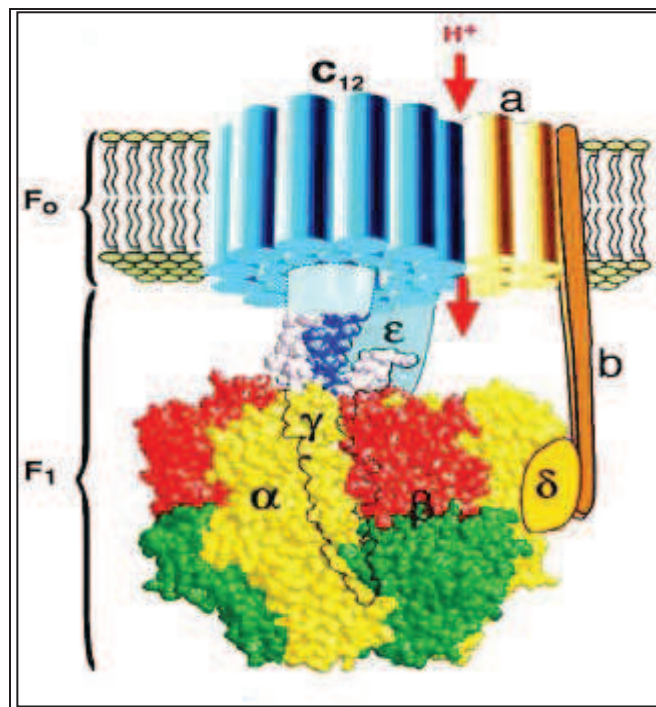


Figure 16 : Structure de l'ATP synthase (Wang and Oster, 1998)

3. LE STRESS OXYDANT

3. 1. Définition

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production d'oxydants, ou ERO, et les molécules antioxydantes en faveur des oxydants. Le terme ERO fait référence à plusieurs types de métabolites réactifs à l'oxygène tels que les radicaux libres et d'autres non-radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives possédant un ou plusieurs électrons non appariés tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et l'oxygène singlet 1O_2 (Wiseman and Halliwell, 1996). Ces molécules se lient rapidement aux molécules non radicalaires à proximité résultant généralement en la formation de nouveaux radicaux.

Les ERO sont principalement formés lors de l'oxydation des lipides par le cycle de Krebs et lors de la chaîne de transport mitochondriale d'électrons qui a pour but de produire de l'énergie. Les radicaux libres sont formés suite à l'oxydation des glucides, la glycation non enzymatique des protéines et leur subséquente dégradation. La présence d'une faible concentration d'ERO est importante pour le maintien d'un statut redox cellulaire normal, les fonctions tissulaires et les processus de signalisation intracellulaire.

Par contre, une production excessive de ERO endommage les lipides (peroxydation des lipides), les protéines et l'ADN compromettant les fonctions cellulaires (Yu, 1994). De l'autre côté de la balance, plusieurs processus de défense contre les ERO existent de manière à contrer leurs effets néfastes sur les fonctions cellulaires. La première ligne de défense est leur captation par des systèmes non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion réduit, et plusieurs enzymes dont les plus importantes sont les enzymes superoxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase et les peroxiredoxines (Figure 17).

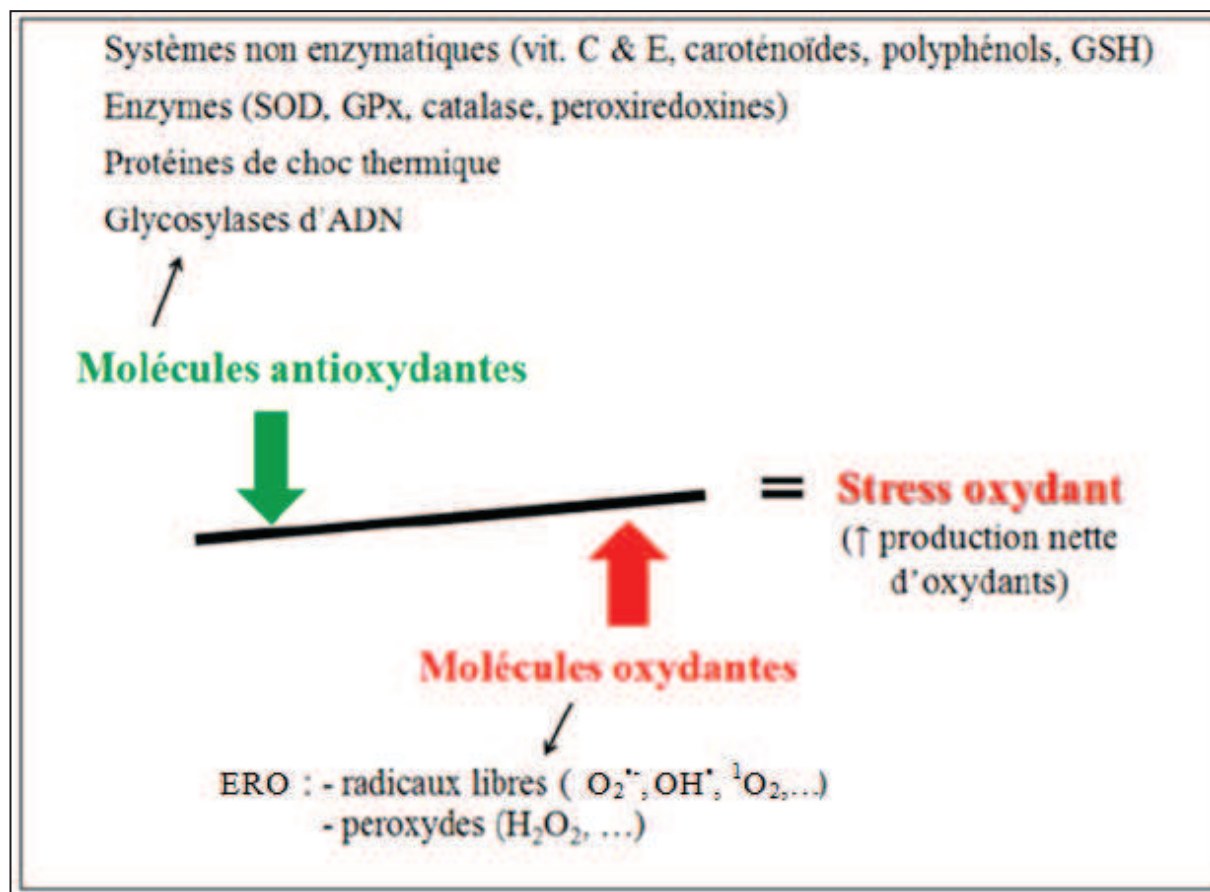


Figure 17 : Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes.

GPX : glutathion peroxydase. GSH : glutathion réduit, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde, $OH^{\bullet}$: radical hydroxyl, 1O_2 : oxygène singlet, SOD : superoxyde dismutase

3. 2. Classification des marqueurs

La mise en évidence du phénomène de stress oxydant cellulaire constitue un défi pour le scientifique dans la mesure où les ERO sont des espèces à très courte durée de vie. Le marqueur "idéal" serait à la fois sensible (montrer une variation à chaque période de stress oxydant), spécifique (ne pas être influencé par d'autres phénomènes comme le métabolisme, l'alimentation, le cycle cellulaire etc.), facilement détectable, stable dans le temps, et reproductible (Powers and Jackson 2008).

Aucun des marqueurs ne possède toutes ces caractéristiques, c'est pourquoi les scientifiques utilisent fréquemment une combinaison de marqueurs. A l'instar d'une recherche d'agent pathogène, on peut faire une première dichotomie entre les marqueurs directs, autrement dit les ERO, et les marqueurs indirects, révélant une trace de leur passage. Les marqueurs

indirects sont représentés soit par les produits d'oxydation des ERO, soit par la réserve d'antioxydants de la cellule (Jenkins, 2000 ; McMichael, 2007; Powers and Jackson, 2008) (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des principaux marqueurs de stress oxydant.
D'après Powers and Jackson (2008).

Marqueurs directs	Marqueurs indirects: produits d'oxydation	Marqueurs indirects: antioxydants
◦ $O_2^{\bullet-}$ ◦ $HO^{\bullet}$ ◦ H_2O_2 ◦ NO_3^- ◦ Etc	◦ Lipoperoxydation: Fluidité membranaire (par RPE + sonde), MDA, Isoprostanes, Alcanes expirés. ◦ Oxydation de l'ADN: 8OH-dG ◦ Oxydation des protéines: carbonyles protéiques ◦ Modification du statut rédox: rapport GSH/GSSG	◦ Ascorbate (vit C) ◦ α-Tocophérol (vit E) ◦ SOD, GPX, CAT ◦ PON1 ◦ Capacité antioxydante totale

3. 3. Différentes formes des radicaux libres

Sous ses formes hyperactives appelées « radicaux libres », l'oxygène peut devenir un redoutable toxique. Il serait même l'une des causes majeures du vieillissement cellulaire favorisé par un déséquilibre entre la production des radicaux libres de l'oxygène et la capacité de défense antioxydante de l'organisme. On parle alors de stress oxydatif ou encore de stress oxydant (Sies, 1997).

Un radical libre est une substance chimique qui possède un électron non apparié, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité. Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$). La production des radicaux libres de l'oxygène est physiologique et nécessaire à de nombreux métabolismes. Seul leur excès devient néfaste d'autant que s'y ajoutent-les radicaux libres d'origine exogène liés à l'environnement (rayonnement UV, ozone...) (Cossu et al. 1997).

Les radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyles, sont susceptibles d'interagir au niveau des doubles liaisons C=C avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés qui constituent le double feuillet phospholipidique des membranes (Bonnetfont-Rousselot, 1994). Ils entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Gutteridge et Halliwell, 1990) provoquant une désorganisation membranaire (perturbation des propriétés physicochimiques des membranes, des communications intercellulaires et du fonctionnement des enzymes membranaires) pouvant aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary et al. 1996) et 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Chen et Chung, 1996) qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent (Figure 18).

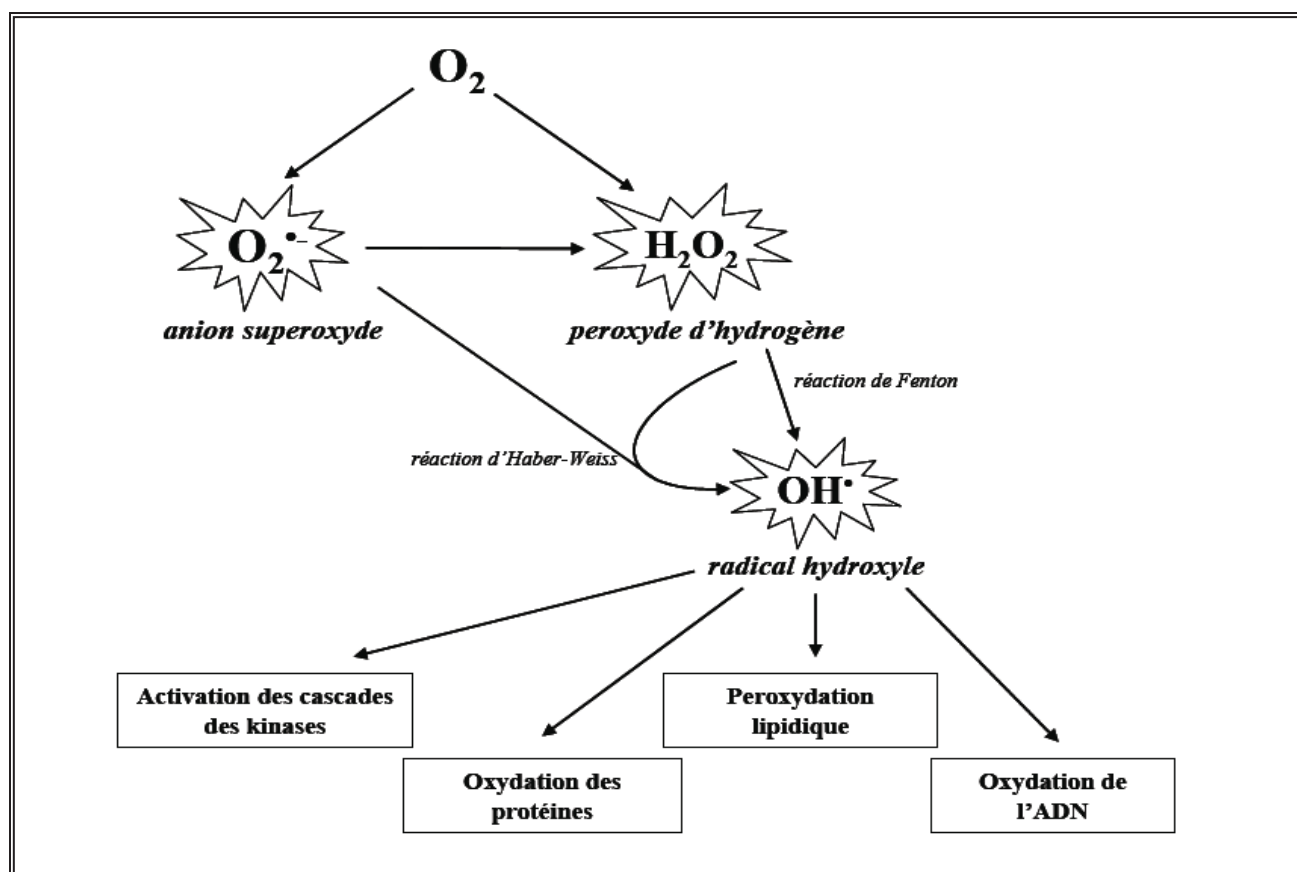


Figure 18 : Schéma des différentes formes d'ERO

3. 4. Sources cellulaires des radicaux libres

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources d'ERO dont l'importance varie selon les tissus. La réaction de Fenton produit des ERO dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ERO sont enzymatiques et non enzymatiques (Droge, 2002).

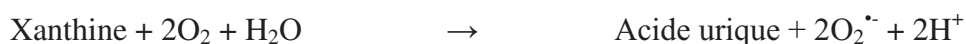
3. 4. 1. L'auto-oxydation de petites molécules

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ERO. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). L'impact de ces auto-oxydations sur la régulation du stress oxydant n'est pas encore clairement défini.

3. 4. 2. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façons très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique. La production d'ERO par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion.

Xanthine oxydase



3. 4. 3. La NADPH oxydase

C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet-}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Krause, 2004)

NADPH oxydase



3. 4. 4. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ERO.

D'un autre coté dans des conditions de stress du RE, la correction des protéines mal repliées, phénomène dépendant du calcium, par les médiateurs de UPR (Unfolded Protein Response) peut générer des ERO qui sont dus (i) à la forte libération de Ca^{2+} du RE vers le cytosol pour être utilisé lors de la signalisation cellulaire (Deniaud et al., 2008) (ii) et à la protéine disulfure isomérase (PDI) qui est impliquée dans la réduction et le réarrangement de ponts disulfures incorrects.

Lors du processus de réparation des protéines endommagées, cette protéine est réduite ce qui nécessite l'intervention d'une autre protéine ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreduction1) qui permet sa ré-oxydation, transfère les électrons directement à l'oxygène et produit ainsi des ERO (Uehara et al., 2006). De plus, une accumulation des protéines endommagées dans le RE peut entraîner une activation des médiateurs de UPR qui à leur tour activent le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B *via* phosphorylation des protéines kinases telles que JNK, MAPK et Akt et *via* la production des ERO (Jiang et al., 2003; Kitamura, 2011; Zhang and Kaufman, 2008).

3. 4. 5. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire. Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

3. 4. 6. La mitochondrie

Voir partie 2 des données bibliographiques

3. 5. Les défenses cellulaires contre le stress oxydant

Compte tenu de la toxicité des ERO l'organisme dispose de systèmes de défense, regroupés sous le terme d'antioxydants. Un antioxydant correspond à une substance qui peut, à faible concentration comparée aux substrats oxydables, supprimer ou empêcher l'oxydation de ceux-ci (Gutteridge and Halliwell, 1990). Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (Figure 19).

On distingue classiquement 2 catégories d'antioxydants : les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (Zielinski and Portner, 2000).

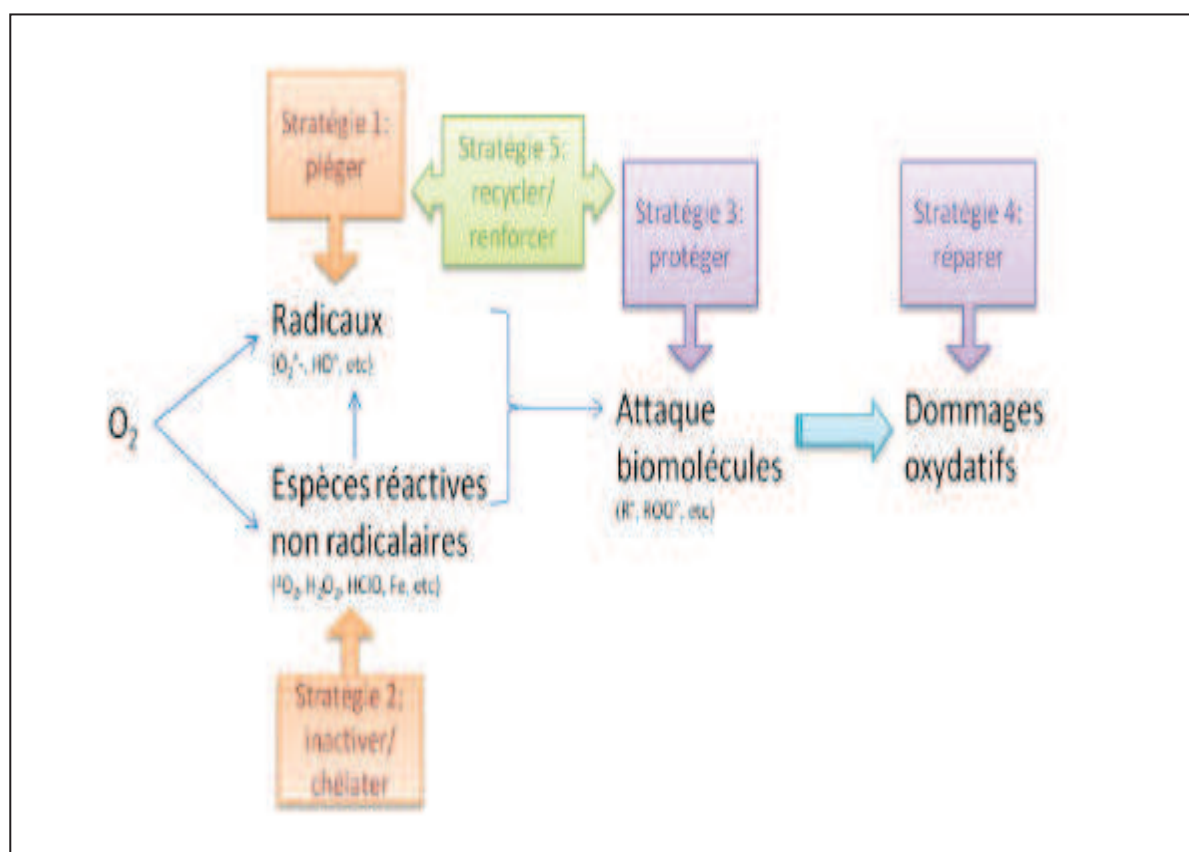


Figure 19 : Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant. D'après Grandjean (2005)

Stratégie 1 : piéger les radicaux libres : Superoxyde dismutase (SOD), acide urique, bilirubine, Vit E, Vit C...

Stratégie2 : inactiver les espèces réactives/chélater les métaux : Glutathion peroxydase (GPX), Catalase (CAT), bilirubine, acide alpha-lipoïque, protéines de transport...

Stratégie3 : protéger les biomolécules : ubiquinone (CoQ10), Vit E, caroténoïdes

Stratégie4 : réparer les dommages oxydatifs : Serum paraoxonase/arylesterase 1(PON1)

Stratégie5 : recycler ou renforcer d'autres antioxydants : ubiquinone (CoQ10), Vit E, métaux

3. 5. 1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont pour rôle d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (Zielinski and Portner, 2000). Parmi les enzymes antioxydantes on peut citer :

a. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante primaire essentielle qui réagit en défense de l'organisme contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001).



b. Glutathion peroxydase (GPX) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH respectivement en eau et alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH. En fait la forme réduite du glutathion (GSH) est le régulateur majeur du redox

intracellulaire et se trouve en abondance dans les cellules, ses concentrations pouvant atteindre 10 mM (Meister and Anderson, 1983).

Le glutathion agit comme un capteur direct des radicaux libres, un co-substrat pour l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, co-facteur de plusieurs autres enzymes, et forme des conjugués dans des réactions d'endo- et de xénobiotiques (Gregus et al., 1996). En réalité 2 molécules de GSH sont nécessaires et formeront la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfide GSSG.



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPX maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.



c. La catalase (CAT)

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.



3. 5. 2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

a. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

b. Les caroténoïdes

Ils sont majoritairement représentés par le β -carotène, appelé aussi « provitamine A ». Du fait de leur faible concentration dans l'organisme, leurs rôles antioxydants sont considérés comme faibles, mais complémentaires des systèmes principaux évoqués plus haut. Le β -carotène désactive l'oxygène singlet 1O_2 , et piège les radicaux peroxydes $ROO^\bullet$ (Krinsky, 1989).

c. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers and Jackson 2008).

Le rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG permet de caractériser le statut redox de la cellule et constitue aussi un bon marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et al., 1992).

d. Les ubiquinones et cytochrome c

Le coenzyme Q10 ou ubiquinol est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers and Jackson 2008). Il assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Ernster and Forsmark-Andree, 1993).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\cdot -}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (Skulachev, 1998).

e. Les vitamines E et C

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Il est admis que les radicaux tocophéryles sont régénérés par l'acide ascorbique et que, sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (Carr et al., 2000).

La vitamine E (α -tocophérol) est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en captant un radical lipidique peroxy ($LOO^{\cdot}$). La vitamine E devient alors à son tour un radical, moins réactif que le $LOO^{\cdot}$, qui pourra être pris en charge par une molécule antioxydante (Khalil, 2002).

La vitamine C est cofacteur de nombreuses enzymes. Elle peut capter directement l' $O_2^{\cdot -}$ et l' $OH^{\cdot}$. Cette vitamine permet de piéger différentes ERO, et aussi de régénérer la vitamine E (Powers and Jackson 2008).

f. Acide α -lipoïque

L'acide α -lipoïque est un cofacteur d'un complexe enzymatique qui participe au cycle de Krebs : le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase. Il agit de différentes manières comme antioxydant : il piège certaines ERO telles que l'oxygène singlet l' 1O_2 , le radical hydroxyle

HO[•], et l'acide hypochloreux HClO ; il chélate certains métaux de transition; et il participe au recyclage d'autres antioxydants- la vitamine C et/ou la vitamine E. Il pourrait également augmenter la concentration en glutathion en favorisant la régénération du GSSG (Packer et al., 1995).

g. Métaux de transition et protéines de transport

Certains métaux de transition servent de cofacteurs d'enzymes antioxydantes, et sont à ce titre regroupés au sein des antioxydants :

- Zinc, Manganèse, Cuivre pour la SOD ;
- Sélénium pour la GPX, la thioredoxine réductase.

Par contre certains métaux sous forme libre pourraient être responsables d'une aggravation du stress oxydant; c'est le cas en particulier du Fer et du Cuivre. C'est pourquoi leurs protéines de transport, qui les chélatent, sont souvent considérées comme des antioxydants :

- Transferrine et ferritine pour le Fer;
- Transcupréines c'est-à-dire céruléoplasmine et albumine pour le Cuivre.

3. 6. Les conséquences du stress oxydant

Les dommages induits par les ERO sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ERO initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP).

3. 6. 1. La peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al., 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al, 2004). Dès lors la perméabilité au calcium augmentée, la fixation aux récepteurs altérée. Tout ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants (McMichael, 2007).

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonenal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale d'ERO (Echtay et al, 2003). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production d'ERO.

3. 6. 2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Les ERO provoquent aussi une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Grandjean, 2005). Cela concerne en particulier les enzymes cytosoliques et les protéines de transport qui perdent leurs fonctionnalités à la suite de ces modifications délétères.

3. 6. 3. Dommage de l'ADN

Il existe, au sein de la cellule, deux « types » d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de séparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources d'ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn.

En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter et al., 1988). Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2°) sa localisation proche de la membrane interne, 3°) des mécanismes de réparations frustrés, et 4°)

une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Ames et al., 1993; Cortopassi et al., 1992).

Selon (Grandjean, 2005) les altérations de l'ADN sont essentiellement causées par le radical hydroxyl HO° et sont de différents types :

- modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN,
- destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel,
- destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule.
- formation de pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (tel que le MDA).

Les réactions d'oxydations de l'ADN créent un grand nombre de dommages de l'ADN

3. 6. 4. Activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Bien que la nature moléculaire du pore de transition de perméabilité (PTP) reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le PTP est un complexe multiprotéique avec de nombreuses protéines candidates dont le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), la cyclophiline D (Green and Reed, 1998; Zamzami et al., 1997), le complexe I (Fontaine and Bernardi, 1999) (figure20). La ciclosporine A, inhibiteur de référence du PTP, retarde le processus d'apoptose (Fontaine et al., 1998) confirmant le rôle clé du PTP dans la mort cellulaire. Succinctement, l'ouverture du PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs.

Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF (Apoptose Inducting Factor). Le cytochrome c alors relargué interagit avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclenchant l'apoptose (Green and Reed, 1998).

L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (Bernardi, 1999). Les ERO agissent directement sur l'ouverture du PTP, pore qui intervient dans le processus d'apoptose (Chen et al., 2003; Skulachev, 1996).

Selon l'équipe de Vercesi, l'ouverture du PTP induit par les ERO serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (Kowaltowski et al., 2001; Vercesi et al., 1997). Il se peut également que ce pore s'ouvre de façons transitoires conduisant à la diffusion d'ions de petite taille, tels Ca^{2+} dépendant du pH et déclenchant la fermeture du pore. Cette situation protégerait les cellules d'une lésion irréversible en évitant le gonflement et la libération dans le cytosol de façon pro-apoptotiques tels que le cytochrome c.

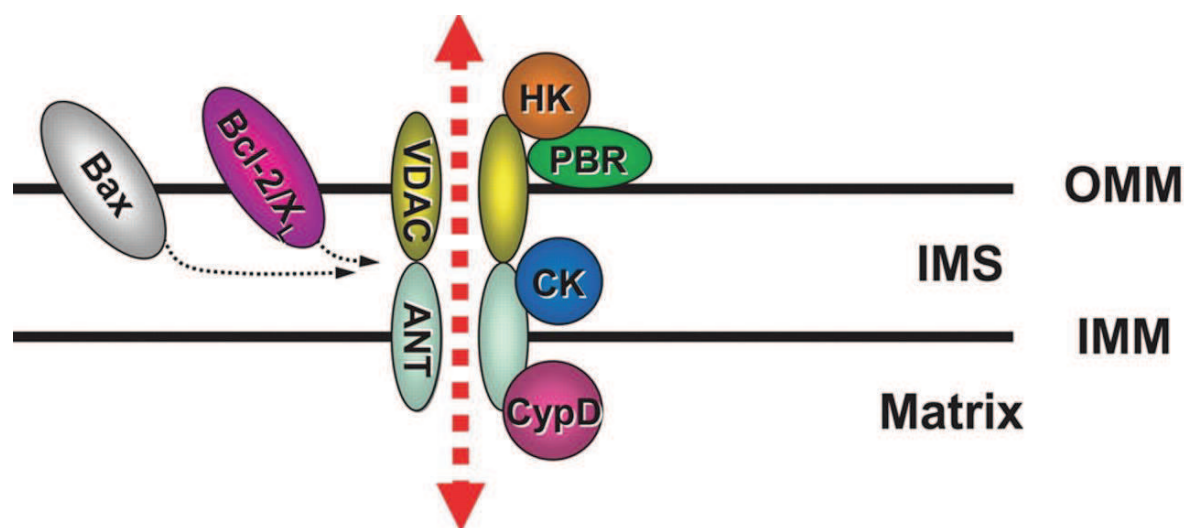


Figure 20 : Structure du mPTP.

Il est formé par le complexe VDAC-ANT-CypD. L'héxokinase II (hkII), la créatine kinase mitochondriale (CK), le récepteur à la benzodiazépine (PBR) et la famille Bcl-2, Bcl-x1, Bax sont considérés comme des éléments régulateurs de ce complexe (Zorov et al., 2009).

MATERIELS ET METHODES

1. Nanoparticules étudiées

La synthèse des nanoparticules de ferrites type spinelle à taille et morphologie contrôlées constitue un défi pour un grand nombre d'équipes de recherche. L'hydrolyse forcée en milieu polyol est une méthode de synthèse relativement récente et s'avère intéressante du fait qu'elle permet d'élaborer avec succès des nanoparticules de métaux et des oxydes notamment des ferrites bien cristallisées, quasi-mono disperses et de taille contrôlée (Beji et al., 2006 ; Ben Tahar et al., 2008 ; Dakhlaoui et al., 2010). Les nanoparticules d'oxydes de fer (magnétite : Fe_3O_4) de notre étude ont été synthétisées par le Laboratoire de Synthèse et Structures de Nanomatériaux (UR11ES30, Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie). Elles sont obtenues par la méthode polyol.

1. 1. Synthèse de Fe_3O_4 par la méthode polyol

Le protocole des préparations chimiques en milieu polyol dont le montage expérimental est donné dans la figure 21 consiste à :

- mélanger dans un ballon tricol 0,025 mole l'acétate de fer (II) ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, Acros Organics 95 %) comme précurseur du fer avec 62,5 ml de diéthylène glycol (DEG), ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$, Acros Organics 99 %).
- Ajouter un volume variable d'eau distillée afin de fixer le paramètre taux d'hydrolyse h ($h = n_{\text{H}_2\text{O}}/(n_{\text{Fe}^{3+}})$) à une valeur bien déterminée.
- chauffer le mélange obtenu à reflux à une température inférieure à 245°C (température d'ébullition de solvant, DEG) pendant 3h.
- récupérer le précipité formé par ultrason et centrifugation 8000 tr/min pendant 20 min.
- laver le précipité à l'éthanol puis à l'acétone.
- sécher le précipité dans l'étuve à 60°C .

À cause de la présence de Fe^{2+} dans leur structure, les nanoparticules sont très sensibles à l'oxydation. Il est donc important que pendant leur synthèse et leur stockage, des conditions anaérobiques strictes soient respectées. Toutes ces nanoparticules se présentent sous forme de nanopoudre de couleur noir (Figure 22).

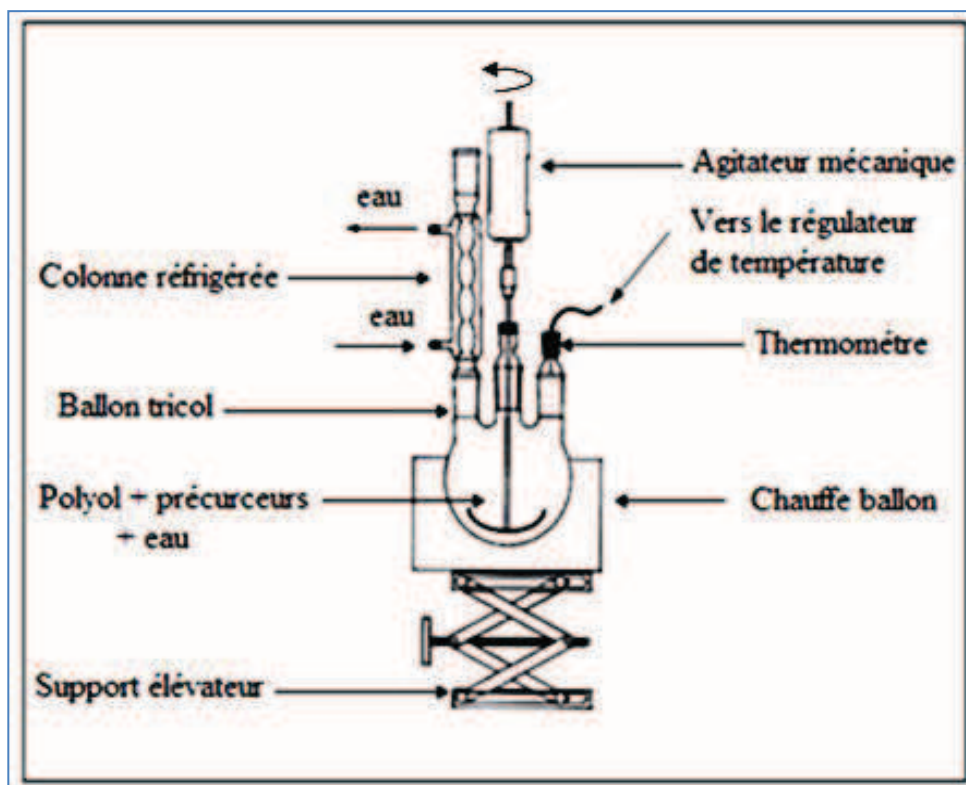


Figure 21 : Schéma du montage à reflux pour la synthèse par la méthode polyol.

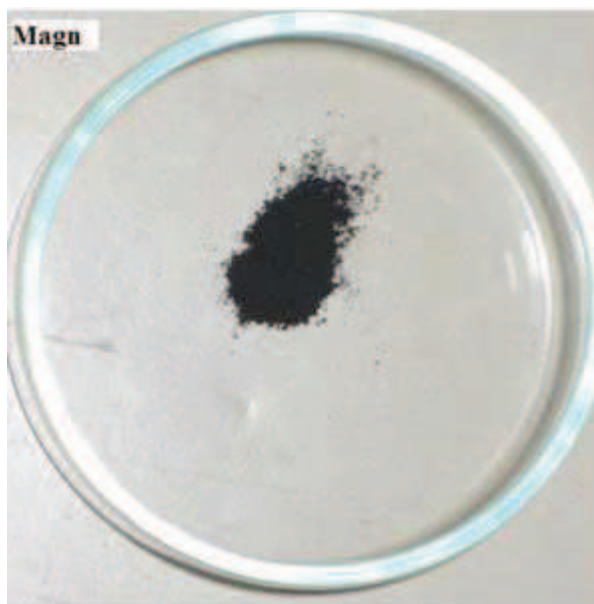


Figure 22 : Photo prise sur la poudre des nanoparticules magnétite (Mgn)

1. 2. Préparation des suspensions de nanoparticules

Les suspensions de nanoparticules sont initialement préparées dans une solution de chlorure de sodium stérile 9‰. La dispersion des nanoparticules est réalisée par sonication qui est une technique mettant en œuvre des ultrasons. Ces derniers permettent de casser les interactions intermoléculaires et donc d'obtenir des nanoparticules moins agglomérées voir moins agrégées si la surface de liaison entre deux particules est faible (Sauter et al., 2008; Mandzy et al., 2005). Ainsi plus le temps de sonication est long plus les interactions intermoléculaires sont cassées et meilleure est la dispersion (Gun'ko et al., 2001).

1. 2. 1. Préparation des suspensions de nanoparticules pour le protocole d'étude du stress oxydant

Les concentrations préparées des nanoparticules Fe_3O_4 pour l'étude *in vivo* sur le système antioxydant sont 20 mg/kg et 40 mg/kg (Ma et al., 2012 ; Zhu et al., 2008). Les nanoparticules sont soniquées pendant 1h.

1.2.2. Préparation des suspensions de nanoparticules pour le protocole d'étude la respiration mitochondriale

Les concentrations préparées des nanoparticules Fe_3O_4 pour l'étude *in vitro* sur la respiration mitochondriale sont 100, 200, 250, 300, 350 et 500 $\mu\text{g/ml}$ (Hussain et al., 2005; Jeng and Swanson, 2006). Les nanoparticules sont soniquées pendant 1h.

Pour obtenir de l'oxyde de fer sous sa forme non particulaire c'est-à-dire une solution d'ions Fe^{3+} , une certaine quantité de nanoparticules a été dissoute dans un petit volume de Hcl concentré sous un chauffage doux (Cornell et Schwertmann, 1996).

2. Tampons et produits

Tampon $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$: 0,699g Na_2CO_3 , 0,285g NaHCO_3 , 200ml H_2O , pH 10,2

Tampon phosphate (100mM): 2,878g KH_2PO_4 , 2,697g K_2HPO_4 , 0,558g EDTA, 250 ml H_2O , pH7,4

Tampon TBS: 7,88g Tris-HCl, 8,76g NaCl, 1000ml H_2O , pH7

Tampon A: 70mM sucrose, 210mM mannitol, 1mM EGTA dans 50 mM Tris/HCl, pH7,4

Tampon B: 70mM sucrose, 210mM mannitol dans 50 mM Tris/HCl, pH7,4

Tampon M: 100 mM de KCl, 50 mM Mops, 1 mM EGTA, 5 mM de Kpi, 1 mg/ml BSA.

3. Animaux

Les animaux utilisés dans l'étude réalisée *in vivo* sont des rats Wistar mâles qui proviennent de la société des industries pharmaceutiques de Tunis (SIPHAT), Ben Arous, Tunisie. Pour l'étude *in vitro*, les rats proviennent d'un centre d'élevage à Strasbourg, France. Les animaux sont soumis à 12h de lumière par 12h d'obscurité, avec eau et nourriture à volonté.

4. Traitement des animaux

Dans le présent travail, deux types de modèles sont étudiés :

- Modèle d'étude *in vivo*: les rats sont répartis en 3 lots :
 - Un lot de 30 rats traités avec 20 mg/kg de nanoparticules Fe_3O_4 : les rats reçoivent une seule dose de nanoparticules administrées par gavage. Après 24h, 48h, 5j, 15j et 30j, les rats sont sacrifiés par décapitation.
 - Un lot de 30 rats traités avec 40 mg/kg de nanoparticules Fe_3O_4 : les rats reçoivent une seule dose de nanoparticules administrées par gavage. Après 24h, 48h, 5j, 15j et 30j, les rats sont sacrifiés par décapitation.
 - Un lot de 30 rats témoins qui reçoivent un volume équivalent de NaCl 9‰ : les rats reçoivent une seule dose de NaCl administrées par gavage. Après 24h, 48h, 5j, 15j et 30j, les rats sont sacrifiés par décapitation.
- Modèle d'étude *in vitro* : les rats sont répartis en 3 lots. Les rats des 3 lots sont installés dans une cage d'induction hermétique ventilée avec un mélange d'isoflurane à 3% (AERRANE®, BAXTER S.A.S.) et d'oxygène. Après induction anesthésique, les animaux sont placés sur des plaques chauffantes (MINERVE®, Esternay, France) à 35°C. La ventilation spontanée était maintenue au travers d'un masque délivrant l'oxygène à une concentration d'isoflurane de 1,5%. Le débit de gaz frais était maintenu à 1 L/min.

- Un lot de 12 rats âgés de 2 mois : Plusieurs organes sont prélevés (cerveau, cœur, foie, rein et poumon). Puis soumis à la technique d'isolation mitochondriale pour l'étude de la respiration mitochondriale. Chaque organe est traité avec les différentes concentrations de nanoparticules (0, 100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$)
- Un lot de 6 rats âgés de 3 mois : Le foie est prélevé. Puis soumis à la technique d'isolation mitochondriale pour l'étude de la respiration mitochondriale. Le foie est traité avec les différentes concentrations de nanoparticules (0, 250, 300, et 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$).
- Un lot de 6 rats âgés de 18 mois : Le foie est prélevé. Puis soumis à la technique d'isolation mitochondriale pour l'étude de la respiration mitochondriale. Le foie est traité avec les différentes concentrations de nanoparticules (0, 250, 300, et 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$).

Les prélèvements sanguins sont centrifugés à 3000xg pendant 15 min. Le plasma obtenu est récupéré pour le dosage des transaminases et du lactate déshydrogénase. A chaque période de traitement mentionnée auparavant, 400 mg de foie sont broyés en présence de 4 ml de tampon TBS puis sont centrifugés à 9000 tr/min pendant 10 min. La fraction cytosolique S_9 est ensuite récupérée. Une partie servira pour l'estimation de la quantité des protéines et une autre partie servira au dosage des différents paramètres de stress oxydant. Une partie du foie est prélevée et fixée avec l'azote pour la confection ultérieure des coupes histologiques.

5. Dosage des protéines

Selon la méthode de Lowry (1951), on introduit dans l'ordre 0,2 ml de S_9 dilué de foie, 2ml du mélange réactionnel composé de Na_2CO_3 à 2%, CuSO_4 à 1% et tartrate double de Na et K à 2% dans les proportions (50V/1V/1V) et 0,2 N de réactif de Folin. Après agitation, les tubes sont mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 min. Mise en présence du milieu avec le réactif de Folin, la présence de protéines et du Cu^+ , en milieu acide, entraîne la réduction du réactif de Folin en espèces moléculaires réduites colorées en bleu. La densité optique est déterminée à une d'onde de 750 nm contre un blanc contenant le tampon d'homogénéisation préparé dans les mêmes conditions que les échantillons et les étalons. La quantité de protéines est calculée en mg/ml, à partir d'un courbe étalon réalisé avec l'albumine bovine (BSA) dont la concentration varie de 25 à 250 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 25).

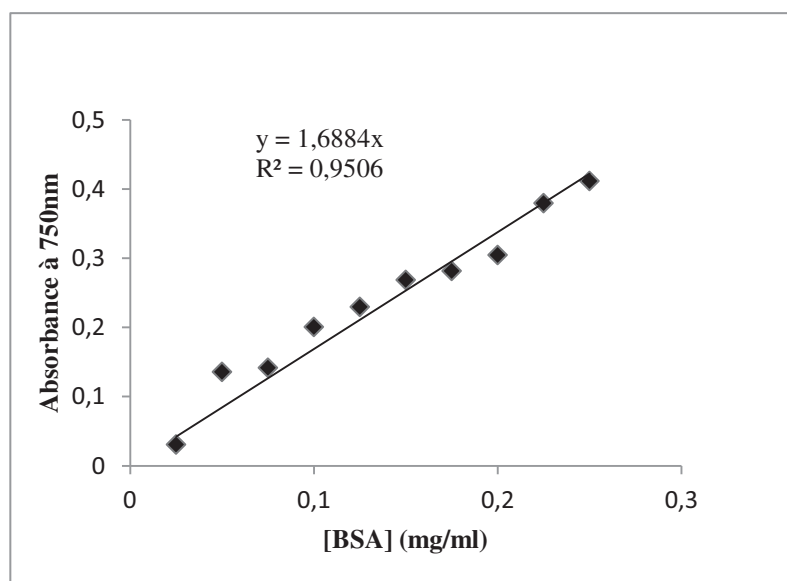


Figure 23 : Courbe d'étalonnage des protéines dosées par la méthode de Lowry (1951)

6. Mesure des paramètres du stress oxydant

6. 1. Dosage des activités des enzymes antioxydantes

6. 1. 1. La superoxyde dismutase (SOD)

a. Principe

Le superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Le dosage est réalisé avec l'épinephrine. L'auto-oxydation de l'épinephrine est stable à pH acide mais elle est oxydée avec une augmentation croissante du pH. Donc à pH 10,2, la superoxyde dismutase agit comme un inhibiteur puissant de l'oxydation spontanée de l'épinephrine (Misra and Fridovich, 1972). En mesurant le taux auquel la SOD diminue l'auto-oxydation d'épinephrine, l'activité spécifique de SOD dans chaque échantillon peut être calculée.

b. Mode opératoire

Pour un dosage spectro-photométrique, on introduit dans une cuve en polystyrène et dans l'ordre qui suit 1960 µl de tampon $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ préalablement ajusté à pH 10,2, 10 µl de catalase bovine et 10 µl de l'échantillon étudié ensuite on ajoute 20 µl d'épinephrine. Ensuite on note l'absorbance mesurée à 480nm chaque minute pendant 5 min.

c. Calcul de l'activité de la SOD

L'activité de la SOD est calculée selon la formule suivante :

$$SOD = Y/X$$

$Y = [(DO_{\text{témoin}}/DO_{\text{échantillon}}) - 1]/5$ (utiliser les valeurs des DO à 5 min)

$X =$ quantité de protéines dans 10 μ L de l'échantillon (mg/mL)

L'activité de la SOD est exprimée en Unité SOD/min/mg prot.

6. 1. 2. Glutathion peroxydase (GPX)

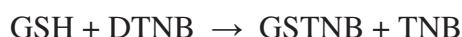
a. Principe

L'activité de la GSH-Px est mesurée par la technique de Flock et Gunzler (1984) modifiée utilisant le H₂O₂ comme substrat. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB).

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de 5,5' dithiobis(2-acide nitrobenzoïque) (DTNB) :



Le TNB absorbe à 412 nm et permet de quantifier l'activité de la glutathion réductase. Ainsi, pour chaque molécule de GSH formée, il y aura formation d'une molécule de TNB.

b. Mode opératoire

Pour un dosage spectro-photométrique, on mélange 200µl de l'extrait S₉ du foie, 200µl tampon phosphate (100mM), 200µl GSH (4mM) et 400 µl H₂O₂ (5mM). On les incube ensuite pendant 1 min à 37°C puis on ajoute 500 µl TCA 5% . Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 1500xg. 200µl du surnageant est récupéré et on lui ajoute 500 µl de tampon phosphate et 500 µl DTNB. Ensuite on note l'absorbance mesurée à 412 nm chaque minute pendant 5 min.

c. Calcul de l'activité de la GPX

L'activité de la GPX est calculée selon la formule suivante :

$$GPX = Y/X$$

$Y = [DO_{\text{Blanc}} - DO_{\text{échantillon}}]/6.22$

$X = \text{quantité de protéines dans } 200\mu\text{L de l'échantillon (mg/ml)}$

L'activité de la GPX est exprimée en nmoles de GSH consommé/min/mg prot.

6. 1. 3. La catalase (CAT)**a. Principe**

La catalase est une enzyme qui participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène en dégradant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en dioxygène suivant la réaction :



La disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie.

b. Mode opératoire

H₂O₂ absorbe dans l'ultraviolet. La longueur d'onde traditionnellement utilisée pour doser H₂O₂ en spectrophotométrie est 240 nm (Aebi et al, 1984). En conséquence, toutes les mesures seront réalisées dans des cuves en quartz. L'échantillon est mesuré contre le blanc.

Tableau 2 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'activité catalase

	Blanc (μl)	Echantillon (μl)
Tampon PO ₄ (50mM, pH=7)	2000	1950
H ₂ O ₂ (100mM)	1000	1000
S ₉ (mg prot/ml)	0	50

c. Calcul de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est exprimée en μmol de H₂O₂ hydrolysées/min/mg protéine (UI /mg Pr) :

$$\text{Activité catalase} = \frac{\Delta DO \times V_{mr} \times L}{\epsilon \times L \times V_{ext} \times X} \times Fd$$

ΔDO : Variation de la densité optique par minute ($\lambda = 240\text{nm}$)

V_{mr} : Volume du milieu réactionnel (3ml)

L : Longueur du trajet optique (1cm)

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de la catalase (0,036 mmol⁻¹cm⁻¹)

V_{ext} : Volume de l'extrait introduit dans l'échantillon réactionnel (0,1 ml)

X : Quantité des protéines en mg /ml

Fd : Facteur de dilution de l'échantillon

6. 1. 4. Mesure de la peroxydation lipidique (MDA)

Le malonedialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydant (Ladhar-Chaabouni et al. 2007 ; Funes et al., 2006).

a. Principe

Le MDA est dosé par la méthode colorimétrique en présence de l'acide thiobarbiturique. La réaction au TBA (Acide Thio Barbiturique) est une méthode très sensible qui permet de détecter de faibles quantités de peroxydes lipidiques et plus particulièrement le MDA libre. La détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, 2 molécules de TBA réagissent avec une molécule de MDA ce qui entraîne la formation d'un chromogène rouge dont l'absorption maximale est comprise entre 312 et 535 nm (Sunderman et al., 1985). L'intensité de la coloration rouge augmente avec la concentration en MDA. Il faut noter que le complexe MDA-TBA n'est stable que pendant 3 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante.

b. Mode opératoire

Le mode opératoire est résumé au niveau du tableau 3 :

Tableau 3 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de la peroxydation lipidique

	Blanc (μl)	Echantillon (μl)
S ₉ (mg prot/ml)	0	500
TBS	700	200
TCA-BHT	500	500
Vortexer et centrifuger à 1000 tr/min pendant 10 min		
Tris-TBA	640	640
Surnageant	800	800
Hcl	160	160
Vortexer et incuber à 80°C pendant 10 min Lecture de l'absorbance à 530nm		

c. Calcul de la concentration de la MDA

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formée donnant ainsi une évaluation précise de lipides peroxydés.

$$C = \frac{DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

C : Concentration de la MDA en nmol / mg de protéines

DO : Densité optique lue à 530 nm

ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA (1,56 10⁵ M⁻¹cm⁻¹)

L : Longueur du trajet optique (1cm)

X : Quantité des protéines en mg /ml

Fd : Facteur de dilution (0,2083)

6. 1. 5. Mesure des taux des sulfhydriles non protéiques

a. Principe

Le groupement sulfhydrile est composé d'un atome de soufre et d'un atome d'hydrogène reliés au moyen d'une liaison simple : -S-H. Ce type de groupement est rencontré dans les thiols.

b. Mode opératoire

Le mode opératoire est résumé au niveau du tableau 4 :

Tableau 4 : Quantités des réactifs et conditions de mesure des taux des sulfhydriles non protéiques

	Blanc (μl)	Echantillon (μl)
S ₉ (mg prot/ml)	0	200
TCA(5%)-Na ₂ EDTA	700	500
Vortexer et centrifuger à 2000 g pendant 5 min		
Tampon Phosphate	500	500
Surnageant	500	500
acide 2 nitrobenzoïque	50	50
Vortexer et Lecture de l'absorbance à 410 nm après 2 min		

c. Calcul du taux des sulfhydriles non protéiques

$$C = \frac{A \times Fd}{\epsilon}$$

C : Concentration en groupement SH (μmol/g)

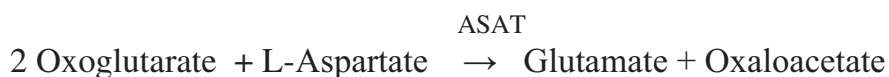
Fd : Facteur de dilution

ϵ : Coefficient d'extinction molaire (13,6 M⁻¹cm⁻¹)

7. Détermination de l'activité plasmatique des transaminases hépatiques

7. 1. Mesure de l'activité de l'aspartate amino transférase (ASAT)

L'activité de l'ASAT est déterminée d'une façon cinétique selon la réaction suivante :



MDH : Malate Déshydrogénase

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate amino transférase dans l'échantillon. Le dosage de l'ASAT a été réalisé à l'aide d'un kit spécifique Biomaghreb en suivant l'enchaînement suivant :

Un volume de 1ml de réactif de travail a été mélangé à 100 µl de plasma puis incubé pendant une minute à température ambiante ensuite la diminution de la densité optique a été mesurée pendant 3 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. La quantité d'ASAT exprimé en UI/L est calculée selon la formule suivante :

$$ASAT = \Delta DO/min \times 1750$$

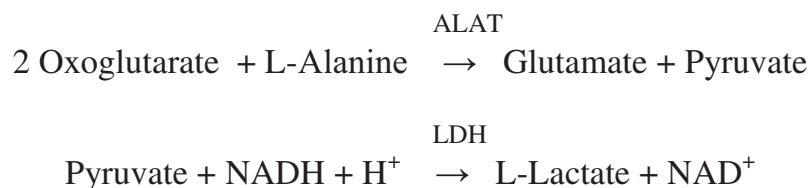
La préparation du Réactif de travail est résumée au niveau du tableau 5 :

Tableau 5 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'aspartate amino transférase

Réactif 1 (R1)	Tampon Tris pH 7,8 à 30°C	80 mmol/l
Solution tampon	L-aspartate	200 mmol/l
Réactif 2 (R2)	NADH	0,18 mmol/l
Substrat	LDH	800 U/I
	MDH	600 U/I
	Oxoglutarate	12 mmol/l
Reprendre le substrat R2 par 3 ml de tampon R1		

7. 2. Mesure de l'activité de l'alanine amino transférase (ALAT)

L'activité de l'ALAT est déterminée d'une façon cinétique selon la réaction suivante :



LDH : Lactate déshydrogénase

La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ est proportionnelle à l'activité d'ALAT dans l'échantillon. Le dosage de l'ALAT a été réalisé à l'aide d'un kit spécifique Biomaghreb en suivant l'enchaînement suivant :

Un volume de 1ml de réactif de travail a été mélangé à 100 µl de plasma puis incubé pendant une minute à température ambiante ensuite la diminution de la densité optique a été mesurée pendant 3 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. La quantité d'ALAT exprimé en UI/L est calculée selon la formule suivante :

$$ALAT = \Delta DO / \text{min} \times 1750$$

La préparation du Réactif de travail est résumée au niveau du tableau 6 :

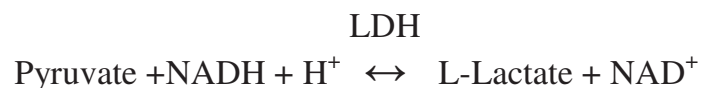
Tableau 6 : Quantités des réactifs et conditions du dosage de l'alanine amino transférase

Réactif 1 (R1)	Tampon Tris pH 7,5	100 mmol/l
Solution tampon	L-Alanine	500 mmol/l
Réactif 2 (R2)	NADH	0,18 mmol/l
Substrat	LDH	1200 U/l
	Oxoglutarate	15 mmol/l
Reprendre le substrat R2 par le volume approprié de tampon R1		

8. Détermination de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH)

a. Principe

Détermination cinétique de l'activité du lactate déshydrogénase. La mesure de son activité est faite selon le schéma réactionnel suivant :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité lactate déshydrogénase dans l'échantillon.

b. Mode opératoire

Le mode opératoire est résumé au niveau du tableau 4 :

Tableau 7: Quantités des réactifs et conditions de mesure du lactate déshydrogénase

Réactif 1	Tampon Tris pH 7,2	80 mmol/l
Solution tampon	L-Alanine	1,6 mmol/l
	NaCl	200 mmol/l
	NADH	0,2 mmol/l
Réactif 2		
Coenzyme		
Réactif de travail : reprendre le substrat R2 par le volume approprié de tampon R1		
Réactif de travail	1ml	
plasma	20µl	
Mélanger et incuber pendant 1min		
Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 3min à 340nm		

c. Calcul de l'activité du lactate déshydrogénase

L'activité du lactate déshydrogénase est exprimée en UI/L et est calculée selon la formule suivante :

$$LDH = \Delta DO / min \times 8095$$

9. Techniques histologiques

Les échantillons de foie préalablement conservés dans une solution de formol (10%) sont prélevés puis mis dans des cassettes et introduits dans un automate pendant 24h pour déshydrater les organes ensuite leur inclusion est réalisé dans du paraffine sous forme de cubes. Les cubes sont ensuite refroidis puis coupés à l'aide d'un microtome. Les coupes sont étalées et collées sur des lames avec un gel de gélatine à 2% puis séchées pendant une nuit dans une étuve réglée à une température de 35 - 42°C. En ce qui concerne les étapes de préparation et de réalisation des coupes histologiques, le tableau 8 résume les principales étapes.

Tableau 8 : Les différentes étapes de préparation des coupes histologiques

Etapes	Bains utilisés
1. Déparaffinage	Deux bains de toluène
2. Hydratation	- Eau - Alcool 100% - Alcool 95% - Alcool 50% - Eau
3. Coloration	- Hematoxyline (7-10 min) - Lavage eau - Eosine (3-5 min) - Lavage eau
4. Déshydratation	- Alcool 50% - Alcool 75% - Alcool 95% - Alcool 100% - Toluène (2 bains)

La coloration des sections avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E) est employée universellement pour l'examen microscopique des tissus. Les sections colorées représentent une précieuse ressource pour l'étude de la morphologie et de la structure du tissu. L'examen microscopique des sections colorées facilite l'interprétation de la pathologie, de l'identification du tissu, de l'étude de la composition du tissu.

10. Protocole d'étude de la respiration mitochondriale

10. 1. Préparation des mitochondries isolées

La technique d'isolation mitochondriale est identique que ce soit pour le foie, cœur, poumons, les reins ou le cerveau. Elle est basée sur la fragmentation cellulaire en utilisant différentes vitesses de centrifugation. Les organes prélevés sont trempés dans un tampon d'homogénéisation (Tampon A). Trois lavages au Tampon A sont effectués. La quasi-totalité des tissus prélevés sont nécessaires pour avoir suffisamment de mitochondries isolées afin d'effectuer les études de la respiration mitochondriale.

Les tissus sont sectionnés de sorte à avoir des fragments très fins, puis broyés au Potter jusqu'à avoir un liquide homogène. L'homogénat est centrifugé à 1300 tour par minute, pendant trois minutes, à 4°C. Les noyaux sédimentent dans le culot, les couches superficielles contiennent les mitochondries, les lysosomes, les ribosomes, et d'autres constituants cellulaires. Le surnageant est filtré et centrifugé à 10000 tours par minute, pendant dix minutes, à 4°C. Le culot contient alors les mitochondries, le surnageant contient le reste. Les mitochondries sont récupérées et rincées à trois reprises au tampon de survie (Tampon B) ; 200 µl de la solution finale sont conservés à 4°C pour les études de la respiration mitochondriale.

10. 2. Exposition des mitochondries aux nanoparticules

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont mélangées avec une solution de NaCl 9%. Le mélange est soumis à une ultrasonication pendant 60 min. La suspension des particules est vortexé à chaque fois avant utilisation. 3ml de la solution M est mise sous agitation pendant 10 min au niveau de chaque chambre oxygraphique pour oxygéner la solution. Les mitochondries isolées sont mises avec du glutamate et du malate comme substrats. Puis incubées pendant 30 min avec différentes concentrations de nanoparticules.

Les mitochondries des rats adultes sont isolées à partir de 0,3 mg de cerveau, cœur, foie, rein et à partir de 0,5 mg de poumon puis incubées pendant 30 min en présence de différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer (0, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$).

Les mitochondries des rats âgés et jeunes sont isolées à partir de 0,3 mg de foie puis incubées pendant 30 min en présence de différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer (0, 250, 300 et 350 $\mu\text{g/ml}$).

10. 3. Protocole d'étude de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les analyses se font dans des chambres oxygraphiques thermostatées reliées à un bain marie à 25°C pour les mitochondries isolées (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Pour mesurer la décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres, des électrodes de Clark sont utilisées, reliées à un logiciel qui analyse les variations de concentration en oxygène (Oxygen 571®). Ceci va permettre de calculer la vitesse de consommation d'oxygène pour les différentes chambres, qui constitue le reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. Différents substrats sont injectés pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale (Figure 24) :

- Initialement, les mitochondries isolées sont placées dans le Tampon M, contenant les substrats qui vont générer du NADH, équivalent réducteur qui donne des électrons au complexe I : glutamate (10 mM) et malate (2.5 mM). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV (V_0).
- on injecte ensuite de l'ADP (2 mM), permettant une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale à travers de ces complexes I, III et IV (V_{max}). Le rapport V_{max}/V_0 constitue l'ACR (acceptor control ratio) qui permet de quantifier le couplage phosphorylation/oxydation et donc l'efficacité de la phosphorylation oxydative.
- l'adjonction d'amital (0,02 mM) va bloquer le complexe I et entraîner un arrêt du fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale.
- l'adjonction de succinate (25 mM), substrat qui va générer du FADH_2 grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaîne respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV (V_{succ})).

- l'adjonction du tmpd (0,5 mM) et de l'ascorbate (0,5 mM) stimule l'activité du complexe IV à son maximum, ce qui permet son étude indépendamment du fonctionnement des autres complexes (Vtmpd).

Toutes les vitesses sont exprimées en $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ de protéines.

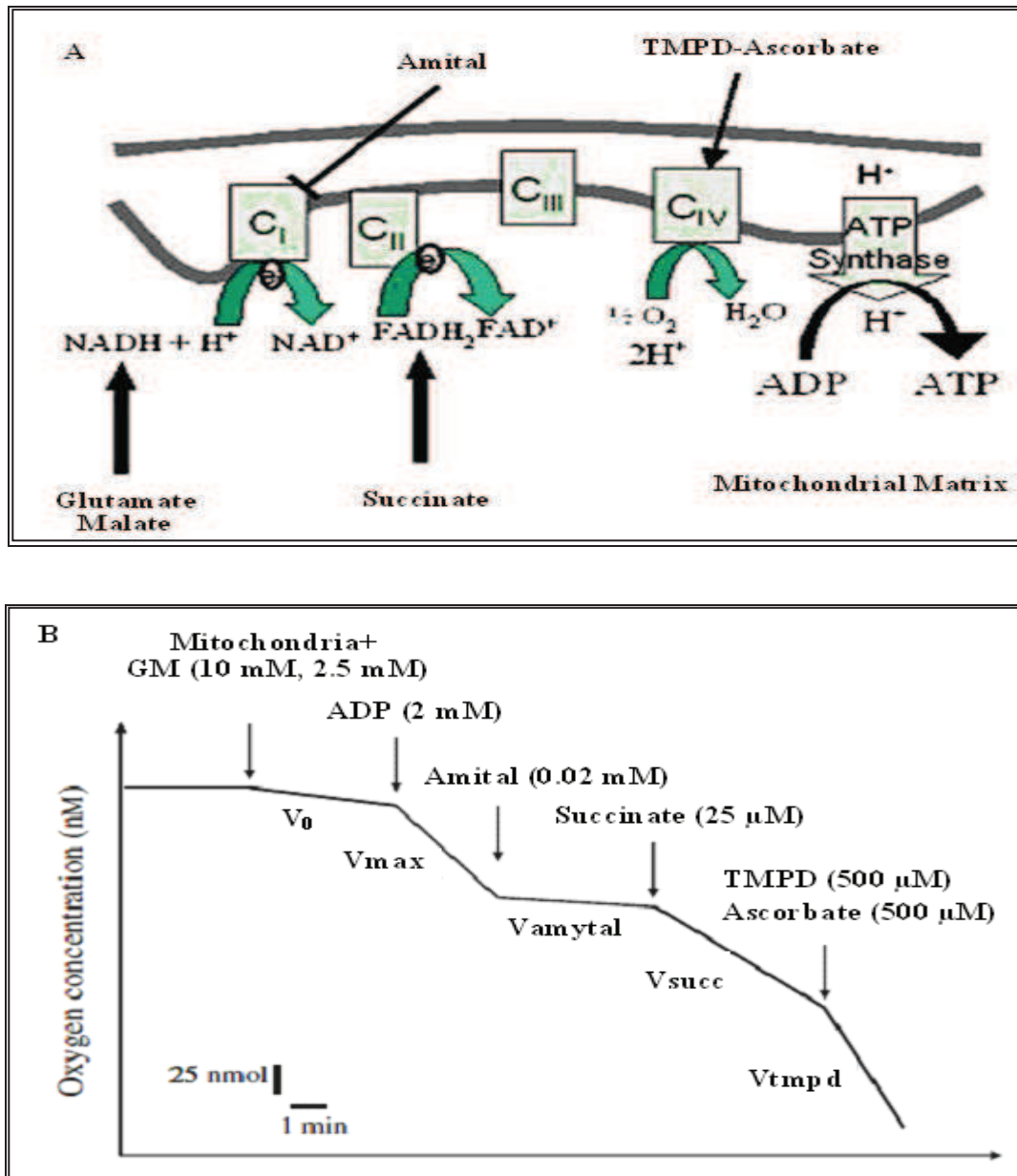


Figure 24: (A) Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale avec substrats et des inhibiteurs spécifiques. CI: complexe I, CII: complexe II, CIII: complexe III, CIV: complexe IV, tmpd : N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride, H : proton. (B) Schéma d'un tracé oxygraphique de mitochondrie isolé montrant les mesures des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en utilisant les substrats et les inhibiteurs indiqués. GM : glutamate-malate, ADP: Adenosine diphosphate, V_{max}: capacité maximale oxydative (complexes I, III et IV activités), V_{succ} (complexes II, III and IV activités), V_{tmpd} (complexe IV activité).

11. Calculs statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne accompagnée de sa erreur standard ($\pm$ SEM). Les comparaisons entre les groupes sont réalisées par une analyse de variance (One-way ANOVA) complétée par un test de comparaison multiple (Test de Tukey). Une valeur de $P \leq 0,05$ est considérée comme significative.

RESULTATS

CHAPITRE I

Techniques de caractérisation des nanoparticules
d'oxyde de fer (Fe_3O_4)

1. Objectifs

Le but de ce chapitre est de faire la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer en ayant recours à deux méthodes d'analyse :

- La diffraction des rayons X
- La microscopie électronique à transmission

2. Caractérisation par diffraction de rayons X (DRX) sur poudre

La poudre de Magnétite obtenue pour un taux d'hydrolyse ($h = \frac{nFe^{2+}}{nH_2O}$) de 11 est identifiée par diffraction de rayons X (DRX) (Figure 25). Son diffractogramme montre la formation d'une phase pure de ferrite de structure type spinelle. Le paramètre de maille calculé à partir du pic le plus intense (311) en appliquant la loi de Bragg est de 8,38 Å et est très proche de celui du massif Fe_3O_4 (8,387 Å). Le diamètre moyen est estimé par l'application de formule de Scherrer (Scherrer, 1918) selon l'équation (**Eq. I**), en faisant une moyenne sur les différents pics observés, est de 10 nm.

$$L_{DRX}(hkl) = K\lambda / (B \cos \Theta) \text{ (Eq. I)}$$

- K : Facteur de forme : un facteur qui dépend de la morphologie des particules constituant la poudre ($K = 0,89$ pour les particules sphériques).
- λ : La longueur d'onde de la radiation utilisée ($\lambda_{Co} = 1,78901$ Å).
- $B = B_{obs.} - B_{inst.}$: La largeur à mi-hauteur d'un pic observé ($B_{obs.}$) corrigé de la contribution instrumentale ($B_{inst.}$). $B_{inst.}$ est déterminée à partir d'un échantillon massif standard (ne présentant aucun défaut structural comme Si, LaB_6 , $Gd_3Ga_3O_{12}$, ...).

3. Caractérisation par microscopie électronique à transmission

Dans le but d'observer la morphologie et la taille de particules préparées l'équipe « Synthèse et Structures de Nanomatériaux » s'est servie de la microscopie électronique à transmission (MET). Les clichés MET des échantillons Fe_3O_4 et l'histogramme (Figure 26) montrent que les particules sont sphériques, faiblement agglomérées, avec une taille nanométriques de diamètre moyen D_{MET} de 9 nm. La taille mesurée par MET est en bon accord avec la taille déterminée à partir de DRX (10 nm) renseignant sur l'état monocristallin des nanoparticules préparées.

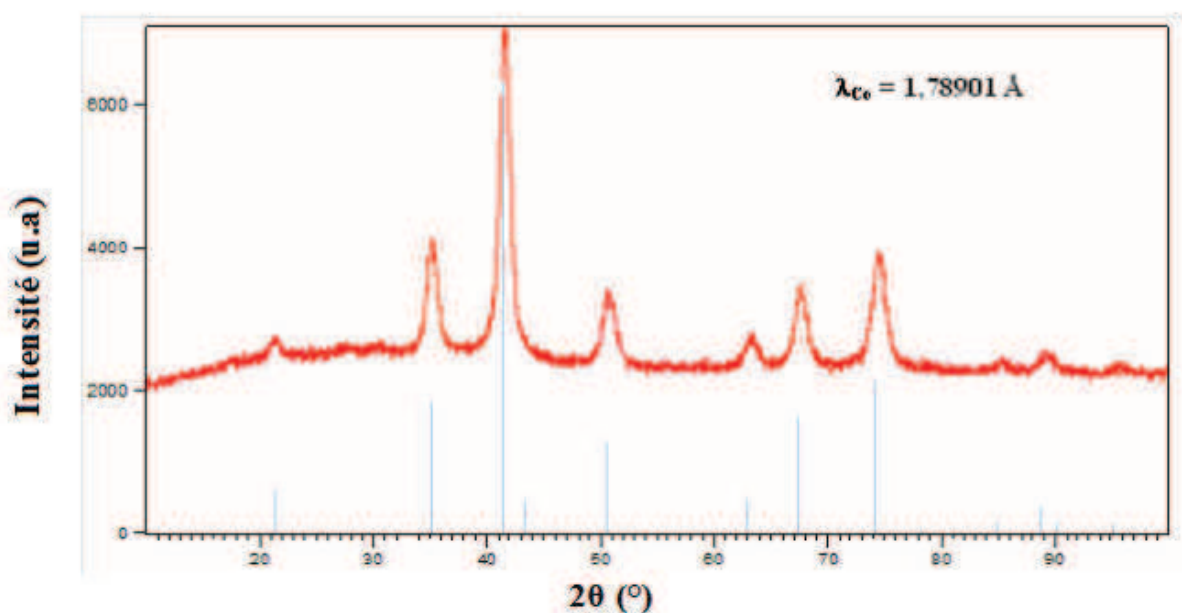


Figure 25 : Diffractogramme DRX sur poudre de nanoparticules Fe_3O_4 superposé avec le diffractogramme calculé (bâtonnets) du massif de Fe_3O_4 .

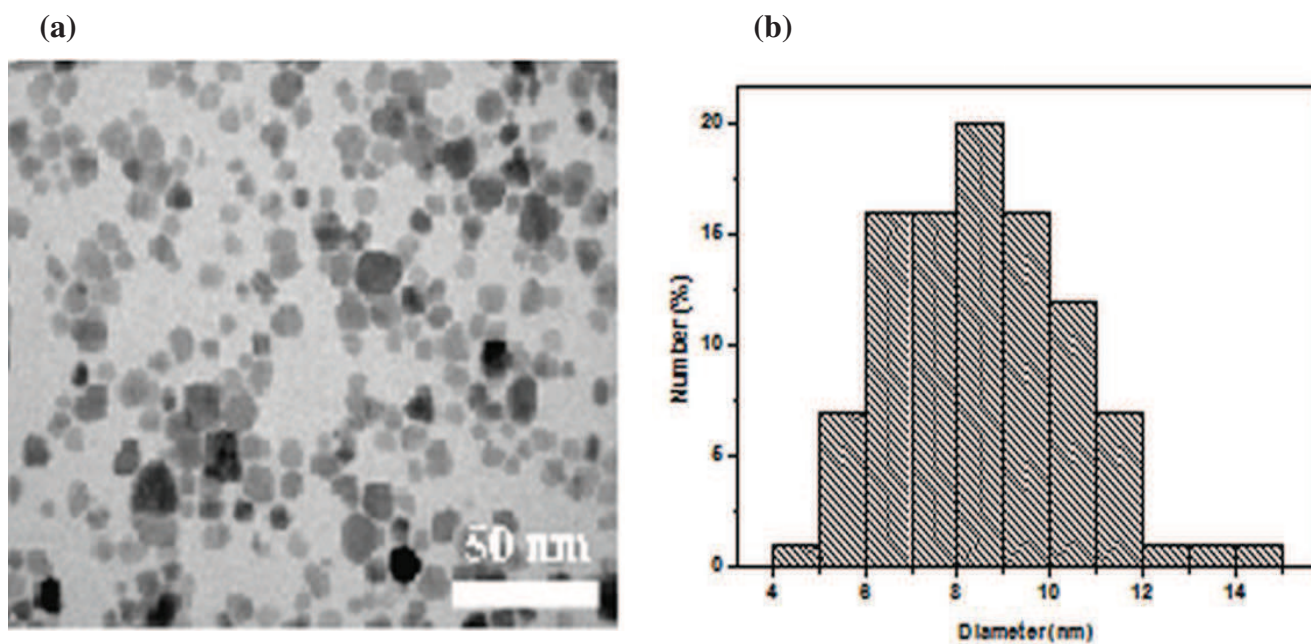


Figure 26 : Morphologie des nanoparticules Fe_3O_4 observées par MET (a) et histogramme correspondant de tailles (b)

DRX : Diffraction de Rayons X

MET : Microscopie Electronique à Transmission

CHAPITRE II

Toxicité hépatique aigue des nanoparticules d'oxyde de
fer *in vivo* sur le système antioxydant

1. Objectifs

Le but de ce chapitre est de caractériser la capacité des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4), *in vivo*, à induire un stress oxydant chez des rats wistar et plus spécifiquement au niveau du foie.

2. Rôle du stress oxydant dans la toxicité hépatique des nanoparticules Fe_3O_4

2. 1. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

Nos résultats montrent que l'activité du superoxyde dismutase varie selon la dose de nanoparticules Fe_3O_4 administrée et la durée après exposition. En effet, 24h après le gavage des nanoparticules Fe_3O_4 avec la dose de 20 mg/kg, il y a diminution de l'activité de la SOD qui devient significative après 48h ($0,1 \pm 0,03$ U/min/mg protéine vs $0,5 \pm 0,09$ U/min/mg protéine chez le témoin; $p < 0,05$). Après 15j il y a également une diminution significative ($0,07 \pm 0,02$ U/min/mg protéine; $p < 0,01$) et qui se poursuit après 30j ($0,1 \pm 0,02$ U/min/mg protéine; $p < 0,05$) (Figure 27). Chez les rats traités avec 40mg Fe_3O_4 /kg, on note une diminution significative de l'activité de la SOD après 30j d'exposition ($0,1 \pm 0,02$ U/min/mg protéine; $p < 0,01$) (Figure 27).

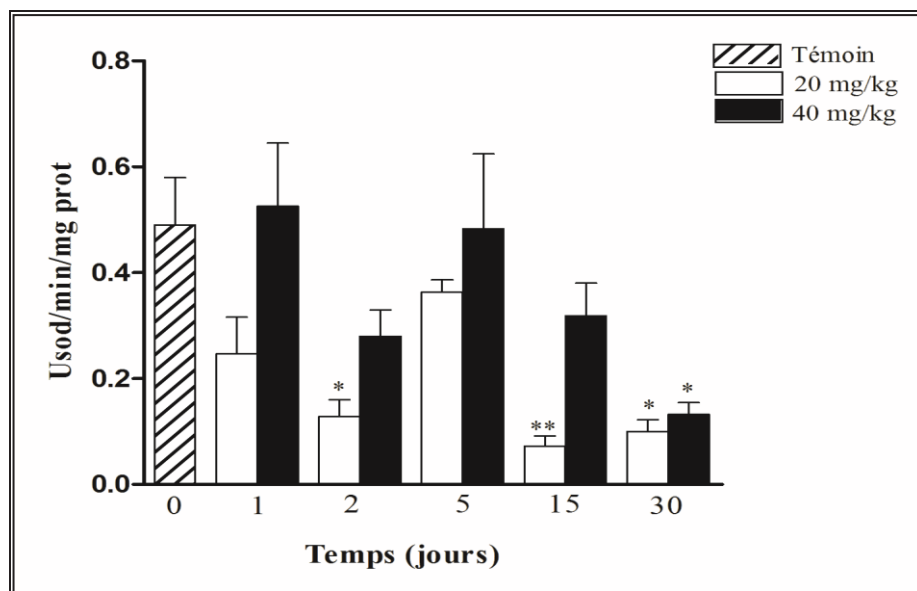


Figure 27 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD) hépatique.

Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg Fe_3O_4 /kg et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

2. 2. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPX)

Chez les rats traités avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on ne note pas de variations significatives dans l'activité de la glutathion peroxydase par rapport au témoin (Figure 28). Par contre, 24h après l'administration de 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, l'activité de la glutathion peroxydase subit une augmentation significative par rapport au témoin ($0,05 \pm 0,002$ vs $0,04 \pm 0,002$ GSH consommé/min/mg protéine; $p < 0,05$) qui atteint un pic après 48h ($0,07 \pm 0,007$ GSH consommé/min/mg protéine; $p < 0,001$). Puis elle diminue progressivement au cours des jours suivants pour atteindre les valeurs basales vers le 15^{ème} jour post exposition (Figure 28).

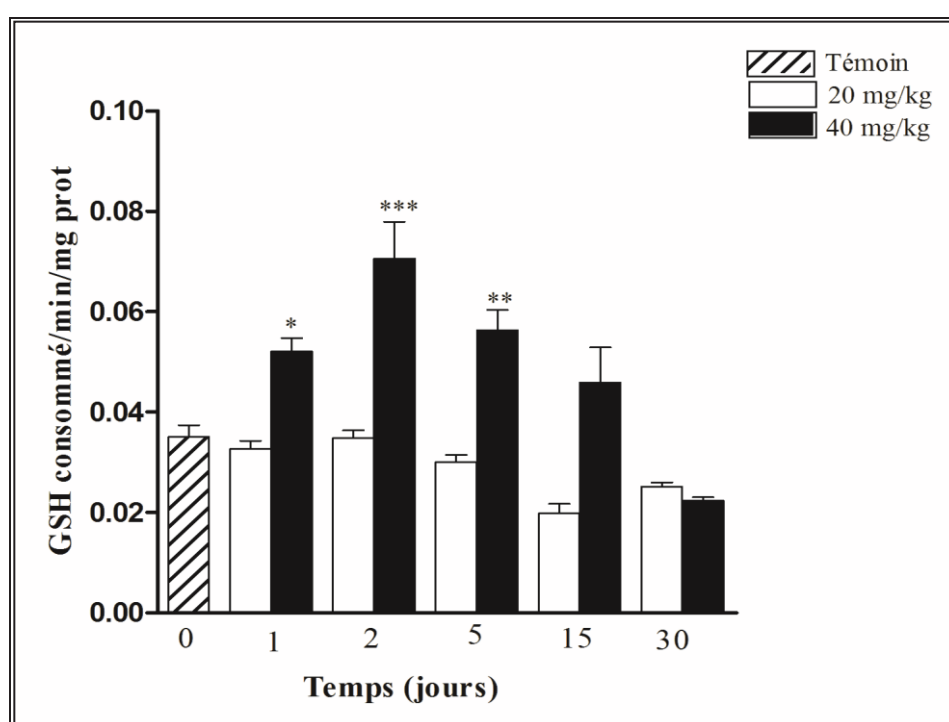


Figure 28 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique.

Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

2. 3. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de la catalase (CAT)

24h après l'administration de 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, l'activité de la catalase augmente significativement par rapport au témoin ($5152 \pm 392,4$ vs $3043 \pm 244,2$ UI/mg protéine; $p <$

0,05). Puis elle diminue progressivement au cours du temps. Pour la dose de 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, il y a également élévation de l'activité catalasique hépatique après 24h ($5845 \pm 239,4$ UI/mg protéine ; $p < 0,001$) qui perdure jusqu'à 5j ($6484 \pm 635,7$ UI/mg protéine ; $p < 0,001$) puis qui diminue progressivement vers 15j et 30j.

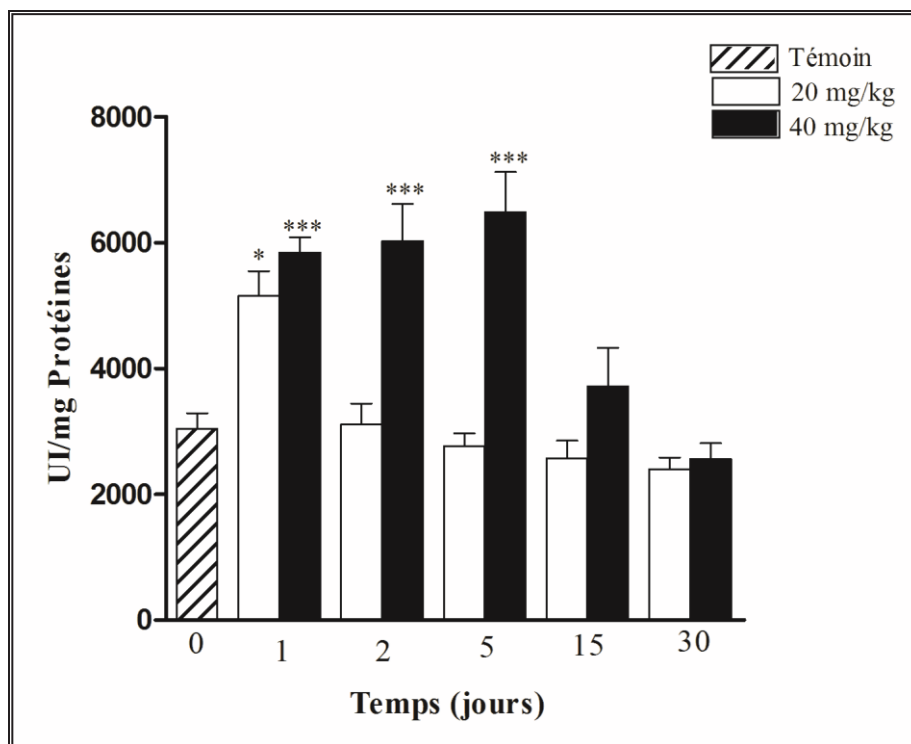


Figure 29 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la catalase hépatique.

Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

2. 4. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur la peroxydation lipidique (MDA)

La variation du taux du MDA varie selon la dose des nanoparticules administrée. En effet, 5jours l'administration de la dose de 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on note une diminution significative du taux du MDA hépatique par rapport au témoin ($0,3 \pm 0,04$ vs $1,2 \pm 0,2$ nmoles/mg protéines; $p < 0,05$). Alors que pour la dose de 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, il y a une augmentation significative qui commence après 24h ($2,9 \pm 0,2$ nmoles/mg protéines; $p < 0,001$), qui perdure après 48h ($3,0 \pm 0,3$ nmoles/mg protéines; $p < 0,001$), 5j ($2,8 \pm 0,3$ nmoles/mg protéines; $p < 0,001$) et 15j ($2,1 \pm 0,3$ nmoles/mg protéines; $p < 0,05$). Vers le 30^{ème} jour, ce taux regagne la valeur basale (Figure 30).

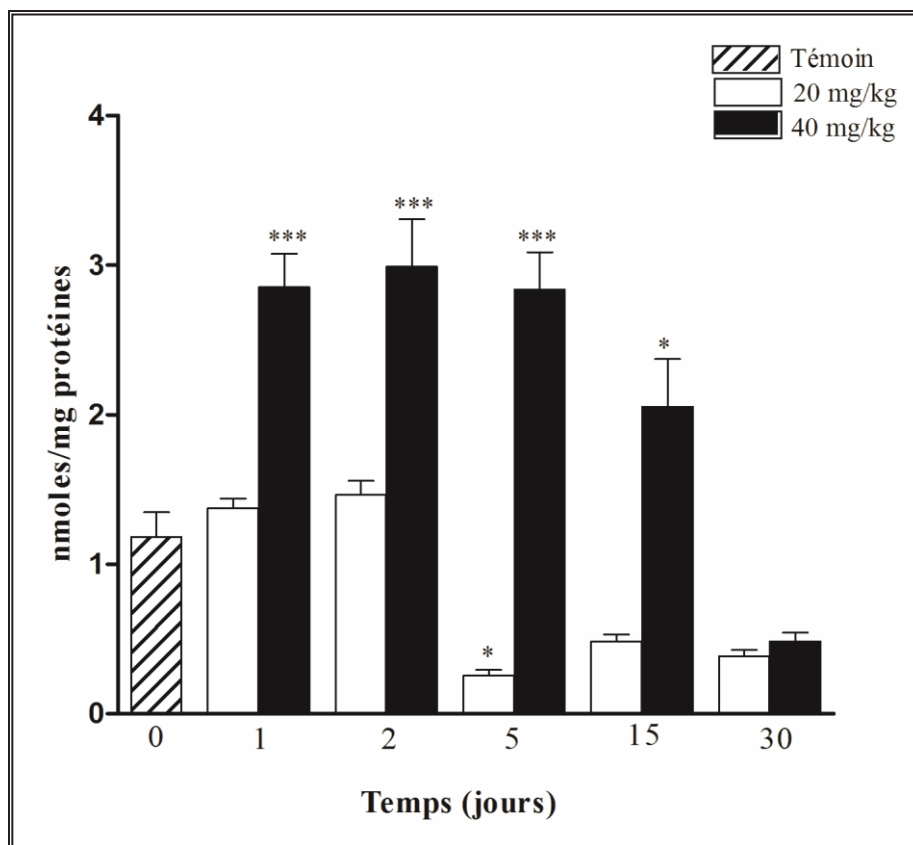


Figure 30 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le taux de la peroxydation lipidique hépatique.

La méthode se base sur le dosage du malonedialdéhyde, l'un des produits finaux de la peroxydation lipidique. Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

2. 5. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le taux des groupements sulfhydriles non protéiques hépatiques

La concentration des groupements sulfhydriles non protéiques diminue significativement par rapport au témoin après 5 ($0,009 \pm 0,0007 \mu\text{mol/g}$ vs $0,02 \pm 0,002 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,01$), 15 ($0,01 \pm 0,0008 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,05$) et 30 jours ($0,007 \pm 0,0006 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,001$) de traitement avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$. Alors qu'après traitement avec 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on note une diminution significative après 48h ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,01$).

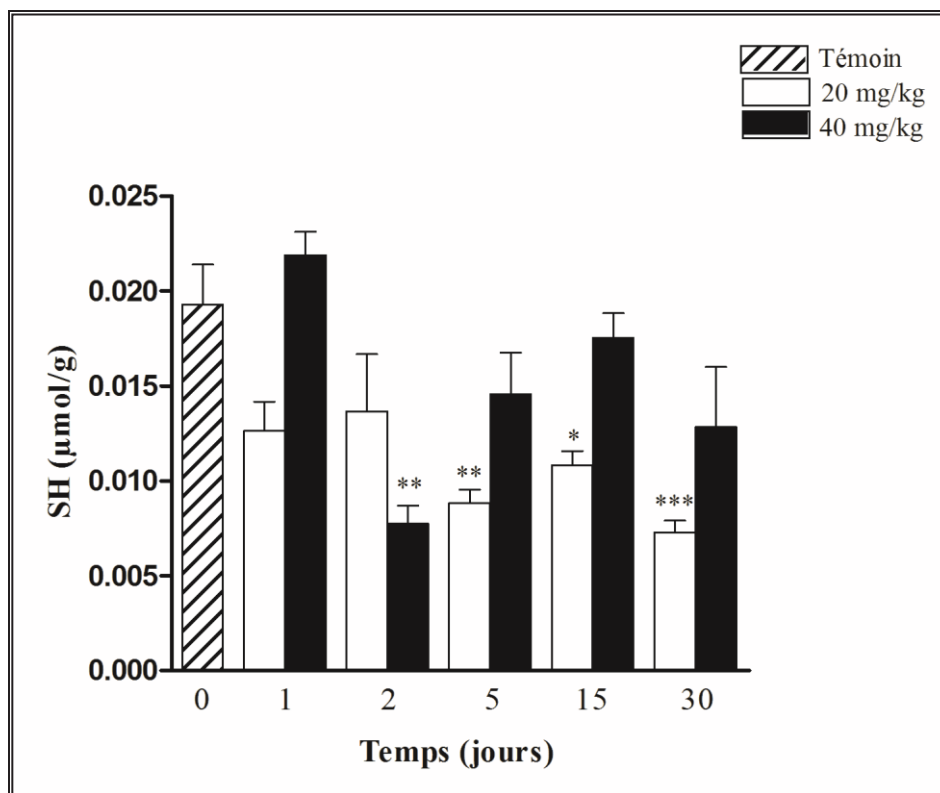


Figure 31 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le taux du sulfhydryle hépatique.

Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

3. Evaluation biochimique de l'atteinte hépatique après exposition aux nanoparticules oxyde de fer

L'activité de l'alanine amino transférase (ALAT) n'est pas affectée pour les deux doses administrées. Alors que l'activité de l'aspartate amino transférase (ASAT), réagit presque de la même façon pour les deux doses administrées, avec l'apparition d'un pic à 5j pour la dose de 20mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ ($16,3 \pm 1,6$ U/L; $p<0,05$) ainsi que pour la dose 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ ($17,7 \pm 0,8$ U/L; $p<0,001$) par rapport au témoin ($11,8 \pm 1,2$ U/L). Après 15j et 30j on note un retour à la valeur de base. L'activité du lactate déshydrogénase (LDH) s'élève après 5 jours d'exposition à la dose de 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ ($58,0 \pm 0,9$ vs $35,6 \pm 3,0$ UL/L; $p<0,001$) puis regagne la valeur basale à partir du 15^{ème} jour (Tableau 9).

Tableau 9 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la LDH et des transaminases hépatiques

	20mg/kg						40mg/kg					
	0h	24h	48h	5j	15j	30j	0h	24h	48h	5j	15j	30j
ALAT (U/L)	11,3 ± 1,1	11,0 ± 1,1	10,2 ± 0,8	12,7 ± 1,8	14,7 ± 1,4	10,4 ± 1,1	11,3 ± 1,1	11,3 ± 1,1	11,4 ± 0,9	11,7 ± 1,1	11,5 ± 1,0	13,3 ± 0,6
ASAT (U/L)	11,8 ± 1,2	11,5 ± 0,6	9,5 ± 0,4	16,3 ± 1,6*	11,4 ± 0,4	10,9 ± 1,1	11,8 ± 1,2	14,3 ± 0,7	12,2 ± 1,2	17,7 ± 0,8***	9,7 ± 0,6	9,1 ± 0,6
LDH (UL/L)	35,6 ± 3,0	38,2 ± 4,6	36,4 ± 2,6	49,1 ± 5,4	42,2 ± 4,2	44,7 ± 2,5	35,6 ± 3,0	36,4 ± 2,1	42,7 ± 3,5	58,0 ± 0,9***	37,8 ± 2,3	48,6 ± 2,8

Chaque valeur représente la moyenne de 7 déterminations accompagnée de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les rats reçoivent un gavage unique de nanoparticules de 20 et 40 mg Fe_3O_4 /kg et sont sacrifiés après 24h, 48h, 5j, 15j et 30jours. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

4. Effet de l'exposition orale aigue aux nanoparticules oxyde de fer sur l'architecture Hépatique

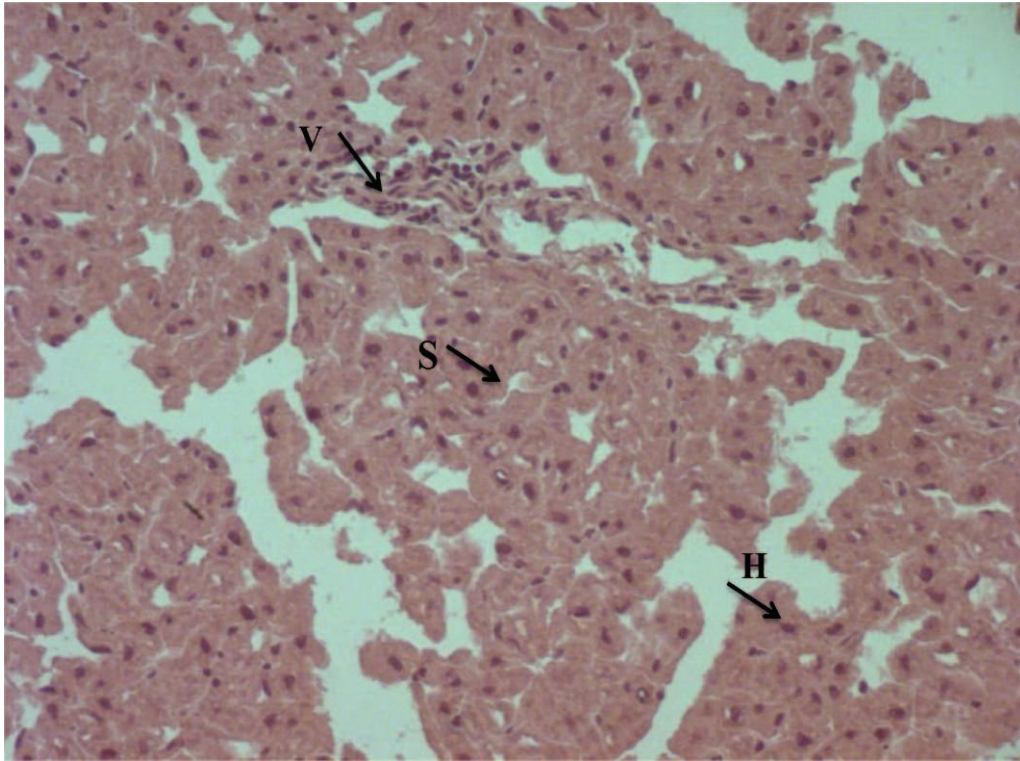


Figure 32 : Architecture microscopique du foie témoin (X400)

H : hépatocyte ; S : sinusöide hépatique ; V : veine

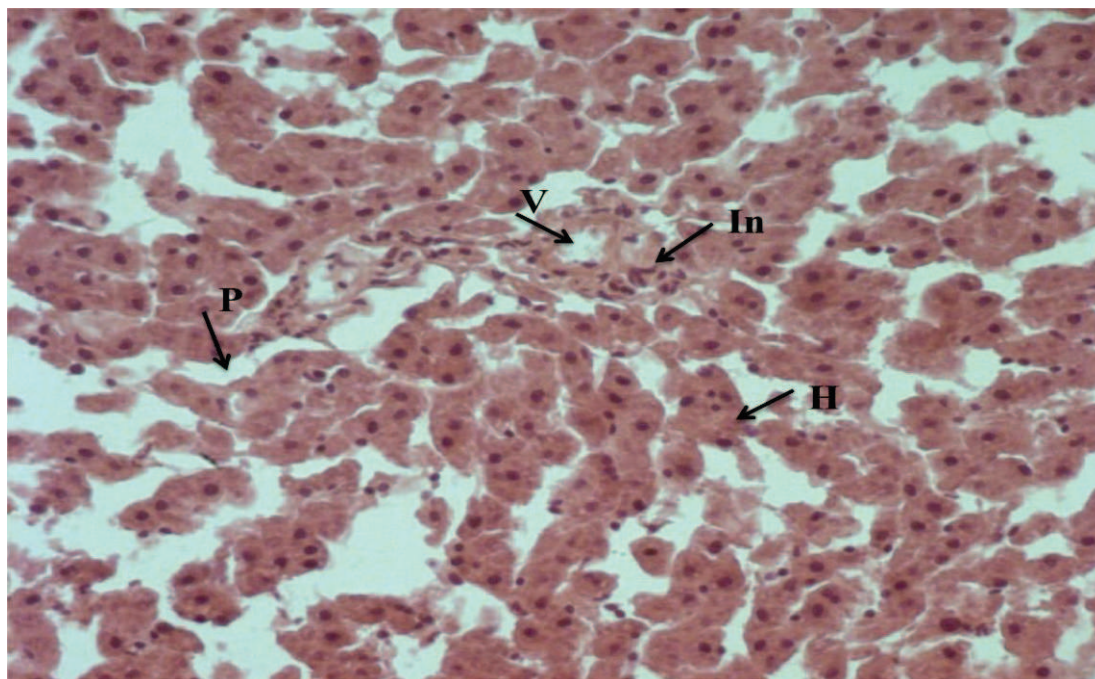


Figure 33 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 24h (X400)

In : infiltration inflammatoire; P : perte des jonctions intercellulaire ; N : nécrose ; H : hépatocyte ; V : veine

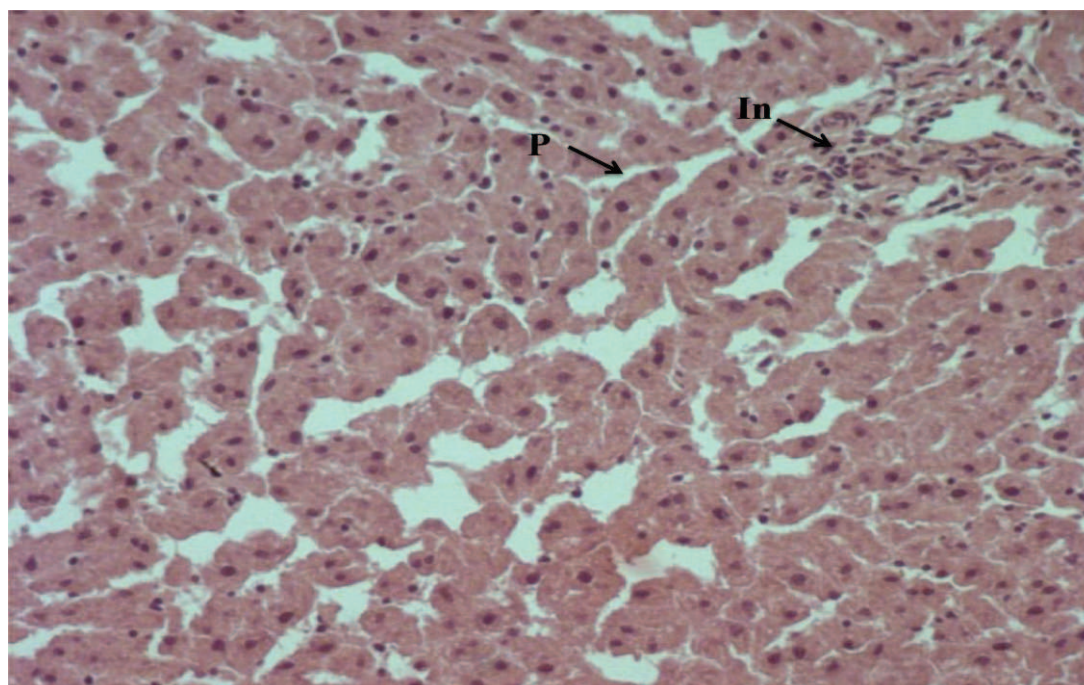


Figure 34 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 48h (X400)

In : infiltration inflammatoire ; P : perte des jonctions intercellulaire

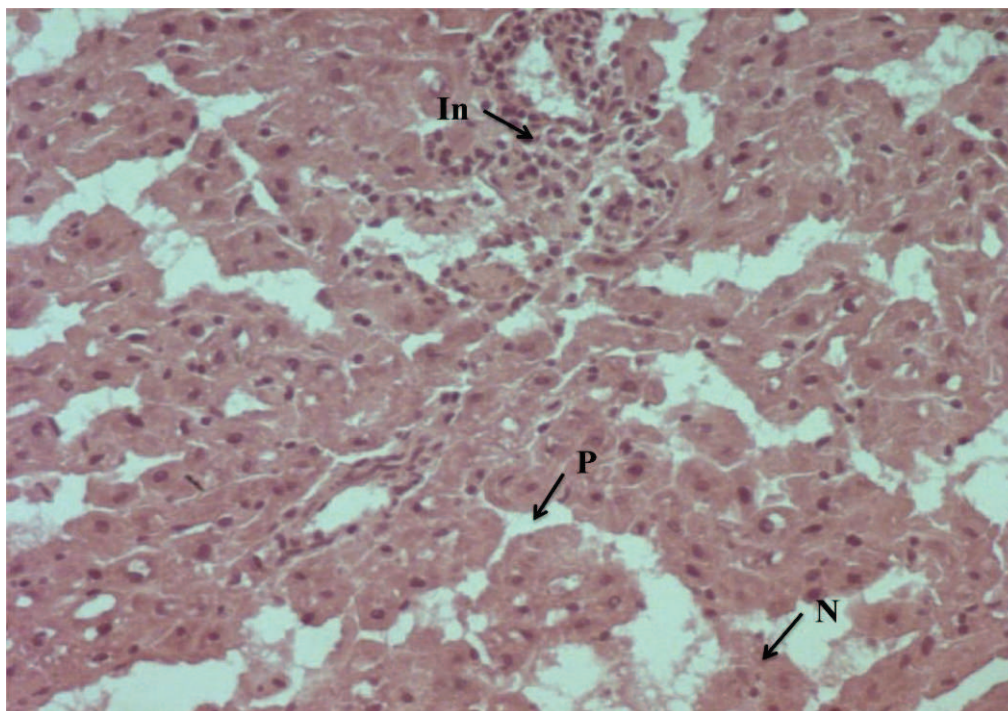


Figure 35 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 5 jours (X400)

In : infiltration inflammatoire ; P : perte des jonctions intercellulaire ; N : nécrose

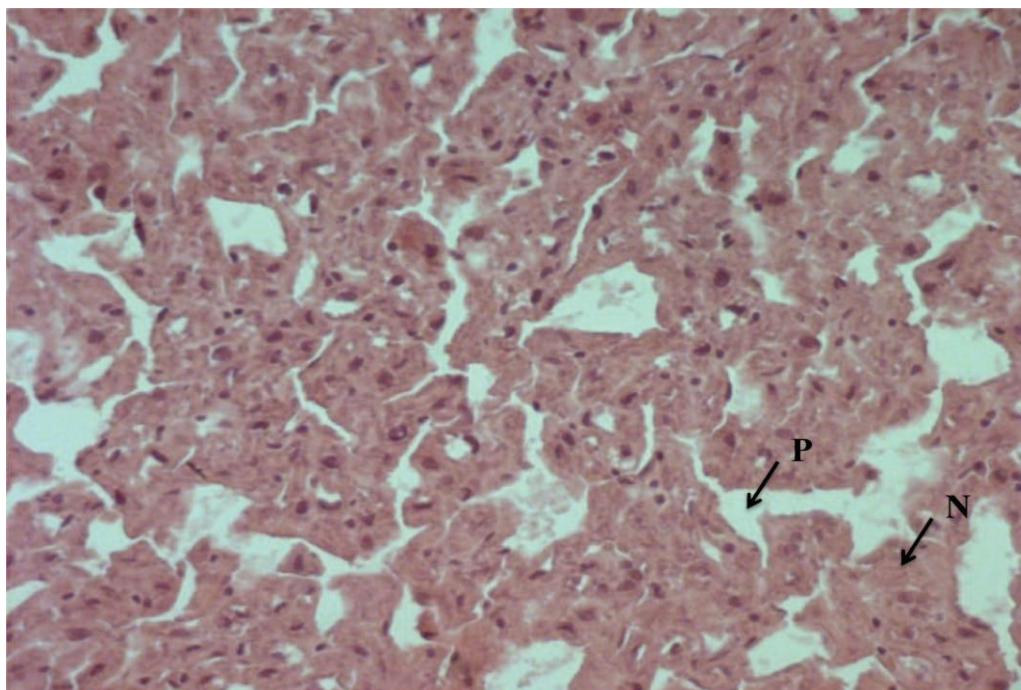


Figure 36 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 15 jours (X400)

P : perte des jonctions intercellulaire ; N : nécrose

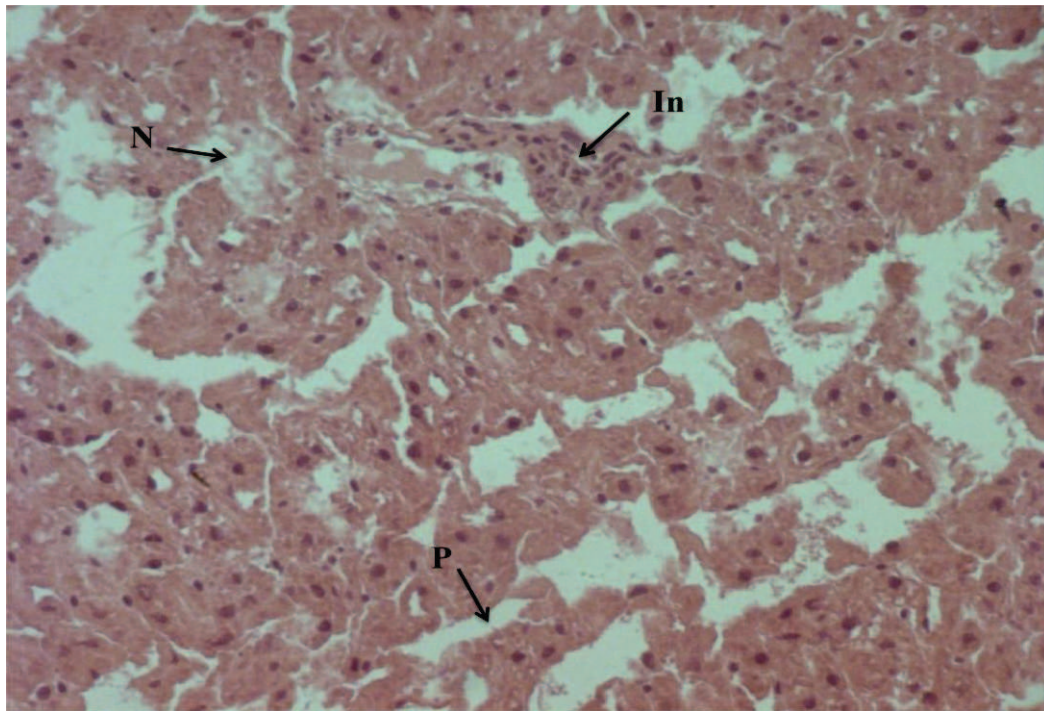


Figure 37 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 20 mg Fe_3O_4 /kg de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 30jours (X400)

In : infiltration inflammatoire ; P : perte des jonctions intercellulaire ; N : nécrose

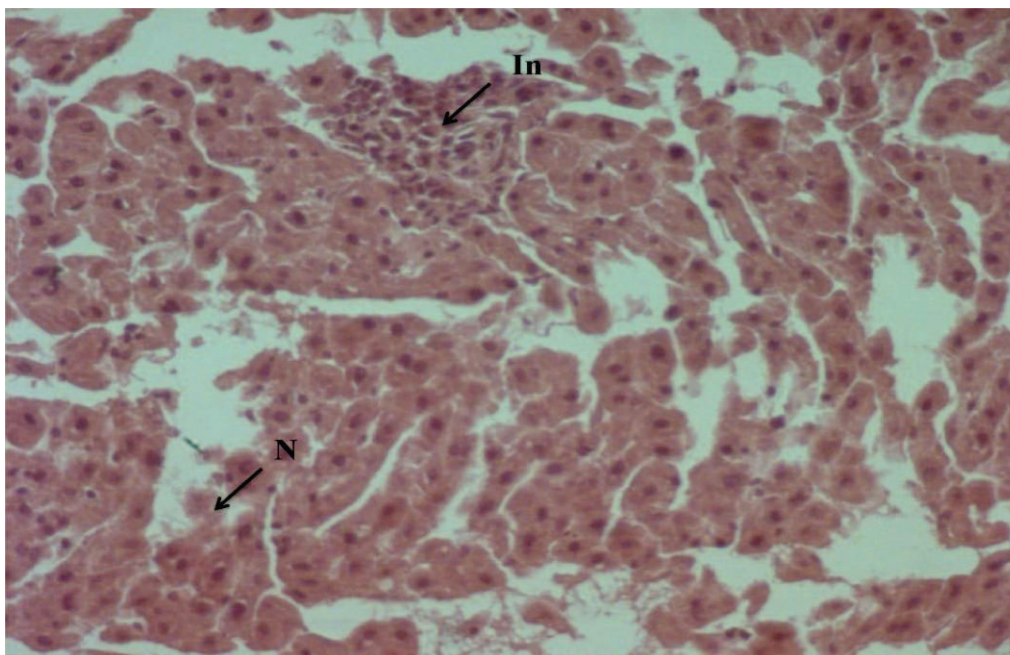


Figure 38 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 24h (X400)

In : infiltration inflammatoire ; N : nécrose

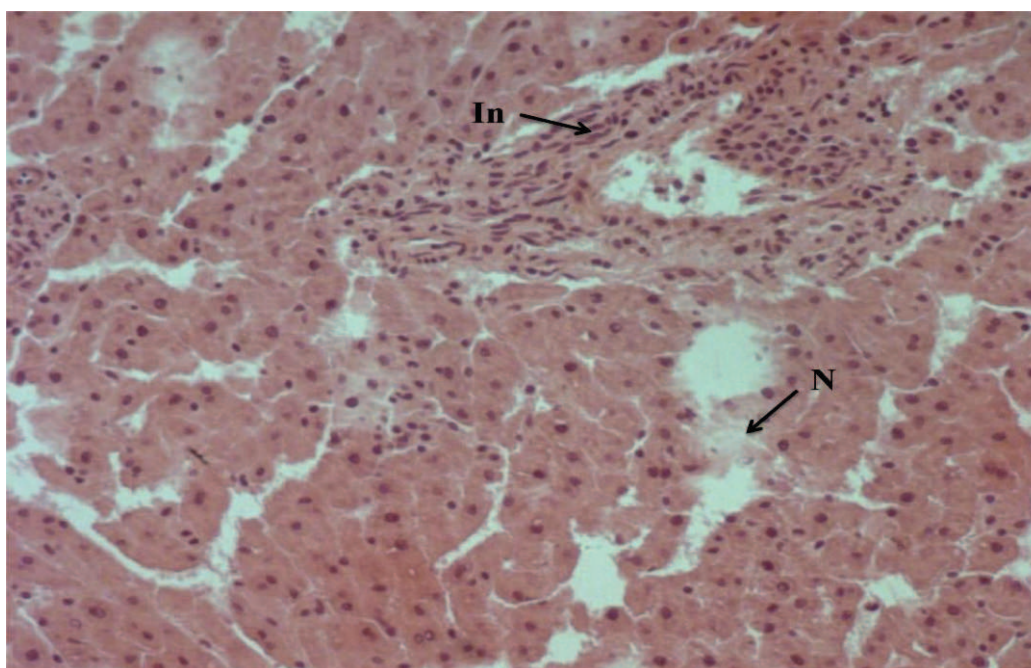


Figure 39 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 48h (X400)

In : infiltration inflammatoire; N : nécrose

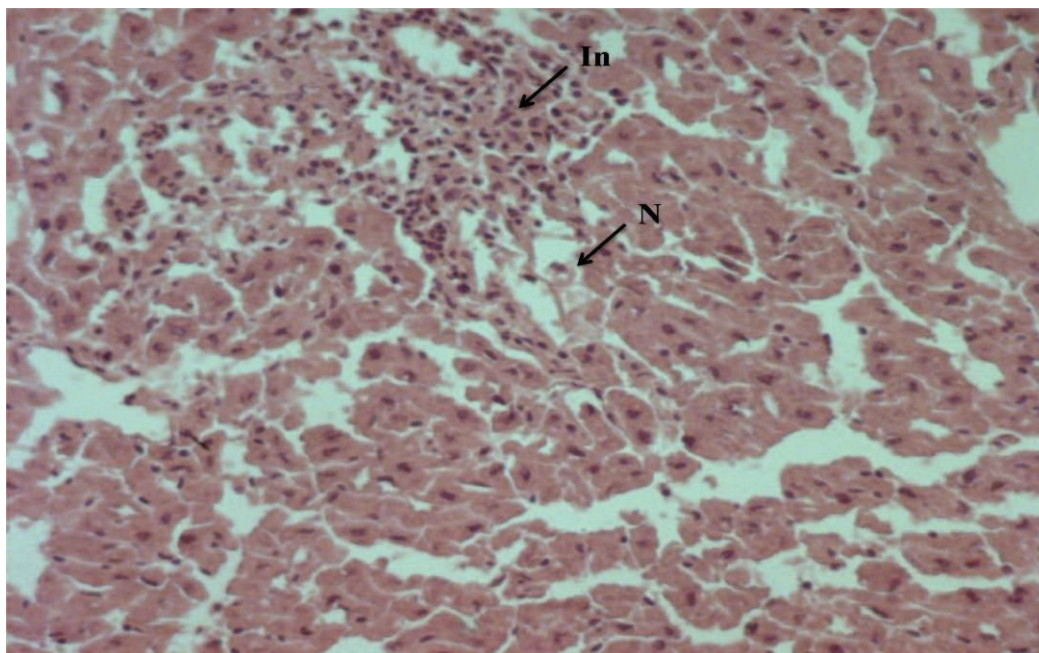


Figure 40 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 5 jours (X400)

In : infiltration inflammatoire ; P : perte des jonctions intercellulaire ; N : nécrose

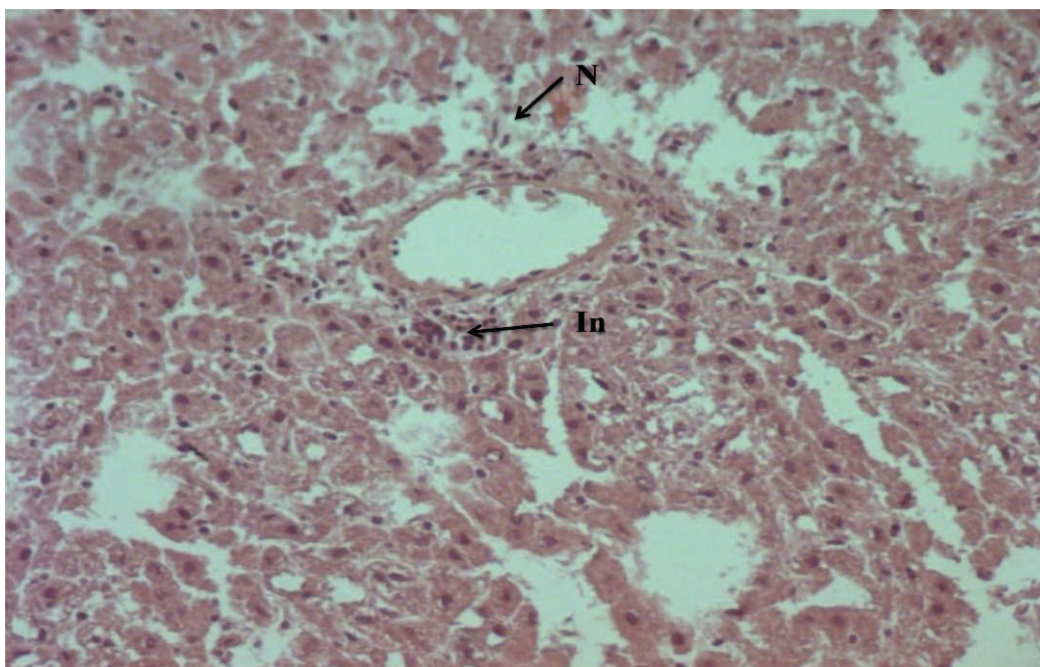


Figure 41 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 15 jours (X400)

In : infiltration inflammatoire ; N : nécrose

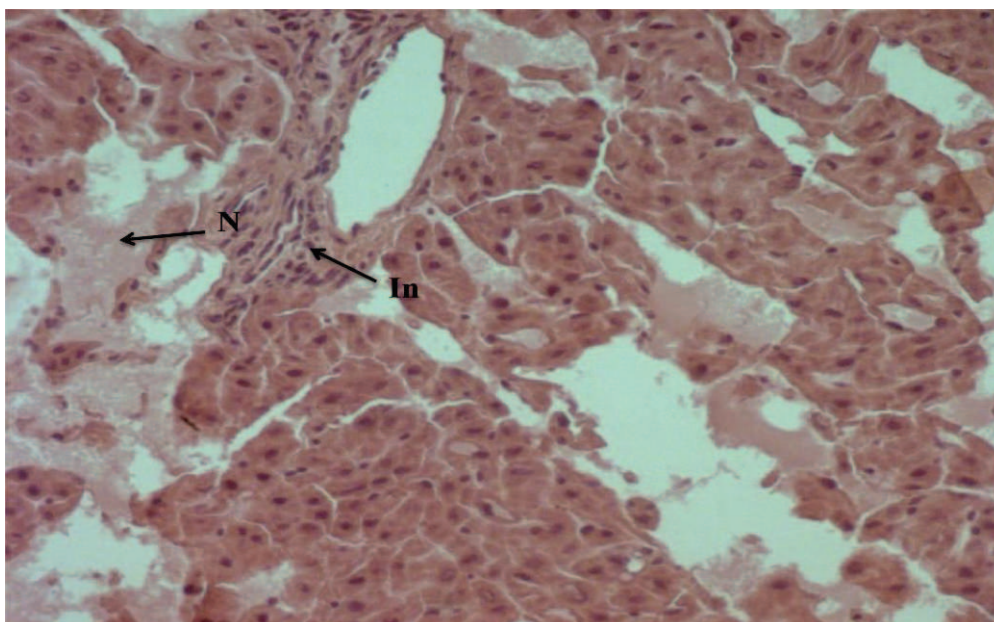


Figure 42 : Coupe histologique hépatique d'un rat traité avec 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ de nanoparticules d'oxyde de fer et sacrifié après 30 jours (X400)

In : infiltration inflammatoire ; N : nécrose

L'analyse histopathologique révèle que l'exposition aiguë aux nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une réponse inflammatoire périvasculaire au niveau du foie qui se traduit plus tardivement par l'apparition de figures nécrotiques dont l'intensité dépend de la dose administrée. En effet, chez les rats traités avec 20 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on note l'apparition d'infiltrations inflammatoires après 24h heures (Figure 33) de l'exposition et qui s'accroissent vers le 5^{ème} jour (Figure 35). L'apparition de microfoyers nécrotiques commence vers le 5^{ème} jour et s'accroît au bout de 30 jours (Figure 37). Pour les rats recevant 40 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on observe une inflammation vers 24 heures (Figure 38) qui atteint un pic vers 48 heures (Figure 39). On observe également une nécrose focale à partir de 24 heures qui devient zonale vers le 15^{ème} jour post-exposition (Figure 41).

CHAPITRE III

Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer *in vitro* :
Effet sur la respiration mitochondriale

Cette partie a fait l'objet d'un article « Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling » paru dans la revue «Toxicology In Vitro» 2013 Septembre ; 27(8): 2142-2148.

1. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est de déterminer si les nanoparticules d'oxyde de fer pourraient altérer la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau de cinq organes caractérisés par des capacités oxydatives différentes (cerveau, cœur, poumon, foie et rein) ainsi que le couplage mitochondrial.

2. Evaluation de la ligne de base des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein

L'activité de la capacité oxydative maximale, V_{max} (complexes I, III et IV) est plus élevée au niveau du cœur ($48,9 \pm 4,6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine) en comparaison avec celle des autres organes. Ainsi elle est de $27,0 \pm 2,5 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour le foie, $26,3 \pm 4,7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour le cerveau, $13,4 \pm 1,7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour le rein et $11,3 \pm 1,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour le poumon (Tableau 10). Alors que l'activité de la V_{succ} (complexes II, III et IV) est plus élevée au niveau du rein $54,5 \pm 4,8 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine suivie du cœur $53,9 \pm 4,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine, du cerveau $45,8 \pm 2,9 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine, du foie $33,4 \pm 2,0 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine et du poumon $53,9 \pm 4,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine (Tableau 10). L'activité de la V_{tmpd} (complexe IV) est la plus élevée au niveau du cœur $106,8 \pm 6,2 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine suivie du rein $88,2 \pm 8,1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine, du cerveau $84,7 \pm 3,6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine, du foie $42,2 \pm 2,2 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine et du poumon $24,0 \pm 2,1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine (Tableau 10).

Le couplage mitochondrial (ACR : V_{max}/V_0) qui représente le degré de couplage entre l'oxydation et la phosphorylation, montre dans le groupe témoin que le rein $1,7 \pm 0,2$ possède la valeur la plus basse par comparaison avec le cœur $4,5 \pm 0,4$, le foie $5,7 \pm 1,1$, les poumons $3,6 \pm 0,6$ et le cerveau $3,2 \pm 0,6$ (Tableau 11).

Tableau 10: Ligne de base des activités des complexes de la chaîne respiratoire au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein.

Témoin	Cerveau	Cœur	Poumon	Foie	Rein
<i>V_{max}</i> ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	26,3 $\pm$ 4,7 ^{###}	48,9 $\pm$ 4,6 ^{§§§£££***}	11,3 $\pm$ 1,3 ^{£££}	27,0 $\pm$ 2,5 ^{***}	13,4 $\pm$ 1,7
<i>V_{succ}</i> ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	45,8 $\pm$ 2,9 ^{§§§}	53,9 $\pm$ 4,3 ^{§§§££}	15,7 $\pm$ 2,0 ^{£££***}	33,4 $\pm$ 2,0 ^{**}	54,5 $\pm$ 4,8
<i>V_{tmpd}</i> ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	84,7 $\pm$ 3,6 ^{§§§£££££}	106,8 $\pm$ 6,2 ^{§§§£££££}	24,0 $\pm$ 2,1 ^{***}	42,2 $\pm$ 20,2 ^{***}	88,2 $\pm$ 8,1

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ vs Cœur. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ vs Poumon. £ $p < 0.05$; ££ $p < 0.01$; £££ $p < 0.001$ vs Foie. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs Rein.

Tableau 11: Le couplage mitochondrial : les valeurs de base et les réponses aux différentes concentrations de nanoparticules 100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ au niveau du cerveau, cœur, poumon, foie et rein.

ACR	Cerveau	Cœur	Poumon	Foie	Rein
Contrôle	3,2 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,4 [*]	3,6 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 1,1 ^{***}	1,7 $\pm$ 0,2
100 $\mu\text{g/ml}$	3,2 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,5 ^{**}	3,0 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,9 ^{**}	1,7 $\pm$ 0,2
200 $\mu\text{g/ml}$	3,2 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 2,3	1,4 $\pm$ 0,2
300 $\mu\text{g/ml}$	3,9 $\pm$ 1,0	5,1 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 1,3	5,6 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 0,1
500 $\mu\text{g/ml}$	3,2 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,8 [*]	3,1 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,3

Le couplage mitochondrial (ACR: V_{max}/V_0). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs Rein.

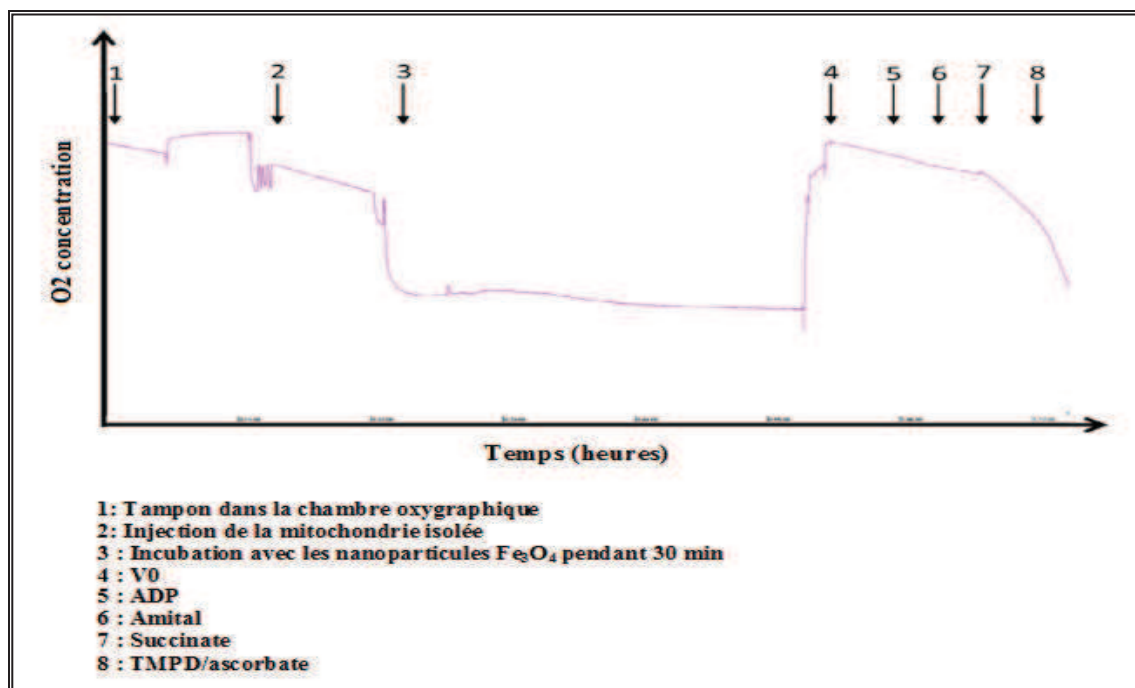


Figure 43 : Tracé oxygraphique représentatif avec les nanoparticules et les principaux substrats mitochondriaux.

3. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe_3O_4) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cerveau

Le traitement des nanoparticules de Fe_3O_4 à des différentes concentrations (100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g/ml}$) n'altère aucun des complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries isolées du cerveau (Figure 44).

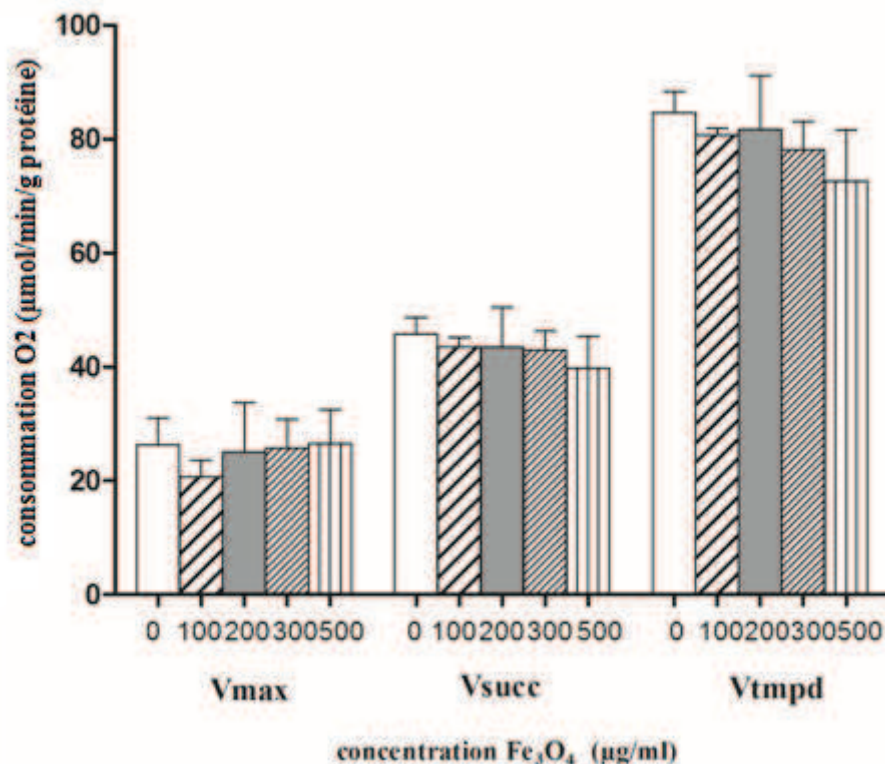


Figure 44 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du cerveau.

Vmax représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

Vsucc représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

Vtmpd représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

4. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe_3O_4) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cœur

Le traitement des nanoparticules de Fe_3O_4 à des différentes concentrations (100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g/ml}$) n'altère pas la fonction mitochondriale. Cependant, il y a une différence significative au niveau du complexe Vtmpd entre la concentration 200 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ ($118,1 \pm 11,0 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protéine}$) et la concentration 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ ($84,3 \pm 8,3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protéine}$; $p < 0,05$) sans qu'il ait de différences significatives par rapport au témoin (Figure 45).

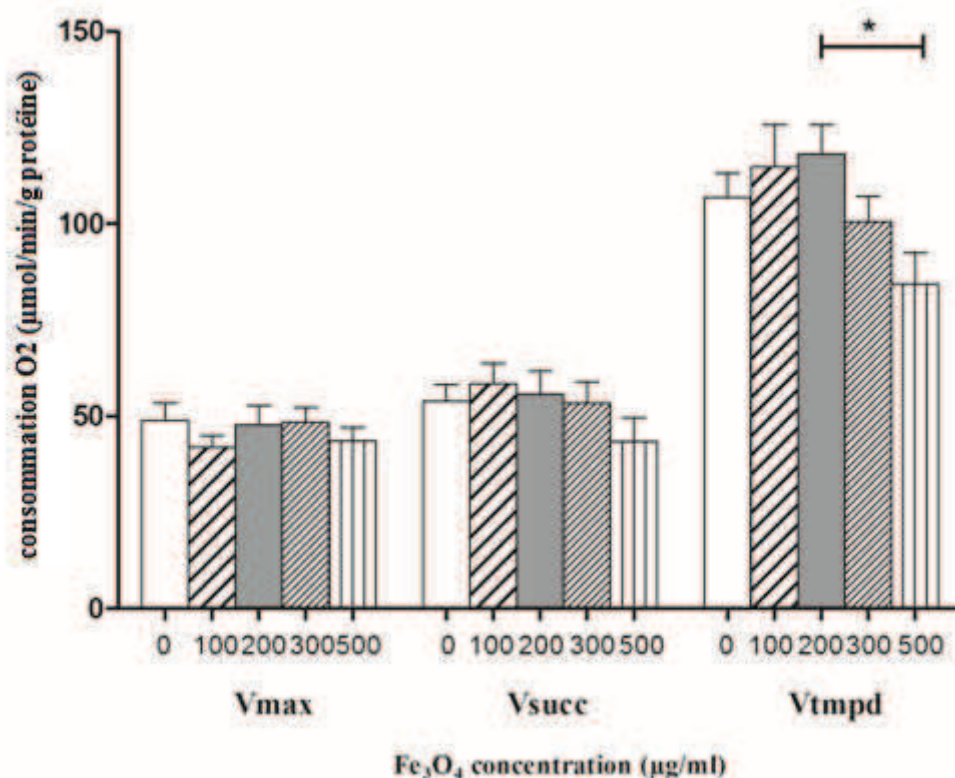


Figure 45 : Effet des nanoparticules de Fe₃O₄ sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du cœur.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). * $p < 0,05$ Fe₃O₄ (200 μg/ml) vs Fe₃O₄ (500 μg/ml).

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

5. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe₃O₄) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du poumon

Le traitement des nanoparticules de Fe₃O₄ aux différentes concentrations (100, 200, 300 et 500 μg Fe₃O₄/ml) ne montre aucune altération au niveau des complexes V_{max} ($10,66 \pm 1,68$ vs $11,25 \pm 1,27$ μmolO₂/min/g protéine; $p > 0,05$) et V_{succ} ($15,23 \pm 2,85$ vs $15,68 \pm 1,96$ μmolO₂/min/g protéine; $p > 0,05$) sauf au niveau du complexe V_{tmpd} où on remarque une diminution significative entre les mitochondries exposées à 100 μg Fe₃O₄/ml ($33,35 \pm 1,84$ μmolO₂/min/g protéine) et celles exposées à 500 μg Fe₃O₄/ml ($22,8 \pm 2,62$ μmolO₂/min/g protéine; $p < 0,05$) (Figure 46).

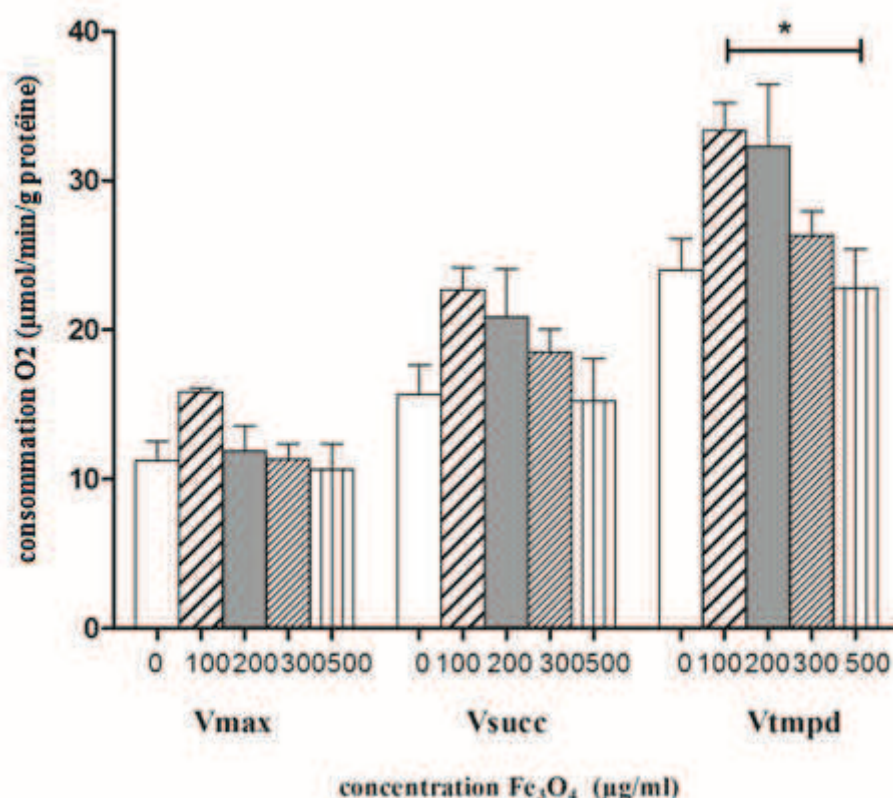


Figure 46 : Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du poumon.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). * $p < 0,05$ Fe_3O_4 (100 $\mu\text{g/ml}$) vs Fe_3O_4 (500 $\mu\text{g/ml}$).

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

6. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe_3O_4) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du rein

Après une exposition aux nanoparticules de Fe_3O_4 , on remarque que la respiration mitochondriale au niveau du rein n'est pas affectée. Ainsi, même à la plus forte concentration utilisée de nanoparticules (500 μg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$), V_{max} ($13,06 \pm 2,18$ vs $13,37 \pm 1,67$ $\mu\text{molO}_2/\text{min/g}$ protéine), V_{succ} ($47,06 \pm 5,11$ vs $54,48 \pm 4,78$ $\mu\text{molO}_2/\text{min/g}$ protéine) et V_{tmpd} ($66,78 \pm 6,62$ vs $88,23 \pm 8,05$ $\mu\text{molO}_2/\text{min/g}$ protéine) restent comparables aux témoins (Figure 47).

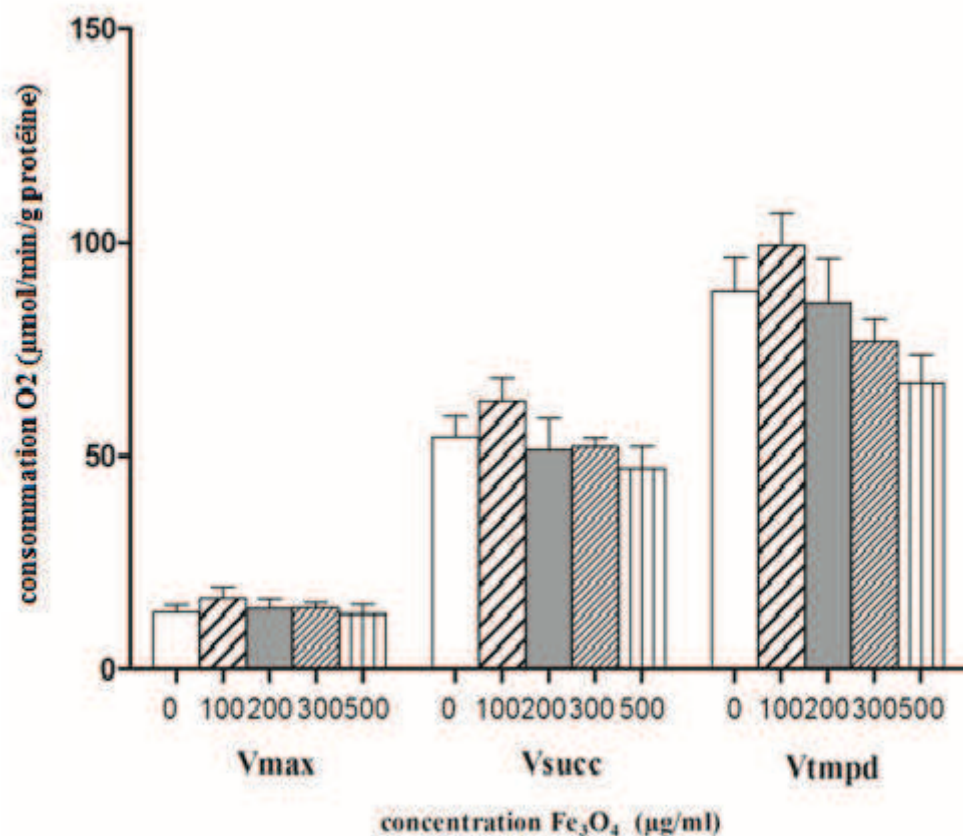


Figure 47: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du rein.

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

7. Effet des nanoparticules d'oxyde fer (Fe_3O_4) sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du foie

La chaîne respiratoire mitochondriale hépatique n'est pas altérée après exposition aux nanoparticules de Fe_3O_4 . Les valeurs des complexes V_{max} , V_{succ} et V_{tmpd} sont comparables à celles des valeurs basales (Figure 48).

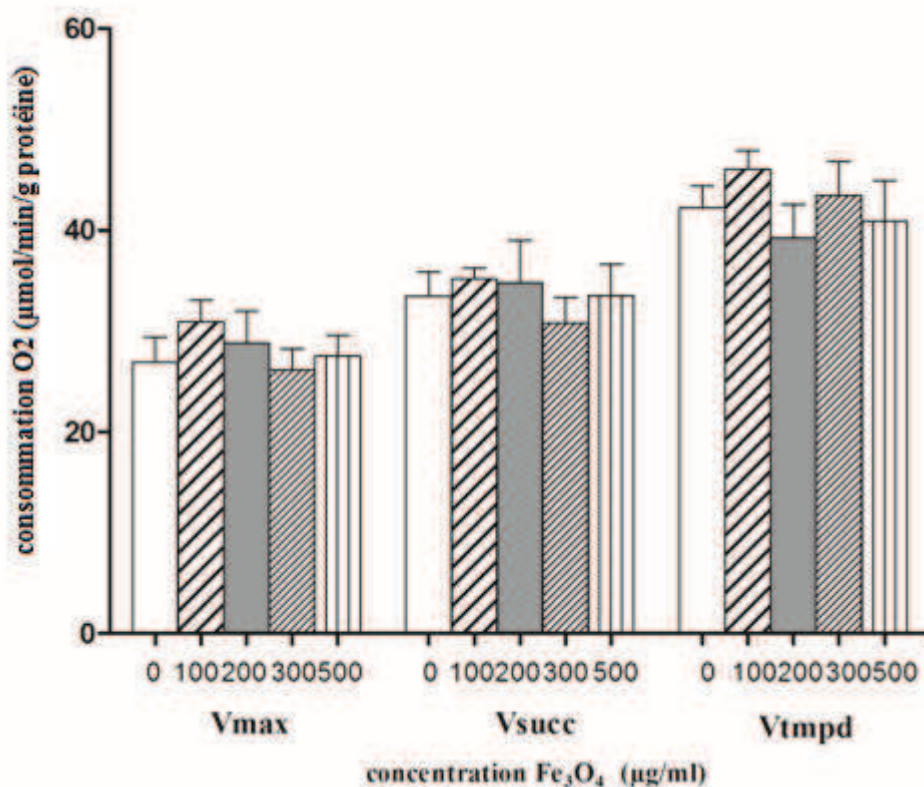


Figure 48: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale du foie.

Vmax représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

Vsucc représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

Vtmpd représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling

Yosra Baratli^{a,b}, Anne-Laure Charles^a, Valérie Wolff^a, Lotfi Ben Tahar^c, Leila Smiri^c, Jamal Bouitbir^a, Joffrey Zoll^{a,d}, François Piquard^{a,d}, Olfa Tebourbi^b, Mohsen Sakly^b, Hafedh Abdelmelek^b, Bernard Geny^{a,d,*}

^a Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle, EA 3072: Mitochondries, Stress oxydant et Protection musculaire, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France

^b Laboratoire de Physiologie Intégrée, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisia

^c Unité de recherche 99/UR12-30, Faculté des sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisia

^d Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, NHC, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2013

Accepted 9 September 2013

Available online xxxxx

Keywords:

Nanoparticles

Ironoxide

Mitochondria

Coupling

Mitochondrial respiratorychain

ABSTRACT

The present study evaluates the effects of iron oxide nanoparticles (ION) on mitochondrial respiratory chain complexes activities in five organs characterized by different oxidative capacities and strongly involved in body detoxification. Isolated mitochondria were extracted from brain, heart, lung, liver and kidneys in twelve Wistar rats (8 weeks) using differential centrifugations. Maximal oxidative capacities (V_{max}), mitochondrial respiratory chain complexes activity using succinate (V_{succ} , complexes II, III, and IV activities) or N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd)/ascorbate (V_{tmpd} , complex IV activity) and, mitochondrial coupling (V_{max}/V_o) were determined in controls and after exposure to 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fe_3O_4 . Data showed that baseline maximal oxidative capacities were 26.3 ± 4.7 , 48.9 ± 4.6 , 11.3 ± 1.3 , 27.0 ± 2.5 and 13.4 ± 1.7 $\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\text{g}$ protein in brain, heart, lung, liver, and kidneys mitochondria, respectively. Complexes II, III, and IV activities also significantly differed between the five organs. Interestingly, as compared to baseline values and in all tissues examined, exposure to ION did not alter mitochondrial respiratory chain complexes activities whatever the nanoparticles (NPs) concentration used. Thus, ION did not show any toxicity on mitochondrial coupling and respiratory chain complexes I, II, III, and IV activities in these five major organs.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

As a result of their unique physicochemical properties, nanoparticles are becoming present in sunscreens, toothpastes, sanitary ware coatings, and even food products. Currently, researchers are focusing on many areas such as applied physics and chemistry, mechanical and electrical engineering, nanotoxicology, nanobiology and nanomedicine, industrial applications and environmental investigations (Ferreira et al., 2012).

Exploring biomedical uses of nanomaterial, iron oxide nanoparticles (ION) are very interesting. They are used in cell labeling (Chen et al., 2010), drug targeting (Alexiou et al., 2005), gene delivery (McBain et al., 2008), biosensors, hyperthermia therapy and as contrast agents in magnetic resonance imaging (Puppi et al., 2011; Rumenapp et al., 2012).

However, their biological reactivity can be enhanced and can lead to potential toxic interactions. Thus, (Zhu et al., 2010) demonstrated that superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) generate injuries in endothelial cells and might play a key role in downstream cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension and myocardial infarction. Owing to their ultra-fine sizes, ION can elicit a spectrum of tissue responses including cell activation, generation of reactive oxygen species (ROS), and cell death (Wilson et al., 2002; Zhu et al., 2011).

Abbreviations: NPs, nanoparticles; ION, iron oxide nanoparticles; V_{max} , maximal oxidative capacities; V_{succ} , complexes II, III and IV activities; V_{tmpd} , complex IV activity; DEG, diethyleneglycol; ACR, acceptor control ratio.

* Corresponding author at: Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle, EA 3072: Mitochondries, Stress oxydant et Protection musculaire, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France. Tel.: +33 369550879; fax: +33 369551826.

E-mail address: bernard.geny@chru-strasbourg.fr (B. Geny).

0887-2333/\$ - see front matter © 2013 Published by Elsevier Ltd.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.09.006>

Please cite this article in press as: Baratli, Y., et al. Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling. *Toxicol. in Vitro* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.09.006>

Mitochondria are a main source of ATP production and are particularly involved in the balance between cell survival and cell death. Thus, most cellular energy is obtained through oxidative phosphorylation, a process requiring the action of a set of respiratory enzyme complexes located in the inner mitochondrial membrane, it appears mandatory to study the activities of the different mitochondrial respiratory chain complexes (Horn et al., 2008).

Accordingly, mitochondrial dysfunctions appear as early signs of cells damage in several experimental settings (Charles et al., 2011; Duteil et al., 2010) but mitochondrial implication in ION toxicity remains poorly known and controversial. Indeed, previous studies demonstrated either no mitochondrial damage (Jeng and Swanson, 2006; Xu et al., 2010) or mitochondrial ultrastructural disorganization (Yurchenko et al., 2010; Zhu et al., 2010). Particularly, reports indicated that ION were mainly found in the cytoplasmic vesicles, with no localization in the endoplasmic reticulum, mitochondria and nucleus (Xu et al., 2010). However, even if ION are not localized into mitochondria, these NPs might induce mitochondrial damage. Au et al. (2007) reported that addition of Fe₃O₄ nanoparticles in mature astrocytes induced mitochondrial uncoupling but did not alter cell membrane integrity. Zhu et al. (2010) demonstrated that Fe₃O₄ nanoparticles could generate loss of mitochondria membrane potential. (Karlsson et al., 2008) have shown that subway particles that are composed of a high percentage of magnetite (Fe₃O₄) can cause genotoxicity via mitochondrial depolarisation. Zhu et al. (2011) reported that ION could transfer across the human aortic endothelial cells membrane, localize into vesicles compartments and result in mitochondrial swelling and disappearance of mitochondria.

The deleterious effects of ION are linked to NPs ability to generate oxidative stress. Transition metal nanoparticles like iron may generate ROS (in particular hydroxyl radicals) by acting as catalysts in Fenton-type reactions (Risom et al., 2005). Since besides generating ATP, mitochondria are also a major source of intracellular ROS production, it appeared interesting to investigate mitochondrial respiratory chain complexes activities. Further, one might suppose that difference in oxidative capacities might participate in tissue specificity of NPs deleterious effects. Indeed, (Mahmoudi et al., 2011) recently demonstrated that ION did not produced significant changes on the actin cytoskeleton of heart cells but severely disrupted the actin cytoskeleton in kidneys and brain cells. Such tissue specificity might be related to different detoxification approaches used by the cells for toleration/fight against NPs but, specific oxidative capacities might have played a role. Accordingly, tissue with high oxidative capacity demonstrated reduced ROS production and might be protected against ischemia-reperfusion or statin-related increase in oxidative stress, as compared to tissue with low oxidative capacity (Anderson and Neuffer, 2006; Bouitbir et al., 2012; Chan et al., 2004).

The aim of this study was therefore to determine, for the first time, whether Fe₃O₄ nanoparticles might impair mitochondrial respiratory chain in five organs characterized by different oxidative capacities and strongly involved in body detoxification. Thus, we submitted isolated mitochondria harvested from brain, heart, lung, liver and kidneys to different concentrations of Fe₃O₄ nanoparticles (100, 200, 300 and 500 µg/ml) and determined mitochondrial coupling and respiratory chain complexes I, II, III, and IV activities. Indeed, Karlsson et al., 2008 demonstrated that the toxicity of bare iron oxide NPS was absent or very low for human lung epithelial cell line up to concentrations of 100 µg/ml. Jeng and Swanson, 2006 demonstrated that Fe₃O₄ had no measurable effect on the cells until the concentrations reached more than 200 µg/ml and Hussain et al., 2005 showed that Fe₃O₄ had no measurable effect at lower doses (10–50 µg/ml) while there was a significant effect at higher levels (100–250 µg/ml).

2. Material and methods

2.1. Material and reagents

Iron oxide nanoparticles were acquired from unit of research99/UR12-30, Faculty of science of Bizerte, Tunisia. They were prepared by the polyol process starting from Iron (II) acetate as metal precursor, diethylene glycol (hereafter abbreviated to as DEG) as solvent, purchased from ACROS Organics. All chemicals were used as received without further purification. Deionized water was used in these preparations. For the synthesis of the magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles, an appropriate amount of Iron (II) acetate precursor was added to a given volume (125 mL) of DEG to reach nominal iron cations concentration of 0.2 M. The mixture was then refluxed at a rate of +6 °C min⁻¹ under mechanical stirring up to boiling point, and then maintained at this temperature for about 2 h. The powders were washed several times with ethanol, then with acetone under ultrasonication with intermittent centrifugation and then dried in air at 50 °C. This iron oxide Fe₃O₄ (magnetite) could be preliminarily distinguished by its black color and their magnetic response when subjected to a permanent magnet.

2.2. Nanoparticle characterization using transmission electron microscopy (TEM)

The size and shape of prepared particles were analyzed on a JEOL-100-CX II Transmission Electron Microscope (TEM) operating at 100 kV equipped with an energy dispersive spectrometer (EDX) (Basti et al., 2010).

2.3. Animals

Twelve male Wistar rats weighing 300–400 g (age 8 weeks) were housed in a thermo-neutral environment (22 ± 2 °C), on a 12:12 h photoperiod, and were provided food and water *ad libitum*. This investigation was carried out in accordance with the Helsinki accords for human treatment of animals during experimentation.

Rats were submitted to general anesthesia with 3% isoflurane and oxygen (1 L/min) in an induction chamber (Minerve, Esternay, France). Anesthesia was maintained with 1.5% isoflurane and 1 L/min oxygen at under spontaneous ventilation. Organs (brain, heart, lung, liver, and kidneys) were excised and cleaned and then immediately used for the study of respiratory parameters (Kindo et al., 2012).

2.4. Extraction of mitochondria

All operations were carried on ice. A piece of tissue was placed into buffer A containing 50 mM tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.40 at +4 °C. Tissues were finely minced with scissors, placed in buffer A and homogenized with a Potter–Elvehjem. Then, the homogenate was centrifuged at 1300g for 3 min, 4 °C. The supernatant was centrifuged at 10,000g for 10 min, 4 °C to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, pH 7.4 at +4 °C. Protein content was routinely assayed with a bradford assay using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

2.5. Exposure of mitochondria to nanoparticles

The iron oxide nanoparticles were mixed with a solution of NaCl 9‰. The mixture was then stirred vigorously and sonicated for 60 min to break up aggregates. Particle suspensions were vortexed immediately before each use. Before measurement, 3 ml of solu-

Table 1

Number of independent analysis of mitochondrial respiratory chain complexes activities (V_{max} , V_{succ} and V_{tmpd}) without or with 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$ iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in brain, heart, lung, liver and kidney.

Mitochondrial respiratory chain complexes					
	Control	100 ($\mu\text{g/ml}$)	200 ($\mu\text{g/ml}$)	300 ($\mu\text{g/ml}$)	500 ($\mu\text{g/ml}$)
Brain	9	6	6	8	6
Heart	12	8	9	10	8
Lung	10	6	6	7	7
Liver	10	7	6	8	6
Kidney	9	7	6	7	6

tion M containing 100 mM KCL, 50 mM Mops, 1 mM EGTA, 5 mM Kpi, 1 mg/ml defatted bovine serum albumin (BSA) was added to the oxygraph chambers for 10 min. Then, isolated mitochondria (0.30 mg for brain, heart, liver and kidneys), (0.50 mg for lung) were placed in the oxygraph chambers with 10 mM glutamate and 2.50 mM malate as substrates. The temperature was maintained at +25 °C. Isolated mitochondria of each organ were incubated with different concentrations of Fe_3O_4 (0, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$) during 30 min at +25 °C.

2.6. Measurement of the mitochondrial respiratory chain complexes activities and mitochondrial coupling

Maximal oxidative capacity (V_{max}) was measured by adding adenosine diphosphate (ADP). When V_{max} was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Complex I was blocked with amytal (0.02 mM) and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration in these conditions allowed determining complexes II, III, IV activities (V_{succ}). After that, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (tmpd, 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) were added as artificial electron donors to cytochrome c. In these conditions, the activity of cytochrome c oxydase (complex IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain (V_{tmpd}) (Zoll et al., 2006). The mitochondrial coupling (coupling of phosphorylation to oxidation) was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR), the ratio between ADP-stimulated respiration (V_{max}) over basal respiration (without ADP) with glutamate and malate as substrate (V_0).

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. A total of 570 independent analysis of mitochondrial respiration were performed. Each mean value was obtained from 6 to 12 original data arising from the specific organ of the 6–12 different animals involved. The number of analysis for V_{max} , V_{succ} and V_{tmpd} are presented in Table 1.

Statistical analyses were performed using one way ANOVA followed by a Tukeypost-test. (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance required a $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Nanoparticle characterization using transmission electron microscopy (TEM)

TEM imaging of Fe_3O_4 nanoparticles were performed to confirm primary particle size, obtain a size distribution, and to observe the general morphology of the particles (Fig. 1). The TEM image showed that the powders are constituted by roughly spherical almost nonagglomerated particles. In addition, about 250 particles have been counted for the average particle size and histogram determinations. The calculated average diameter was 9 nm with a SD of 1.6 nm.

3.2. Evaluation of the baseline brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities

The maximal oxidative capacities, V_{max} , reflecting complexes I, III, and IV activities was the highest in the heart ($48.9 \pm 4.6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) compared to other organs. Thus, V_{max} was lower in liver ($27.0 \pm 2.5 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), brain ($26.3 \pm 4.7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), kidneys ($13.4 \pm 1.7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and lung ($11.3 \pm 1.3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) (Table 2).

V_{succ} , reflecting complexes II, III and IV activities, was higher in kidneys ($54.5 \pm 4.8 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), than in heart ($53.9 \pm 4.3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), brain ($45.8 \pm 2.9 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), liver ($33.4 \pm 2.0 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and lung ($15.7 \pm 2.0 \mu\text{mol/min/g protein}$) (Table 2).

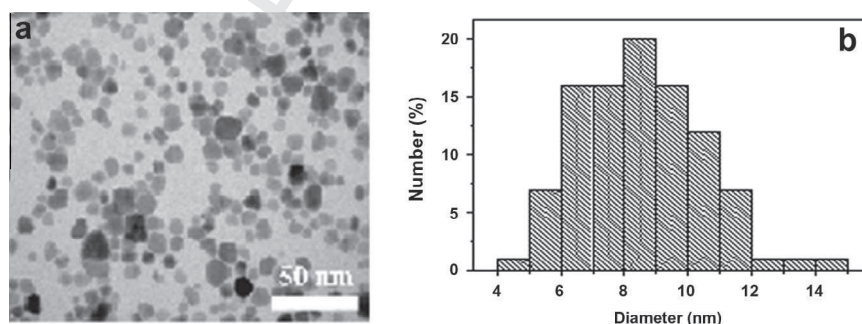


Fig. 1. TEM image (a) and size histogram (b) of the Fe_3O_4 nanoparticles.

Table 2

Baseline brain, heart, lung, liver and kidney mitochondrial respiratory chain complexes activities.

Control	Brain	Heart	Lung	Liver	Kidney
V_{max} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$)	$26.3 \pm 4.7^{###}$	$48.9 \pm 4.6^{§§§§§§}$	11.3 ± 1.3^{EEE}	$27.0 \pm 2.5^{***}$	13.4 ± 1.7
V_{succ} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$)	$45.8 \pm 2.9^{§§§}$	$53.9 \pm 4.3^{§§§§}$	$15.7 \pm 2.0^{E+***}$	$33.4 \pm 2.0^{**}$	54.5 ± 4.8
V_{tmpd} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$)	$84.7 \pm 3.6^{§§§§§§}$	$106.8 \pm 6.2^{§§§§§§}$	$24.0 \pm 2.1^{***}$	$42.2 \pm 20.2^{***}$	88.2 ± 8.1

Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). $^{\#}p < 0.05$; $^{##}p < 0.01$; $^{###}p < 0.001$ vs Heart. $^{\S}p < 0.05$; $^{\S\S}p < 0.01$; $^{\S\S\S}p < 0.001$ vs Lung. $^{\text{E}}p < 0.05$; $^{\text{EE}}p < 0.01$; $^{\text{EEE}}p < 0.001$ vs Liver. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ vs Kidney.

The *V_tmpd*, reflecting complex IV activity, showed elevated values in heart ($106.8 \pm 6.2 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) compared to other organs. *V_tmpd* was thus lower in kidneys ($88.2 \pm 8.1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), brain ($84.7 \pm 3.6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), liver ($42.2 \pm 2.2 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and lung ($24.0 \pm 2.1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) (Table 2).

The acceptor control ratio (*V_{max}/V₀*), representing the degree of coupling between oxidation and phosphorylation, in controls groups was lower in kidneys (1.7 ± 0.2) as compared to heart (4.5 ± 0.4) and liver (5.7 ± 1.1). Lung and brain ACRs were respectively 3.6 ± 0.6 and 3.2 ± 0.6 (Table 3).

Fig. 2 shows a representative oxygraphic trace with NPs and main mitochondrial substrates.

3.3. Effects of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities

All data are presented in Figs. 3–7.

Fig. 3 demonstrated that *V_{max}*, *V_{succ}* and *V_tmpd* were similar without or with exposure to Fe_3O_4 in brain isolated mitochondria.

Similarly, in isolated heart mitochondria, Fe_3O_4 treatment did not alter the mitochondrial function. Concerning the dose of $500 \mu\text{g/ml}$, *V_{max}* and *V_{succ}* (43.7 ± 3.4 vs 48.9 ± 4.6 and 43.4 ± 6.1 vs $53.9 \pm 4.3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) were not decreased as compared to controls. Similarly, *V_tmpd* was not decreased as compared to controls but, a significant difference was observed between Fe_3O_4 ($200 \mu\text{g/ml}$) ($118.1 \pm 11.0 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and Fe_3O_4 ($500 \mu\text{g/ml}$) ($84.3 \pm 8.3 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Table 3

Mitochondrial coupling: controls values and responses to 100, 200, 300 and $500 \mu\text{g/ml}$ iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in brain, heart, lung, liver and kidney.

ACR	Brain	Heart	Lung	Liver	Kidney
Control	3.2 ± 0.6	$4.5 \pm 0.4^*$	3.6 ± 0.6	$5.7 \pm 1.1^{***}$	1.7 ± 0.2
$100 \mu\text{g/ml}$	3.2 ± 0.5	$4.6 \pm 0.5^{**}$	3.0 ± 0.5	$5.0 \pm 0.9^{**}$	1.7 ± 0.2
$200 \mu\text{g/ml}$	3.2 ± 0.7	4.8 ± 0.5	3.4 ± 0.9	5.8 ± 2.3	1.4 ± 0.2
$300 \mu\text{g/ml}$	3.9 ± 1.0	5.1 ± 0.7	4.4 ± 1.3	5.6 ± 1.3	1.9 ± 0.1
$500 \mu\text{g/ml}$	3.2 ± 0.7	$4.7 \pm 0.8^*$	3.1 ± 0.6	3.3 ± 0.4	2.0 ± 0.3

acceptor control ratio (ACR: *V_{max}/V₀*). Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs Kidney.

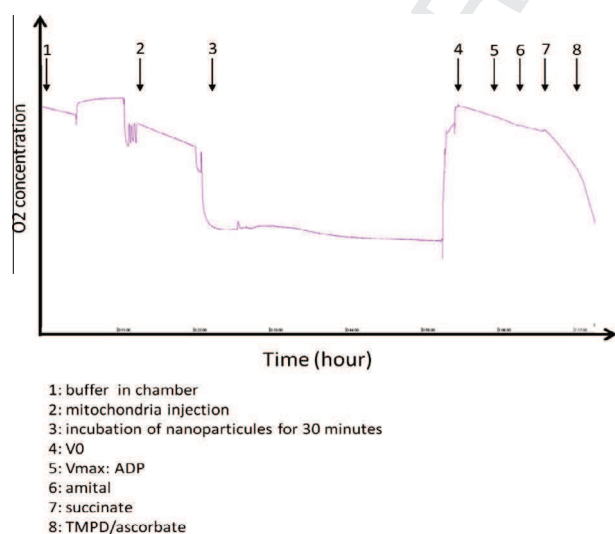


Fig. 2. Representative oxygraphic trace with NPs and main mitochondrial substrates.

In lung isolated mitochondria again, *V_{max}*, *V_{succ}* and *V_tmpd* were similar without or with exposure to Fe_3O_4 . Concerning the dose of $500 \mu\text{g/ml}$, *V_{max}* and *V_{succ}* (10.7 ± 1.7 vs 11.3 ± 1.3 and 15.2 ± 2.9 vs $15.7 \pm 2.0 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) were not decreased as compared to controls. Similarly, *V_tmpd* was not decreased as compared to controls but, a significant difference was observed between Fe_3O_4 ($100 \mu\text{g/ml}$) ($33.4 \pm 1.8 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and Fe_3O_4 ($500 \mu\text{g/ml}$) ($22.8 \pm 2.6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) ($p < 0.05$) (Fig. 5). Concerning liver isolated mitochondria, the mitochondrial respiratory function was not modified after Fe_3O_4 nanoparticles exposure. The *V_{max}*, *V_{succ}* and *V_tmpd* were similar to control values, whatever the ION concentrations used (Fig. 6).

Finally, in kidneys, mitochondrial respiratory function was not affected by exposure to ION. Thus, the high dose of Fe_3O_4 ($500 \mu\text{g/ml}$), *V_{max}* (13.1 ± 2.2 vs $13.4 \pm 1.7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$), *V_{succ}* (47.1 ± 5.1 vs $54.5 \pm 4.8 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) and the *V_tmpd* (66.8 ± 6.6 vs $88.2 \pm 8.1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g protein}$) remained unchanged compared to control values (Fig. 7).

Concerning the acceptor control ratio (ACR), similar results have been observed and thus, ION did not modified mitochondrial coupling whatever the dose used (Table 3).

Thus globally, whatever the Fe_3O_4 concentration used (from 100 to $500 \mu\text{g/ml}$), ION did not alter mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, and IV activities or mitochondrial coupling in these five main organs, as compared to control values.

4. Discussion

Several studies have shown that intravenously administrated ION can translocate from the blood circulation into various targeted tissues and organs (Corot et al., 2006; Shimada et al., 2006). Nanosized particles can also cross small intestine by per-sorption and distribute into blood, brain, lung, heart, spleen, liver, kidneys, intestine and stomach (Baroli et al., 2007; Hillyer and Albrecht, 2001; Kwon et al., 2008). Thus, many organs might be exposed through different pathways to potential deleterious effects of ION. Toxic effect of nano-sized complexes on cells depends on material from which they were composed, size, presence of surface reactive groups, concentration, and on cell histogenesis (Karlsson et al., 2009; L'Azou et al., 2008).

In the present study, isolated mitochondria of main organs supporting life and/or involved in detoxification process and characterized by a large span of oxidative capacity (brain, heart, lung, liver and kidneys) were incubated with different concentrations of ION (0 , 100 , 200 , 300 and $500 \mu\text{g/ml}$).

Our results are consistent with basal mitochondrial oxidative capacity previously reported. Thus a similar maximal oxidative capacity was observed in the brain, heart and liver (Ling et al., 2012), lung (Freyre-Fonseca et al., 2011) and kidneys (Satav and Katyare, 1982). Further and interestingly, we have demonstrated, for the first time that ION globally failed to impair either mitochondrial respiratory chain complexes activities or coupling in brain, heart, lung, liver and kidneys. Several factors, such as NPs sizes, concentrations, and duration of exposure deserve to be discussed.

NPs size might be important. We chose ION with magnetite (Fe_3O_4) core of 9 nm since ION are used as a remarkable contrast agent that has potential to enhance the evaluation of axillary lymph node metastases in patients with breast cancer (Harada et al., 2007). Li et al. (2012) demonstrated that thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles (TCL-SPION) with the same core size of our nanoparticles may be used as a new platform for tumor imaging and therapy monitoring. (Salnikov et al., 2007) demonstrated that the outer mitochondrial membrane was not permeable to 6-nm particles but 3 nm particles entered the mitochondrial intermembrane space in mitochondria of permeabilized cells and isolated cardiac mitochondria. Thus, our

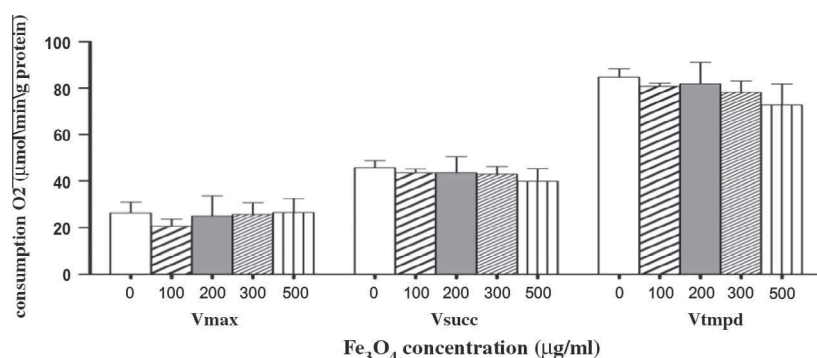
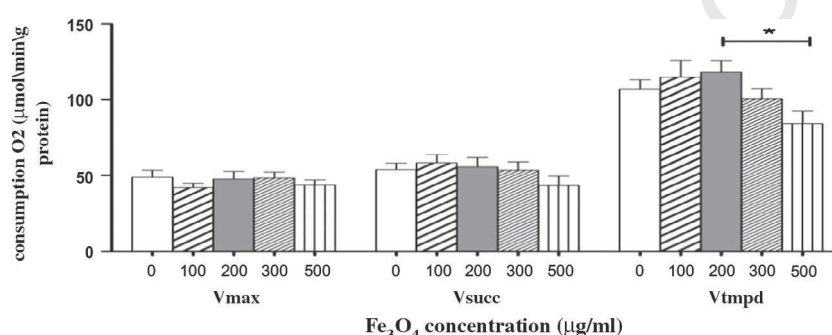
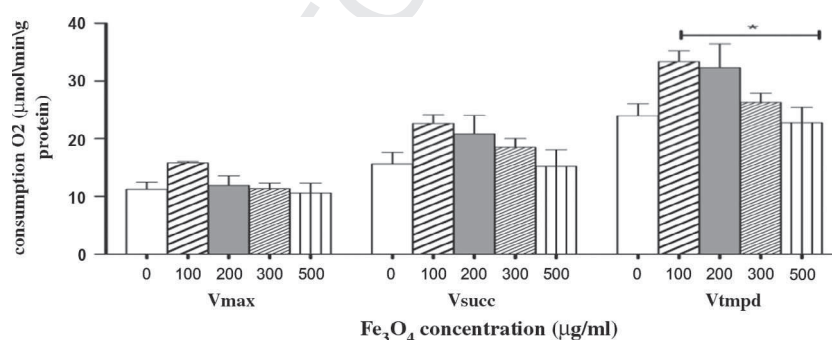


Fig. 3. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on brain liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. V_{max} reflects complexes I, III and I activities and is measured using glutamate and malate. V_{succ} reflects complexes II, III and IV activities and is measured using succinate. V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) and ascorbate as mitochondrial substrates.



Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). * $p < 0.05$ Fe_3O_4 (200 $\mu\text{g/ml}$) vs Fe_3O_4 (500 $\mu\text{g/ml}$).

Fig. 4. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on heart mitochondrial respiratory chain complexes activities. V_{max} reflects complexes I, III and IV activities and is measured using glutamate and malate. V_{succ} reflects complexes II, III and IV activities and is measured using succinate. V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) and ascorbate as mitochondrial substrates.



Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). * $p < 0.05$ Fe_3O_4 (100 $\mu\text{g/ml}$) vs Fe_3O_4 (500 $\mu\text{g/ml}$).

Fig. 5. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on lung mitochondrial respiratory chain complexes activities. V_{max} reflects complexes I, III and IV activities and is measured using glutamate and malate. V_{succ} reflects complexes II, III and IV activities and is measured using succinate. V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) and ascorbate as mitochondrial substrates.

9 nm ION might have been too big to penetrate isolated mitochondria. We cannot exclude such hypothesis, but as previously reported, NPs can demonstrate mitochondrial toxicity even if they cannot enter into mitochondria (Au et al., 2007).

It was demonstrated that the majority of nanosized complexes revealed their toxic effect on cells at concentrations ranging from 100 to 250 $\mu\text{g/ml}$ (Hussain et al., 2005; Jeng and Swanson, 2006). In the present work, we therefore took care to submit organ mitochondria to such a large span of NPs concentrations. We also exam-

ined a concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$, investigating whether a higher concentration might show more toxic effects. It was not the case and thus, concentrations might probably not explain a lack of NPs deleterious effects.

Concerning duration of exposure, (Buyukhatipoglu and Clyne, 2011) demonstrated that endothelial cell exposure to ION resulted in dose- and time-dependent intracellular ROS formation. ROS formation significantly increased up to an iron oxide concentration of 0.5–1.0 mg/mL and intracellular ROS increased significantly after

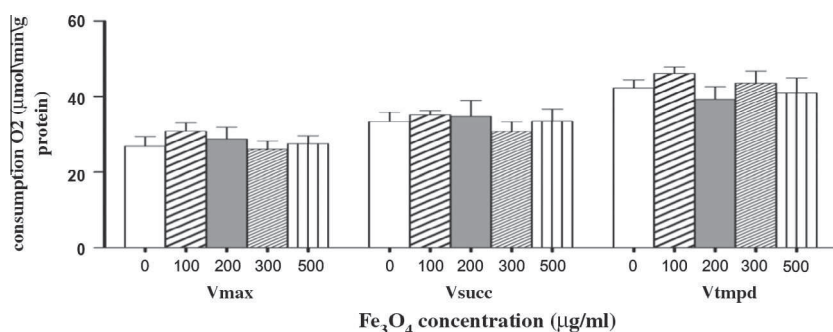


Fig. 6. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. V_{max} reflects complexes I, III and IV activities and is measured using glutamate and malate. V_{succ} reflects complexes II, III and IV activities and is measured using succinate. V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) and ascorbate as mitochondrial substrates.

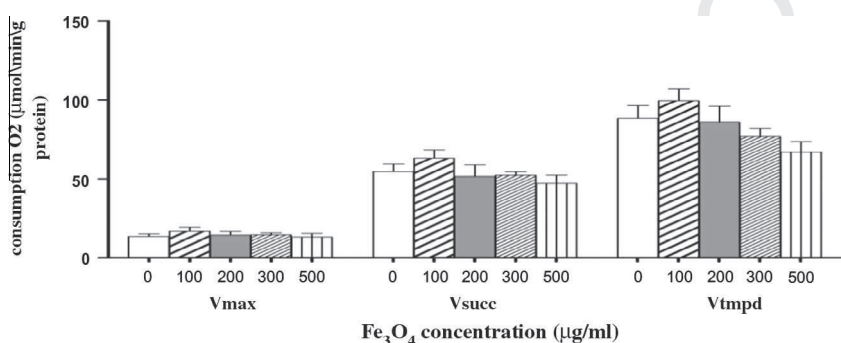


Fig. 7. Effects of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) on kidney mitochondrial respiratory chain complexes activities. V_{max} reflects complexes I, III and IV activities and is measured using glutamate and malate. V_{succ} reflects complexes II, III and IV activities and is measured using succinate. V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) and ascorbate as mitochondrial substrates.

2 h of nanoparticle exposure (0.50 mg/mL). The relatively short time of organ exposure to our NPs might thus explain -at least partly- the lack of mitochondrial dysfunction observed in our work. However, it should be noted that in the cited study, both NPs concentrations and size (20–40 nm) were much greater than in our study. Furthermore, incubation period varies widely in published data, ranging from 1 to 24 h in Costa et al., 2010; Hussain et al., 2005 works, respectively. Costa et al., 2010 demonstrated that 1 h incubation was enough for silver nanoparticles to decrease mitochondrial function but since we observed increased ROS production as soon as after 30 min exposure of cardiomyocytes to combined Diltiazem and N-Acetylcystein (Steib et al., 2013), we decided to submit all mitochondria to a 30 min incubation. Indeed, cells are likely to be more resistant to NPs than isolated mitochondria (Freyre-Fonseca et al., 2011).

Complex IV might need a further discussion. Indeed, although we failed to find a significant difference with control values, V_{tmpd} was decreased when comparing Fe_3O_4 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Fe_3O_4 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Fe_3O_4 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in heart and lung, respectively. Although this might simply be artifactual, it might alternatively support a specific toxicity of Fe_3O_4 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on complex IV of the mitochondrial respiratory chain. Indeed, as reported by Mukhopadhyay et al. (2012) the bare Fe_3O_4 NPs have considerable magnetism at room temperature and his interaction with cytochrome c leads to the reduction of the protein. Moreover, the same treatments altered the redox state of cytochrome c (Kai et al., 2011). Interestingly, the concentration used in the present study was comparable with the highest concentration (0.5 mg/mL).

5. Conclusion

In conclusion, exposure of normal brain, heart, lung, liver and kidneys to 9 nm- sized Fe_3O_4 nanoparticles did not significantly

alter their mitochondrial respiratory chain complexes activities or mitochondrial coupling. This suggest that, in this setting, such NPs has no or a very low mitochondrial toxicity. Further investigations would be helpful to determine whether this holds true in case of fragilized mitochondria, as observed during aging or many diseases and whether complex IV might be more sensitive to Fe_3O_4 at very high concentrations.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We thank FabienneGoupilleau, Isabelle Bentz and Anne-Marie Kasproicz for their expert biological and secretarial assistances.

References

- Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Lyer, S., 2005. Nanomedicine: magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia – new chances for cancer therapy. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 53, 839–845.
- Anderson, E.J., Neuffer, P.D., 2006. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H_2O_2 generation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 290, C844–C851.
- Au, C., Mutkus, L., Dobson, A., Riffle, J., Lalli, J., Aschner, M., 2007. Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes. Biol. Trace Elem. Res. 120, 248–256.
- Baroli, B., Ennas, M.G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., Lopez-Quintela, M.A., 2007. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. J. Invest. Dermatol. 127, 1701–1712.
- Basti, H., Ben Tahar, L., Smiri, L.S., Herbst, F., Vaulay, M.J., Chau, F., Ammar, S., Benderbous, S., 2010. Catechol derivatives-coated Fe_3O_4 and gamma- Fe_2O_3 nanoparticles as potential MRI contrast agents. J. Colloid Interface Sci. 341, 248–254.

- Bouitbir, J., Charles, A.L., Echaniz-Laguna, A., Kindo, M., Daussin, F., Auwerx, J., Piquard, F., Geny, B., Zoll, J., 2012. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur. Heart J.* 33, 1397–1407.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buyukhatipoglu, K., Clyne, A.M., 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 96, 186–195.
- Chan, R.K., Austen Jr., W.G., Ibrahim, S., Ding, G.Y., Verna, N., Hechtman, H.B., Moore Jr., F.D., 2004. Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J. Surg. Res.* 122, 54–60.
- Charles, A.L., Guilbert, A.S., Bouitbir, J., Goette-Di Marco, P., Enache, I., Zoll, J., Piquard, F., Geny, B., 2011. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br. J. Surg.* 98, 511–516.
- Chen, C.L., Zhang, H., Ye, Q., Hsieh, W.Y., Hitchens, T.K., Shen, H.H., Liu, L., Wu, Y.J., Foley, L.M., Wang, S.J., Ho, C., 2010. A new nano-sized iron oxide particle with high sensitivity for cellular magnetic resonance imaging. *Mol. Imaging Biol.* 13, 825–839.
- Corot, C., Robert, P., Idee, J.M., Port, M., 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 58, 1471–1504.
- Costa, C.S., Ronconi, J.V., Daufenbach, J.F., Goncalves, C.L., Rezin, G.T., Streck, E.L., Paula, M.M., 2010. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol. Cell Biochem.* 342, 51–56.
- Duteil, D., Chambon, C., Ali, F., Malivindi, R., Zoll, J., Kato, S., Geny, B., Chambon, P., Metzger, D., 2010. The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab.* 12, 496–508.
- Ferreira, A.J., Cernlyn-Jones, J., Robalo Cordeiro, C., 2012. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. *Rev. Port Pneumol.*
- Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N.L., Gutierrez-Cirlos, E.B., Calderon-Torres, C.M., Cabellos-Avelar, T., Sanchez-Perez, Y., Pinzon, E., Torres, I., Molina-Jijon, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., Garcia-Cuellar, C.M., Chirino, Y.I., 2011. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol. Lett.* 202, 111–119.
- Harada, T., Tanigawa, N., Matsuki, M., Nohara, T., Narabayashi, I., 2007. Evaluation of lymph node metastases of breast cancer using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *Eur. J. Radiol.* 63, 401–407.
- Hillyer, J.F., Albrecht, R.M., 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 90, 1927–1936.
- Horn, D., Fontanesi, F., Barrientos, A., 2008. Exploring protein–protein interactions involving newly synthesized mitochondrial DNA-encoded proteins. *Methods Mol. Biol.* 457, 125–139.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 975–983.
- Jeng, H.A., Swanson, J., 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 41, 2699–2711.
- Kai, W., Xiaojun, X., Ximing, P., Zhenqing, H., Qiqing, Z., 2011. Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res. Lett.* 6, 480.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Moller, L., 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1726–1732.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Moller, L., 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* 188, 112–118.
- Kindo, M., Gerelli, S., Bouitbir, J., Charles, A.L., Zoll, J., Hoang Minh, T., Monassier, L., Favret, F., Piquard, F., Geny, B., 2012. Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. *Front Physiol.* 3, 332.
- Kwon, J.T., Hwang, S.K., Jin, H., Kim, D.S., Minai-Tehrani, A., Yoon, H.J., Choi, M., Yoon, T.J., Han, D.Y., Kang, Y.W., Yoon, B.I., Lee, J.K., Cho, M.H., 2008. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *J. Occup. Health* 50, 1–6.
- L'Azou, B., Jorly, J., On, D., Sellier, E., Moisan, F., Fleury-Feith, J., Cambar, J., Brochard, P., Ohayon-Courtes, C., 2008. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol.* 5, 22.
- Ling, B., Peng, F., Alcorn, J., Lohmann, K., Bandy, B., Zello, G.A., 2012. D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutr. Metab (Lond)* 9, 6.
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M.A., Hosseinkhani, M., 2011. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano* 5, 7263–7276.
- McBain, S.C., Yiu, H.H., Dobson, J., 2008. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 3, 169–180.
- Mukhopadhyay, A., Joshi, N., Chattopadhyay, K., De, G., 2012. A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome c. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 142–149.
- Puppi, J., Mitry, R.R., Modo, M., Dhawan, A., Raja, K., Hughes, R.D., 2011. Use of a clinically approved iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes. *Cell Transplant* 20, 963–975.
- Risom, L., Moller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 592, 119–137.
- Rumenapp, C., Gleich, B., Haase, A., 2012. Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics. *Pharm. Res.* 29, 1165–1179.
- Salnikov, V., Lukyanenko, Y.O., Frederick, C.A., Lederer, W.J., Lukyanenko, V., 2007. Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles. *Biophys. J.* 92, 1058–1071.
- Satav, J.G., Katyare, S.S., 1982. Effect of experimental thyrotoxicosis on oxidative phosphorylation in rat liver, kidney and brain mitochondria. *Mol. Cell Endocrinol.* 28, 173–189.
- Shimada, A., Kawamura, N., Okajima, M., Kaewamatawong, T., Inoue, H., Morita, T., 2006. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol. Pathol.* 34, 949–957.
- Steib, A., Collange, O., Quessard, A., Levy, F., Zeisser, M., Charles, A.L., Oltean, C., Kretz, J.G., Geny, B., Borg, J., 2013. Combined intraoperative use of Diltiazem and N-acetylcysteine increases myocardial damage and oxidative stress during off-pump cardiac surgery. *Int. J. Cardiol.*, 26. Apr 26. doi:pii: S0167-5273(13)00655-4.
- Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V., 2002. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 172–179.
- Xu, H., Dai, W., Han, Y., Hao, W., Xiong, F., Zhang, Y., Cao, J.M., 2010. Differential internalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different types of cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 7406–7410.
- Yurchenko, O.V., Todor, I.N., Khayetsky, I.K., Tregubova, N.A., Lukianova, N.Y., Chekhun, V.F., 2010. Ultrastructural and some functional changes in tumor cells treated with stabilized iron oxide nanoparticles. *Exp. Oncol.* 32, 237–242.
- Zhu, M.T., Wang, Y., Feng, W.Y., Wang, B., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z.F., 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 8584–8590.
- Zhu, M.T., Wang, B., Wang, Y., Yuan, L., Wang, H.J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z.F., Feng, W.Y., Zhao, Y.L., 2011. Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: risk factors for early atherosclerosis. *Toxicol. Lett.* 203, 162–171.
- Zoll, J., Monassier, L., Garnier, A., N'Guessan, B., Mettauer, B., Veksler, V., Piquard, F., Ventura-Clapier, R., Geny, B., 2006. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J. Appl. Physiol.* 101, 385–391.

CHAPITRE IV

Effet de l'âge sur la toxicité mitochondriale hépatique
des nanoparticules de Fe_3O_4

Cette partie a fait l'objet d'un article « Age Modulates Fe₃O₄ Nanoparticles Liver Toxicity: Dose-Dependent Decrease in Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Coupling in Middle-Aged as Compared to Young Rats » paru dans la revue «BioMed Research International » 2014 Mai ; 474081.

1. Objectifs

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet de l'âge sur la respiration mitochondriale hépatique et le couplage mitochondrial après contact avec les nanoparticules d'oxyde de fer.

2. Effet de l'âge sur la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et sur le couplage mitochondrial

Il n'existe aucune différence entre la consommation d'oxygène de la respiration mitochondriale hépatique des rats jeunes (3mois) et des rats âgés (18 mois) par rapport à celle des rats témoins. Ainsi, la capacité oxydative maximale est conservée malgré le vieillissement (âgé $30,0 \pm 1,6$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine vs jeune : $29,8 \pm 5,6$). De même V_{succ} ainsi que la V_{tmpd} restent inchangées en vieillissant (âgé $33,9 \pm 1,7$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine vs jeune : $35,0 \pm 3,7$ et âgé $43,0 \pm 1,6$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine vs jeune : $50,0 \pm 6,2$; respectivement). Le couplage mitochondrial est également comparable chez les rats âgés et les rats jeunes (âgé $8,0 \pm 1,9$ vs jeune : $8,2 \pm 1,6$ μmol ; $p=\text{NS}$) (Tableau 12).

Tableau 12: Les valeurs témoins des activités de la chaîne respiratoire mitochondriale du foie et le couplage mitochondrial

Vitesse de concentration d'O ₂	Jeune (3 mois)	Agé (18 mois)
V_{max} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	$29,8 \pm 5,6$	$30,0 \pm 1,6$
V_{succ} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	$35,0 \pm 3,7$	$33,9 \pm 1,7$
V_{tmpd} ($\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine)	$50,0 \pm 6,2$	$43,0 \pm 1,6$
ACR	$9,7 \pm 2,6$	$10,5 \pm 1,3$

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

ACR: le couplage mitochondrial (V_{max}/V_0).

3. Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats jeunes

La V_{max} ($27,2 \pm 4,5$; $29,7 \pm 4,1$; $29,0 \pm 3,1$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour 250, 300, 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ respectivement) (Figure 49(A)), la V_{succ} ($27,5 \pm 4,2$; $30,9 \pm 4,2$; $30,1 \pm 3,3$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour 250, 300, 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ respectivement) (Figure 49(B)) et la V_{tmpd} ($46,3 \pm 4,5$; $49,7 \pm 4,9$; $50,0 \pm 3,8$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour 250, 300, 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ respectivement) (Figure 49(C)) ne sont pas altérés chez les rats traités aux nanoparticules Fe_3O_4 par rapport aux rats témoins ($29,8 \pm 5,6$; $35,0 \pm 3,7$; $50,0 \pm 6,2$ $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine pour V_{succ} , V_{succ} , V_{tmpd} respectivement).

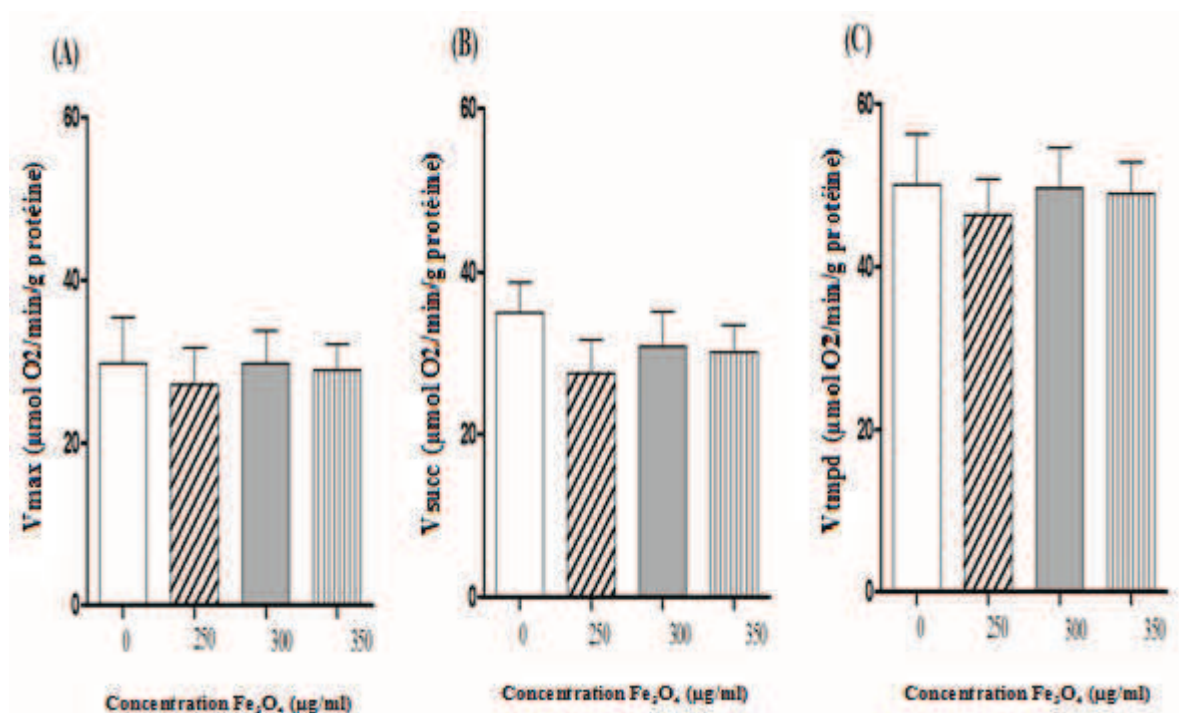


Figure 49: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats jeunes

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

4. Effet des nanoparticules Fe₃O₄ sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés

Après exposition des mitochondries isolées hépatiques des rats âgés aux différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer, on observe une diminution significative des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (*V_{max}*, *V_{succ}* et *V_{tmpd}*).

Selon la figure 50(A), la capacité oxydative maximale, *V_{max}*, qui représente l'activité des complexes I, III et IV, diminue significativement quelque soit la dose de nanoparticules administrées. En effet pour la dose de 250 µg Fe₃O₄/ml, *V_{max}*, diminue significativement par comparaison au groupe témoin ($24,4 \pm 1,4$ vs $30 \pm 1,6$ µmol O₂/min/g protéine, $p < 0,05$), avec la dose de 300 µg Fe₃O₄/ml ($23,8 \pm 1,0$ µmol O₂/min/g protéine; $p < 0,001$) et avec la dose de 350 µg Fe₃O₄/ml ($17,9 \pm 1,5$ µmol O₂/min/g protéine; $p < 0,001$).

La *V_{succ}*, qui représente l'activité des complexes II, III et IV présente une tendance à diminuer par comparaison au groupe témoin ($27,0 \pm 2,3$ vs $33,9 \pm 1,7$ µmol O₂/min/g protéine). La diminution significative par rapport au témoin est atteinte lorsqu'on arrive à la concentration de 300 µg Fe₃O₄/ml et 350 µg Fe₃O₄/ml ($25,8 \pm 1,0$ et $24,3 \pm 1,0$ vs $33,9 \pm 1,7$ µmol O₂/min/g protéine respectivement, $p < 0,05$ et $p < 0,01$) (Figure 50(B)).

En ce qui concerne la *V_{tmpd}*, qui représente l'activité du complexe IV, on observe une diminution significative après exposition à la concentration de 250 µg Fe₃O₄/ml par comparaison au groupe témoin ($33,0 \pm 2,9$ vs $43,0 \pm 1,6$ µmol O₂/min/g protéine, $p < 0,05$). De la même façon *V_{tmpd}*, diminue significativement lors de l'exposition à 300 µg Fe₃O₄/ml ($32,9 \pm 1,9$ vs $43,0 \pm 1,6$ µmol O₂/min/g protéine, $p < 0,05$) et à 350 µg Fe₃O₄/ml ($26,3 \pm 2,2$ vs $43,0 \pm 1,6$ µmol O₂/min/g protéine, $p < 0,001$) (Figure 50(C)).

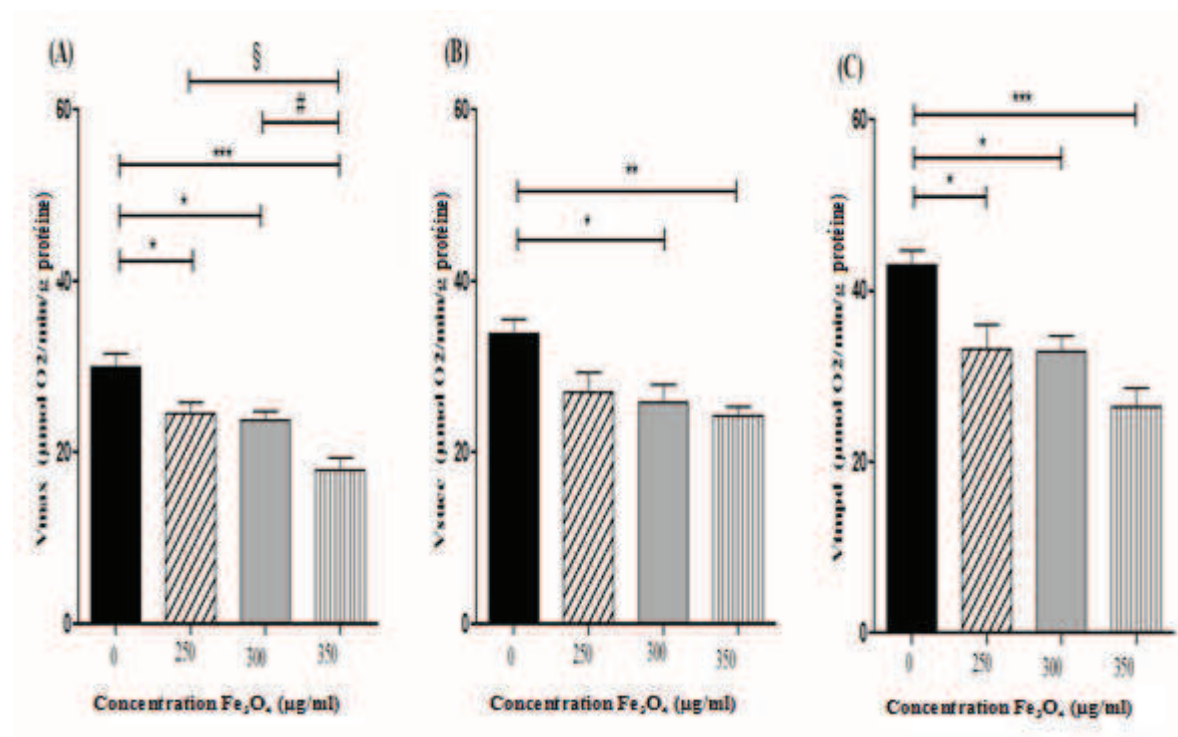


Figure 50: Effet des nanoparticules de Fe₃O₄ sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs témoin. # $p < 0,05$ 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ vs 300 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$. § $p < 0,05$ 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ vs 250 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$.

V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetraméthyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

5. Effet des nanoparticules de Fe₃O₄ sur le couplage mitochondriale hépatique chez les rats jeunes et âgés

Chez le rat jeune, l'ACR hépatique (V_{max}/V_0), qui représente le degré de couplage entre l'oxydation et la phosphorylation, reste inchangée après exposition aux nanoparticules Fe₃O₄ et par comparaison aux témoins ($8,4 \pm 1,8$; $9,1 \pm 1,7$ et $8,0 \pm 1,2$; respectivement pour 250, 300 et 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}$ vs $9,7 \pm 2,6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protéine). Cependant, on observe une diminution significative du couplage mitochondrial hépatique chez les rats âgés exposés aux nanoparticules Fe₃O₄ par comparaison aux témoins. Ainsi, quelque soit la dose de nanoparticules Fe₃O₄ appliquée, le couplage mitochondrial diminue significativement par rapport aux témoins correspondants (Figure 51).

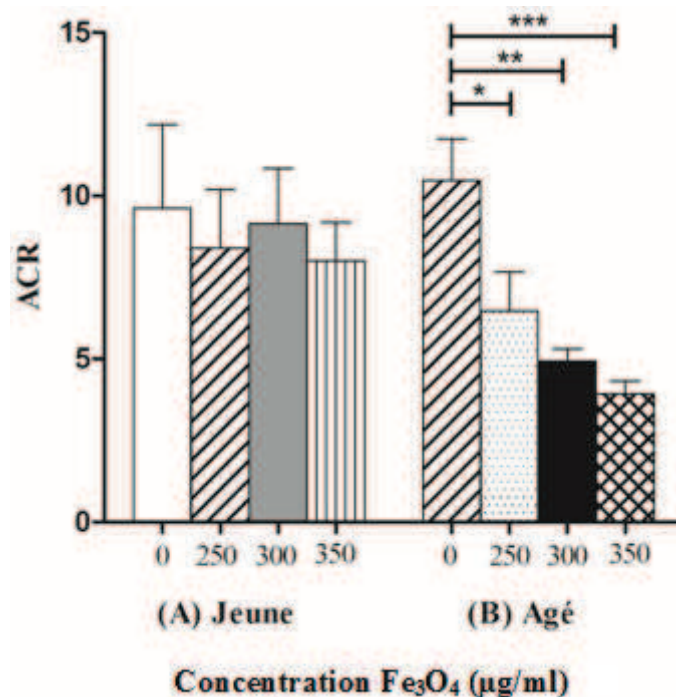


Figure 51: Effet des nanoparticules de Fe_3O_4 sur le couplage mitochondrial hépatique chez le rat jeune (A) et âgé (B).

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs contrôle. Le couplage mitochondrial (ACR: V_{max}/V_0)

6. Effet de l'oxyde de fer sous sa forme non particulaire sur l'activité et le couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés

Pour distinguer si les résultats obtenus pourraient être dus à la taille ou à un modèle de réponse général devant l'exposition d'oxyde de fer, nous avons soumis la mitochondrie isolée de foie de rat âgé à une solution de Fe^{3+} avec une concentration de $350\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$.

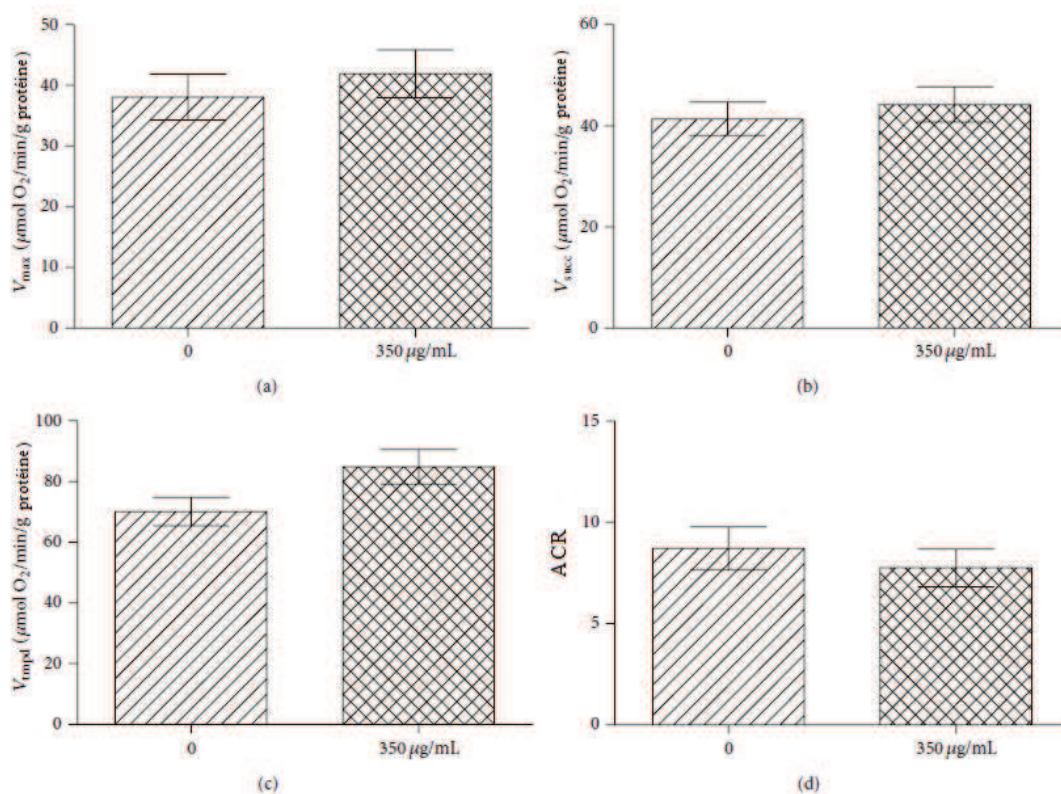


Figure 52: Effet de 350 µg/ml de Fe₃O₄ sous sa forme non particulaire sur l'activité et le couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (Test one-way ANOVA suivi par un test Tukey).

(a) V_{max} représente les activités des complexes I, III et IV et est mesurée en utilisant le glutamate et le malate.

(b) V_{succ} représente les activités des complexes II, III and IV et est mesurée en utilisant le succinate.

(c) V_{tmpd} représente les activités du complexe IV et est mesurée en utilisant le N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (tmpd) et l'ascorbate comme des substrats mitochondriaux.

(d) ACR: représente le couplage mitochondrial et est mesurée en faisant le rapport V_{max}/V .

Lorsque les mitochondries isolées de foie de rats âgés ont été exposés à 350 µg/ml de Fe₃O₄ sous sa forme libre, V_{max} ($41,90 \pm 3,93$ vs $38,08 \pm 3,77$ µmol O₂/min/g protéine), V_{succ} ($44,23 \pm 3,44$ vs $41,42 \pm 3,30$ µmol O₂/min/g protéine), V_{tmpd} ($84,90 \pm 5,75$ vs $70,08 \pm 4,71$ µmol O₂/min/g protéine), et ACR ($7,70 \pm 1,15$ vs $8,72 \pm 1,06$) n'ont pas été significativement modifiés (Figure 52).

Research Article

Age Modulates Fe₃O₄ Nanoparticles Liver Toxicity: Dose-Dependent Decrease in Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Coupling in Middle-Aged as Compared to Young Rats

Yosra Baratli,^{1,2} Anne-Laure Charles,¹ Valérie Wolff,¹ Lotfi Ben Tahar,³ Leila Smiri,³ Jamal Bouitbir,¹ Joffrey Zoll,^{1,4} Mohsen Sakly,² Cyril Auger,⁵ Thomas Vogel,¹ Hafedh Abdelmelek,² Olfa Tebourbi,² and Bernard Geny^{1,4}

¹ EA 3072, Mitochondries, Stress Oxydant et Protection Musculaire, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

² Laboratoire de Physiologie Intégrée, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisia

³ Laboratoire de Synthèse et Structures de Nanomatériaux, UR11ES30, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Jarzouna, Tunisia

⁴ Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, NHC, 67000 Strasbourg, France

⁵ UMR CNRS 7213-Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

Correspondence should be addressed to Bernard Geny; bernard.geny@chru-strasbourg.fr

Received 10 February 2014; Revised 3 April 2014; Accepted 4 April 2014; Published 6 May 2014

Academic Editor: N. Chandrasekaran

Copyright © 2014 Yosra Baratli et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We examined the effects of iron oxide nanoparticles (IONPs) on mitochondrial respiratory chain complexes activities and mitochondrial coupling in young (3 months) and middle-aged (18 months) rat liver, organ largely involved in body iron detoxification. Isolated liver mitochondria were extracted using differential centrifugations. Maximal oxidative capacities ($V_{\max}$, complexes I, III, and IV activities), V_{succ} (complexes II, III, and IV activities), and V_{tmpd} (complex IV activity), together with mitochondrial coupling ($V_{\max}/V_0$) were determined in controls conditions and after exposure to 250, 300, and 350 $\mu\text{g/ml}$ Fe₃O₄ in young and middle-aged rats. In young liver mitochondria, exposure to IONPs did not alter mitochondrial function. In contrast, IONPs dose-dependently impaired all complexes of the mitochondrial respiratory chain in middle-aged rat liver: $V_{\max}$ (from 30 ± 1.6 to 17.9 ± 1.5 ; $P < 0.001$), V_{succ} (from 33.9 ± 1.7 to 24.3 ± 1.0 ; $P < 0.01$), V_{tmpd} (from 43.0 ± 1.6 to 26.3 ± 2.2 $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$ protein; $P < 0.001$) using Fe₃O₄ 350 $\mu\text{g/ml}$. Mitochondrial coupling also decreased. Interestingly, 350 $\mu\text{g/ml}$ Fe₃O₄ in the form of Fe³⁺ solution did not impair liver mitochondrial function in middle-aged rats. Thus, IONPs showed a specific toxicity in middle-aged rats suggesting caution when using it in old age.

1. Introduction

Because of their unique properties, some nanoparticles have been approved for clinical use like iron oxide nanoparticles (IONPs). IONPs hold immense potential in a vast variety of biomedical applications such as magnetic resonance imaging (MRI), targeted delivery of drugs or genes, tissue engineering, targeted destruction of tumor tissue through hyperthermia, magnetic transfections, iron detection, chelation therapy, and

tissue engineering [1–4]. Reports demonstrate that IONPs have the ability to assess focal hepatic lesions [5] and to label human hepatocytes [6].

However, nanoparticles pose a high health risk because of their ability to reach every part of the organs and tissues and their interaction with cellular functions.

Concerning NP clearance, it is known that they are primarily phagocytosed by macrophages in the liver (Kupffer cells) [7]. Thus, the largest detoxification organ of human

beings, the liver, is reached by the highest amount of nanoparticles, over all the other tissues [8, 9]. Furthermore, mitochondria are considered a major cell compartment relevant to possible nanoparticle toxicity [10]. Impairment of mitochondria might be a key problem since mitochondrial dysfunction may result in reduced cellular ATP delivery, increased reactive oxygen species production, and triggering of apoptosis pathways. Accordingly, mitochondrial dysfunctions occur early in many acute or chronic diseases such as peripheral arterial or pulmonary diseases [11, 12].

Mitochondrial involvement in IONPs toxicity remains controversial and either no deleterious effects [13, 14] or mitochondrial impairments have been observed [15–17].

Concerning Fe_3O_4 nanoparticles, we recently reported a lack of IONPs toxicity in liver mitochondria in young rats [18]. Nevertheless, age-related accumulation of iron increases the potential for free redox-active iron, which can promote oxidative stress and mitochondrial damage [19]. More recently, [20] reported that age-dependent accumulation of mitochondrial iron may increase mitochondrial dysfunction and oxidative damage, thereby enhancing the susceptibility to apoptosis. Therefore, age might modify the susceptibility of mitochondria to iron nanoparticles (NPs).

Since, to date, no study investigated the potential effects of iron oxide nanoparticles on middle-aged mitochondria and since the liver is a key organ in iron and NPs detoxification, we investigated and compared for the first time the effects of three different concentrations of Fe_3O_4 nanoparticles (250, 300, and 350 $\mu\text{g/mL}$) on young and middle-aged liver mitochondrial respiratory chain complexes activities and on mitochondrial coupling of phosphorylation to oxidation.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Reagents. Iron oxide nanoparticles were acquired from Unit of Research UR11ES30, Faculty of science of Bizerte, Tunisia. They were prepared by the polyol process starting from iron (II) acetate as metal precursor and diethylene glycol (DEG) as solvent purchased from ACROS Organics. All chemicals were used as received without further purification. Deionized water was used in these preparations. For the synthesis of the magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles, an appropriate amount of iron (II) acetate precursor was added to a given volume (125 mL) of DEG to reach nominal iron cations concentration of 0.2 M. The mixture was then refluxed at a rate of $+6^\circ\text{C min}^{-1}$ under mechanical stirring up to boiling point and then maintained at this temperature for about 2 h. The powders were washed several times with ethanol and then with acetone under ultrasonication with intermittent centrifugation and then dried in air at 50°C [18].

2.2. Nanoparticle Characterization Using Transmission Electron Microscopy (TEM). The size and shape of prepared particles were analyzed on a JEOL-100-CX II transmission electron microscope (TEM) operating at 100 kV equipped with an energy dispersive spectrometer (EDX) [21].

TEM imaging of Fe_3O_4 nanoparticles showed that the powders are constituted by roughly spherical almost nonagglomerated particles. In addition, about 250 particles have

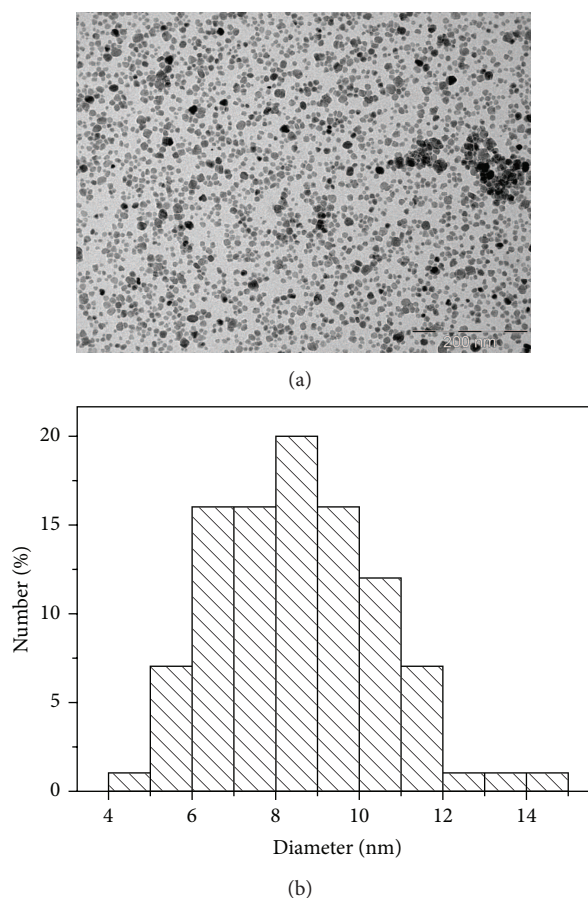


FIGURE 1: TEM image (a) and size histogram (b) of the Fe_3O_4 nanoparticles.

been counted for the average particle size and histogram determinations. The calculated average diameter was 9 nm with a SD of 1.6 nm (Figure 1).

2.3. Animals. Young ($n = 6$, age 3 months) and middle-aged ($n = 6$, age 18 months) Wistar male rats were housed in a thermoneutral environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), on a 12:12 h photoperiod, and were provided food and water *ad libitum*. This investigation was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory published by the US National Institute of Health and approved by the institutional animal care committee (NIH publication number 85-23, revised 1996).

Rats were submitted to general anesthesia with 3% isoflurane and oxygen (1L/min) in an induction chamber (Minerve, Esternay, France). Anesthesia was maintained with 1.5% isoflurane and 1L/min oxygen at under spontaneous ventilation. A midline laparotomy was performed and the liver was excised, cleaned, and then immediately used for the study of respiratory parameters.

Similarly, three additional Wistar rats aged 18 months were studied, in order to investigate the potential effect of iron oxide *per se*.

2.4. Extraction of Mitochondria. All operations were carried on ice. A piece of tissue was placed into buffer A containing

50 mM tris, 1 mM EGTA, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, and pH 7.40 at +4°C. Tissue was finely minced with scissors, placed in buffer A, and homogenized with a Potter-Elvehjem. Then, the homogenate was centrifuged at 1300 ×g for 3 min and 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000 ×g for 10 min and 4°C to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM tris, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, and pH 7.4 at +4°C. Protein content was routinely quantified with a Bradford assay using bovine serum albumin as a standard [22]. Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

2.5. Exposure of Mitochondria to Nanoparticles or to Iron Oxide. The iron oxide nanoparticles were mixed with a solution of NaCl 9%. The mixture was then stirred vigorously and sonicated for 60 min to break up aggregates. Particle suspensions were vortexed immediately before each use. Before measurement, 3 mL of solution M containing 100 mM KCL, 50 mM mops, 1 mM EGTA, 5 mM Kpi, and 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA) was added to the oxygraph chambers for 10 min. Then, 0.50 mg of mitochondrial protein was placed in the oxygraph chambers with 10 mM glutamate and 2.50 mM malate as substrates. The temperature was maintained at +25°C. Isolated liver mitochondria were incubated with different concentrations of Fe₃O₄ (0, 250, 300, and 350 µg/mL) during 30 min at +25°C.

To discriminate if the results obtained might be due to the size or to a general response pattern in front of iron oxide exposure, we submitted middle-aged liver mitochondria to a Fe³⁺ solution with concentration of 350 µg/mL Fe₃O₄. To obtain free Fe³⁺ ions a precise mass of Fe₃O₄ nanoparticles was dissolved in a small volume of concentrated HCl under gentle heating [23]. Two experiments were conducted *per* animal, and thus number of data was six.

2.6. Measurement of the Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Mitochondrial Coupling. Maximal oxidative capacity ($V_{\max}$) was measured by adding adenosine diphosphate (ADP). When $V_{\max}$ was recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Then complex I was blocked with amytal (0.02 mM) and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration in these conditions allowed determining complexes II, III, and IV activities (V_{succ}). After that, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (TMPD, 0.50 mM) and ascorbate (0.50 mM) were added as artificial electron donors to cytochrome c. In these conditions, the activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was determined as an isolated step of the respiratory chain (V_{tmpd}) [24].

Mitochondrial coupling (coupling of phosphorylation to oxidation) was determined by calculating the acceptor control ratio (ACR), ratio between ADP-stimulated respiration ($V_{\max}$) over basal respiration (without ADP) with glutamate and malate as substrate (V_0), as previously reported by Mansour et al. 2012 [25].

2.7. Statistical Analysis. Results are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by a Tukey posttest. The unpaired *t*-test was used to

TABLE 1: Baseline liver mitochondrial respiratory chain complexes activities and mitochondrial coupling.

Control	Young (3 months)	Middle-aged (18 months)
$V_{\max}$ (µmol O ₂ /min/g protein)	29.8 ± 5.6	30.0 ± 1.6
V_{succ} (µmol O ₂ /min/g protein)	35.0 ± 3.7	33.9 ± 1.7
V_{tmpd} (µmol O ₂ /min/g protein)	50.0 ± 6.2	43.0 ± 1.6
ACR	9.7 ± 2.6	10.5 ± 1.3

Data are means ± SEM.

ACR: acceptor control ratio ($V_{\max}/V_0$).

compare young and old rats. Statistical significance required a $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effects of Age on Mitochondrial Respiratory Chain Function and on Mitochondrial Coupling. As shown in Table 1, there was no difference in mitochondrial oxygen consumptions between young (3 months) and middle-aged (18 months) control rats liver. Thus, the maximal oxidative capacity was similar in young versus middle-aged rats (29.8 ± 5.6 and 30.0 ± 1.6 µmol O₂/min/g protein, respectively). This holded true for V_{succ} (young: 35.0 ± 3.7 versus 33.9 ± 1.7 µmol O₂/min/g protein) and for V_{tmpd} (young: 50.0 ± 6.2 versus 43.0 ± 1.6 µmol O₂/min/g protein).

Finally, mitochondrial coupling was similar in both young and middle-aged rats (9.7 ± 2.6 versus 10.5 ± 1.3 ; $P = \text{NS}$).

3.2. Effects of IONPs on Young Liver Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities

Complexes I, III, and IV Activities. The $V_{\max}$ in the group treated with increasing doses of IONPs (250, 300, and 350 µg/mL) was not modified as compared to the control group (27.2 ± 4.5 ; 29.7 ± 4.1 ; 29.0 ± 3.1 versus 29.8 ± 5.6 µmol O₂/min/g protein) (Figure 2(a)).

Complexes II, III, and IV Activities. V_{succ} was unchanged whatever the dose of IONPs (27.5 ± 4.2 , 30.9 ± 4.2 , and 30.1 ± 3.3 for Fe₃O₄ 250, 300, and 350, respectively, as compared to control values 35.0 ± 3.7 µmol O₂/min/g protein) (Figure 2(b)).

Complex IV Activity. V_{tmpd} , reflecting complex IV activity, was not modified after IONPs treatment as compared with control group (46.3 ± 4.5 , 49.7 ± 4.9 , and 50.0 ± 3.8 for Fe₃O₄ 250, 300, and 350, respectively, versus 50.0 ± 6.2 µmol O₂/min/g protein) (Figure 2(c)).

Taken together, these data support that Fe₃O₄ nanoparticles, whatever the doses used, failed to alter any of the liver mitochondrial respiratory chain complexes activities in young rats.

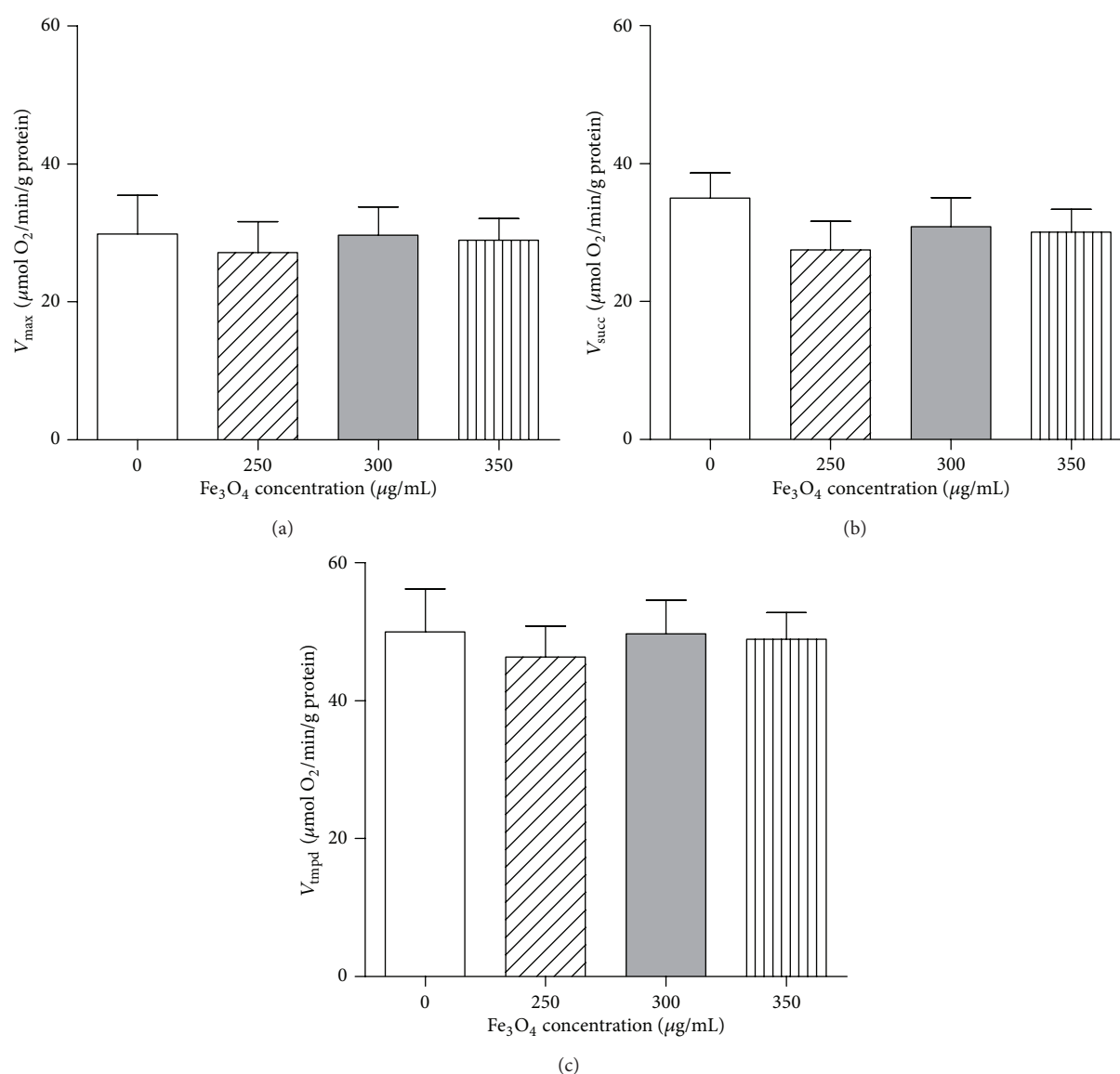


FIGURE 2: Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on young liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. (a) $V_{\max}$ reflects complexes I, III, and IV activities and is measured using glutamate and malate. (b) V_{succ} reflects complexes II, III, and IV activities and is measured using succinate. (c) V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using TMPD and ascorbate as mitochondrial substrates. Data are means $\pm$ SEM

3.3. Effects of IONPs on Middle-Aged Liver Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities. When the middle-aged liver rats were exposed to different concentrations of IONPs, the $V_{\max}$, V_{succ} , and V_{tmpd} decreased significantly.

Complexes I, III, and IV Activities. The maximal oxidative capacities, $V_{\max}$, reflecting I, III, and IV activities significantly decreased whatever the dose of IONPs. At 250 μg/mL, $V_{\max}$ was decreased as compared to the control group (24.4 ± 1.4 versus 30 ± 1.6 μmol O₂/min/g protein; $P < 0.05$). $V_{\max}$ at 300 and 350 μg/mL were also decreased as compared to control values (23.8 ± 1.0 and 17.9 ± 1.5 for Fe₃O₄ 300 and Fe₃O₄ 350 μg/mL, respectively, versus CON: 30 ± 1.6 μmol O₂/min/g protein; $P < 0.001$).

The $V_{\max}$ decrease was greater when using higher IONPs concentration. Thus $V_{\max}$ was significantly lower after Fe₃O₄ 350 μg/mL as compared to 300 and 250 μg/mL (Figure 3(a)).

Complexes II, III, and IV Activities. At 250 μg/mL, V_{succ} , reflecting complexes II, III, and IV activities, tended to decrease as compared to the control group (27.0 ± 2.3 versus 33.9 ± 1.7 μmol O₂/min/g protein). The statistical significance was reached at 300 μg/mL and 350 μg/mL (Fe₃O₄ 300 μg/mL: 25.8 ± 1.0 versus CON: 33.9 ± 1.7 μmol O₂/min/g protein; $P < 0.05$) and Fe₃O₄ 350 μg/mL (24.3 ± 1.0 versus 33.9 ± 1.7 μmol O₂/min/g protein; $P < 0.01$) (Figure 3(b)).

Complex IV Activity. V_{tmpd} , reflecting complex IV activity, decreased significantly after exposure to Fe₃O₄ 250 μg/mL

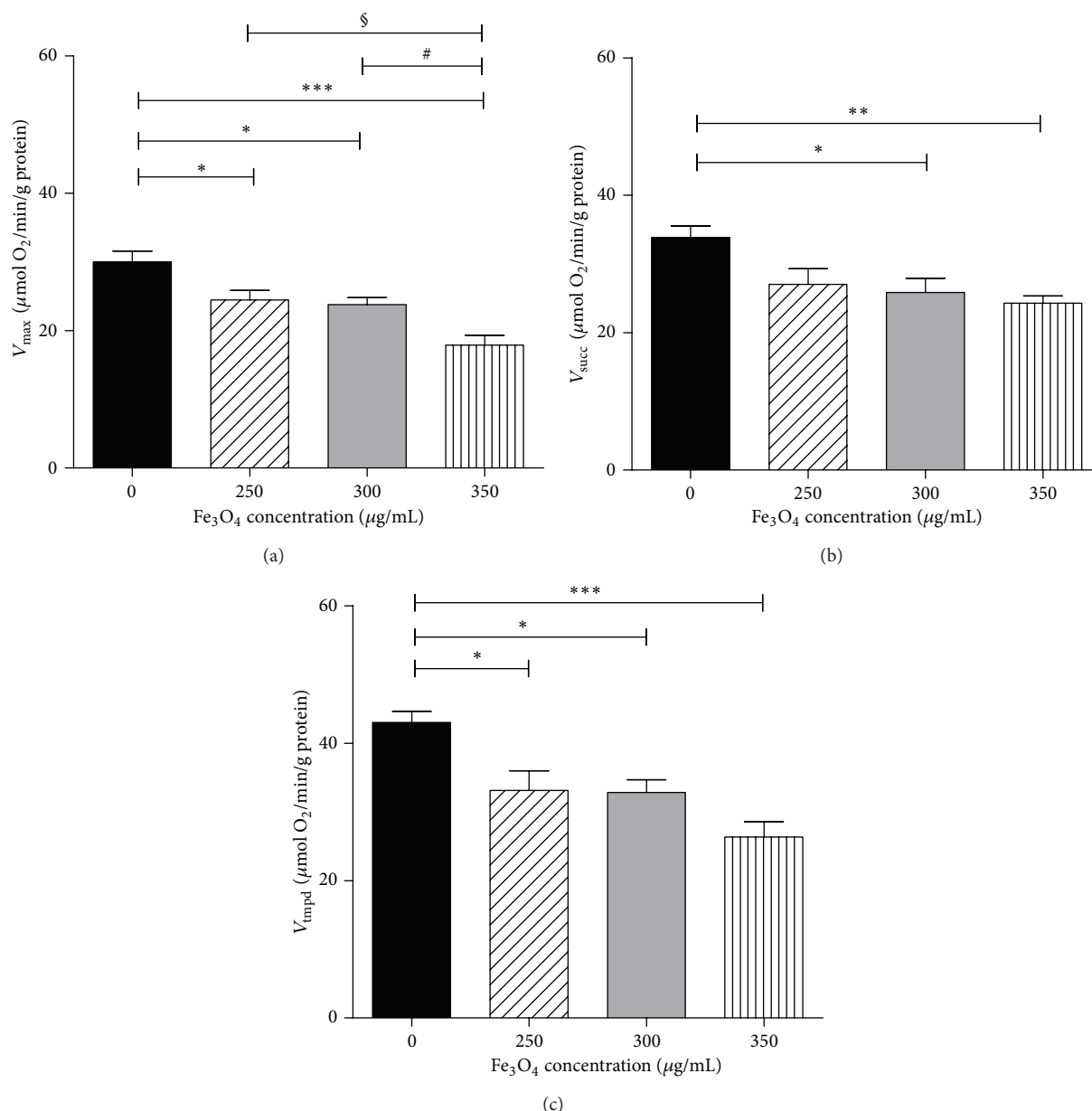


FIGURE 3: Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on middle-aged liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. (a) V_{max} reflects complexes I, III, and IV activities and is measured using glutamate and malate. (b) V_{succ} reflects complexes II, III, and IV activities and is measured using succinate. (c) V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using TMPD and ascorbate as mitochondrial substrates. Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared to control. # $P < 0.05$ 350 μ g/mL compared to 300 μ g/mL. § $P < 0.05$ 350 μ g/mL compared to 250 μ g/mL.

as compared to the control group (33.0 ± 2.9 versus 43.0 ± 1.6 μ mol O₂/min/g protein; $P < 0.05$). Similarly, V_{tmpd} , decreased when exposed to 300 μ g/mL of Fe₃O₄ (32.9 ± 1.9 versus 43.0 ± 1.6 μ mol O₂/min/g protein; $P < 0.05$) and to 350 μ g/mL (26.3 ± 2.2 versus 43.0 ± 1.6 μ mol O₂/min/g protein; $P < 0.001$) (Figure 3(c)).

3.4. Effects of IONPs on Liver Mitochondrial Coupling in Young and Middle-Aged Rats. In young liver, the acceptor control ratio (V_{max}/V_0), representing the degree of coupling between oxidation and phosphorylation, was not changed after IONPs

treatment (8.4 ± 1.8 , 9.1 ± 1.7 , and 8.0 ± 1.2 after, respectively, Fe₃O₄ 250, 300, and 350 μ g/mL, as compared to control 9.7 ± 2.6).

On the other hand, interestingly, IONPs decreased significantly mitochondrial coupling in middle-aged liver, as compared to controls. Thus, the ACR was lower when mitochondria were exposed to 250 μ g/mL Fe₃O₄ as compared to control (6.4 ± 1.2 versus 10.5 ± 1.3 ; $P < 0.05$). Moreover, ACR was also decreased at 300 μ g/mL (5.0 ± 0.4 versus 10.5 ± 1.3 ; $P < 0.01$) and at 350 μ g/mL (Fe₃O₄ 350 μ g/mL: 3.9 ± 0.4 versus CON: 10.5 ± 1.3 ; $P < 0.001$) (Figure 4).

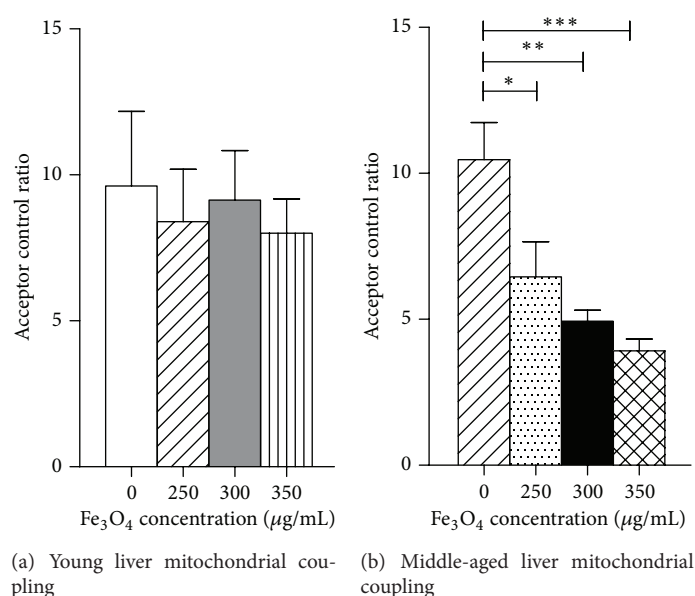


FIGURE 4: Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on (a) young and (b) middle-aged liver mitochondrial coupling. Data are means $\pm$ SEM (one-way ANOVA followed by Tukey). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared to control.

3.5. Effects of Iron Oxide Not in Its Particulate form on Middle-Aged Liver Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Coupling. When the middle-aged liver rats were exposed to 350 µg/mL Fe₃O₄, $V_{\max}$ (41.90 ± 3.93 versus 38.08 ± 3.77 µmol O₂/min/g protein), V_{succ} (44.23 ± 3.443 versus 41.42 ± 3.303 µmol O₂/min/g protein), V_{tmpd} (84.90 ± 5.75 versus 70.08 ± 4.71 µmol O₂/min/g protein), and ACR (7.70 ± 1.15 versus 8.72 ± 1.06) were not significantly modified (Figure 5).

4. Discussion

The main results of this study are to demonstrate that, unlike young animals, middle-aged rats are sensitive to iron oxide nanoparticles (IONPs). Indeed, liver mitochondrial respiration chain complexes I, II, III, and IV activities are altered whatever the concentration of Fe₃O₄ used. Further, 250, 300, and 350 µg/mL of Fe₃O₄ specifically impair liver mitochondrial coupling in middle-aged rats. Such impairment is not observed when using 350 µg/mL of Fe₃O₄ but not in its particulate form.

Young and Middle-Aged Rats Present with Similar Baseline Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities in the Liver. Several studies indicate that mitochondria are one of the major sources of reactive oxygen species (ROS) and, in turn, are the most adversely affected organelles during aging [26]. In fact, mitochondria from aged tissue use oxygen inefficiently, which impairs ATP synthesis and results in increased oxidant production [27]. Oxidative damage mainly concerns the activities of electron transport complexes of the inner mitochondrial membrane [28], which are specifically modified during aging [29, 30].

Accordingly, in rat liver, previous reports have found aging-related decrease in electron transfer activity in complex

I or complexes I and IV in young (4 months) versus old (30 months) rats [31–34]. On the other hand, some studies found no change in the respiratory chain activity with age. Thus, Bakala et al. [35] observed no significant difference in the respiratory chain activity with age between 10-month-old and 27-month-old rats, whatever the substrate used.

This is consistent with our results and might be explained by differences in age range or animals being only middle-aged.

Iron Oxide Nanoparticles Impair Liver Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities in Middle-Aged but Not in Young Rats. Concerning young rats, iron oxide nanoparticles failed to impair any of the liver mitochondrial respiratory chain complexes activities. Thus, mitochondrial oxygen consumption in young liver was not altered by IONPs and, similarly, mitochondrial coupling remained in the normal range after Fe₃O₄ exposure. This is in agreement with our previous findings [18].

To the best of our knowledge, no data are available concerning potential related effects of high levels of iron oxide nanoparticles and age on mitochondria. This is particularly interesting since the liver is a major iron storage organ [36, 37]. Very interestingly, the data were different when middle-aged liver rats were exposed to the same IONPs concentrations than the young ones. In middle-aged liver rats, IONPs at 250, 300, and 350 µg/mL significantly decreased $V_{\max}$, V_{succ} , and V_{tmpd} corresponding together to complexes I, II, III, and IV activities of the mitochondrial respiratory chain. IONPs exposure also decreased mitochondrial coupling.

Several mechanisms might explain these results like increased fragility of older mitochondria and iron accumulation.

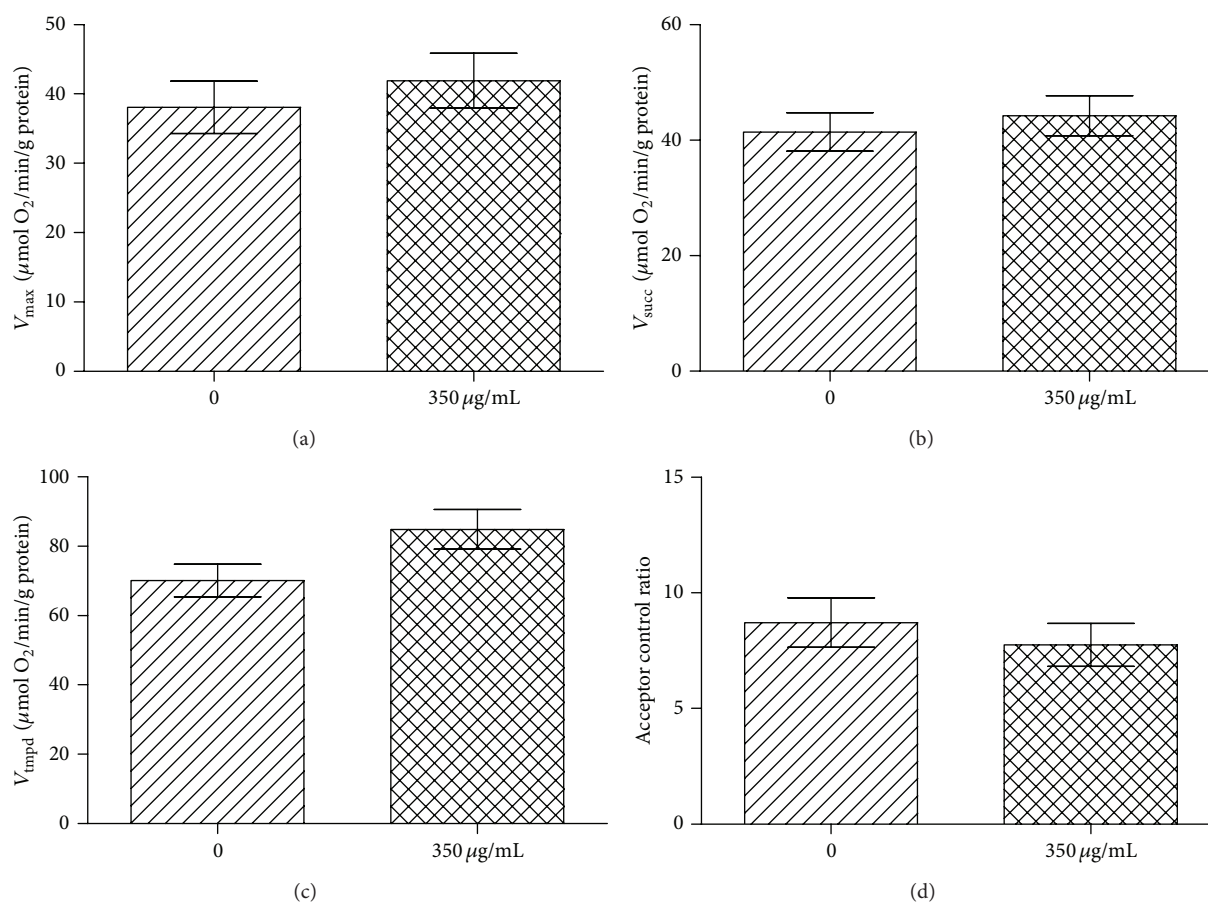


FIGURE 5: Effects of 350 $\mu\text{g/mL}$ of Fe_3O_4 but not in its particulate form on middle-aged liver mitochondrial respiration and coupling. (a) V_{max} reflects complexes I, III, and IV activities and is measured using glutamate and malate. (b) V_{succ} reflects complexes II, III, and IV activities and is measured using succinate. (c) V_{tmpd} reflects complex IV activity and is measured using N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride (TMPD) and ascorbate as mitochondrial substrates. (d) Acceptor control ratio reflects the mitochondrial coupling. Data are means $\pm$ SEM.

First, the fragility of mitochondria seems to increase in function of age. Thus, studies reported that mitochondria isolated from the organs of aged animals are also aged in terms of cytosolic and mitochondrial oxidative stress and losses of enzymatic activities [32]. Accordingly, studies demonstrated that aging induces the loss of mitochondrial function in liver of rodents and monkeys [38–40].

Similarly studies investigated the effects of iron accumulation on mitochondrial integrity and function with age [20, 41, 42]. Investigating the pharmacokinetics of IONPs in rats, Schnorr et al. [43] demonstrated that the half-life and the resulting signal changes in blood and liver vary significantly with age. Thus, iron accumulation which is considered a feature of the aging process [44–46] might be associated with a mitochondrial iron increase. In particular under conditions of cellular stress, this may be a potential causative factor of age-related mitochondrial dysfunction [20, 42, 47, 48]. Mitochondrial damage by excessive cellular iron appears as an intrinsic factor contributing to the permeability pore transition and bioenergetics function decline of mitochondria, which can potentially lead to cellular senescence and tissue degeneration [49–51].

Particularly, in accordance with our data of a NPs-related impairment of complex IV, [52] demonstrated that the interaction of bare Fe_3O_4 NPs with cytochrome *c* leads to the reduction of the protein. Moreover, [53] using human hepatoma cells showed a dose-dependent decrease in mitochondrial membrane potential after exposure to Fe_3O_4 NPs and at high concentration (1 mg/mL) the cytochrome *c* protein expression decreased dramatically. Accordingly, [54] observed that Fe_3O_4 NPs caused the highest toxic effects on green alga, as compared to other types of NPs.

Taken together, these data confirm that age likely modulates Fe_3O_4 nanoparticles liver toxicity and one might propose that a threshold of toxicity might play a key role. Indeed, as reported by Bakala et al. [35] and possibly explaining our results, the accumulation of deleterious oxidized and carboxymethylated proteins in the matrix concomitant with loss of the IONPs protease activity may affect the ability of aging mitochondria to respond to additional stress. We could therefore speculate that the increase in glycoxidative and oxidative alteration is relevant only if the damage is severe enough to have an impact on mitochondrial function.

However, whether the observed effects are specific of iron oxide in its particulate form or is independent of its size is not known. We therefore submitted old liver mitochondria to iron oxide but not in its particulate form and, interestingly, no deleterious effect was observed. Thus, it is likely that age specifically modulates Fe₃O₄ nanoparticles liver toxicity.

5. Conclusion

In summary, we demonstrate for the first time that old rats are more susceptible to IONPs nanoparticle exposure in terms of liver mitochondrial respiration and coupling. These age-related changes in liver mitochondrial respiratory chain activity should perhaps be taken into consideration in preclinical and clinical studies of particulate contrast agents.

Abbreviations

NPs: Nanoparticles
 IONPs: Iron oxide nanoparticles
 $V_{\max}$: Maximal oxidative capacities
 V_{succ} : Complexes II, III, and IV activities
 V_{tmpd} : Complex IV activity
 DEG: Diethylene glycol
 ACR: Acceptor control ratio.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Yosra Baratli and Anne-Laure Charles contributed equally to the paper.

Acknowledgments

The authors thank Fabienne Goupilleau, Isabelle Bentz, and Anne-Marie Kasproicz for their expert biological and secretarial assistance.

References

- [1] C. Alexiou, R. Tietze, E. Schreiber, and S. Lyer, "Nanomedicine: magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia—new chances for cancer therapy," *Bundesgesundheitsblatt—Gesundheitsforschung—Gesundheitsschutz*, vol. 53, no. 8, pp. 839–845, 2010.
- [2] C.-L. Chen, H. Zhang, Q. Ye et al., "A new nano-sized Iron oxide particle with high sensitivity for cellular magnetic resonance imaging," *Molecular Imaging and Biology*, vol. 13, no. 5, pp. 825–839, 2011.
- [3] S. C. McBain, H. H. P. Yiu, and J. Dobson, "Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 169–180, 2008.
- [4] C. Rumenapp, B. Gleich, and A. Haase, "Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics," *Pharmaceutical Research*, vol. 25, no. 5, pp. 1165–1179, 2012.
- [5] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, and M. Port, "Recent advances in Iron oxide nanocrystal technology for medical imaging," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 14, pp. 1471–1504, 2006.
- [6] J. Puppi, R. R. Mitry, M. Modo, A. Dhawan, K. Raja, and R. D. Hughes, "Use of a clinically approved Iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes," *Cell Transplantation*, vol. 20, no. 6, pp. 963–975, 2011.
- [7] E. Sadauskas, H. Wallin, M. Stoltenberg et al., "Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 4, article 10, 2007.
- [8] D. Olmedo, M. B. Guglielmotti, and R. L. Cabrini, "An experimental study of the dissemination of titanium and zirconium in the body," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 13, no. 8, pp. 793–796, 2002.
- [9] S. J. So, I. S. Jang, and C. S. Han, "Effect of micro/nano silica particle feeding for mice," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 8, no. 10, pp. 5367–5371, 2008.
- [10] K. Unfried, C. Albrecht, L.-O. Klotz, A. Von Mikecz, S. Grether-Beck, and R. P. F. Schins, "Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms," *Nanotoxicology*, vol. 1, no. 1, pp. 52–71, 2007.
- [11] F. Thaveau, J. Zoll, O. Rouyer et al., "Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 46, no. 3, pp. 541–547, 2007.
- [12] A. Meyer, J. Zoll, A. L. Charles et al., "Skeletal muscle mitochondrial dysfunction during chronic obstructive pulmonary disease: central actor and therapeutic target," *Experimental Physiology*, vol. 98, no. 6, pp. 1063–1078, 2013.
- [13] H. A. Jeng and J. Swanson, "Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells," *Journal of Environmental Science and Health, A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, vol. 41, no. 12, pp. 2699–2711, 2006.
- [14] J. Xu, E. Marzetti, A. Y. Seo, J.-S. Kim, T. A. Prohla, and C. Leeuwenburgh, "The emerging role of Iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 131, no. 7-8, pp. 487–493, 2010.
- [15] C. Au, L. Mutkus, A. Dobson, J. Riffle, J. Lalli, and M. Aschner, "Effects of nanoparticles on the adhesion and cell viability on astrocytes," *Biological Trace Element Research*, vol. 120, no. 1–3, pp. 248–256, 2007.
- [16] H. L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, and L. Möller, "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 21, no. 9, pp. 1726–1732, 2008.
- [17] M.-T. Zhu, B. Wang, Y. Wang et al., "Endothelial dysfunction and inflammation induced by Iron oxide nanoparticle exposure: risk factors for early atherosclerosis," *Toxicology Letters*, vol. 203, no. 2, pp. 162–171, 2011.
- [18] Y. Baratli, A. L. Charles, V. Wolff et al., "Impact of Iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling," *Toxicology in Vitro*, vol. 27, no. 8, pp. 2142–2148, 2013.
- [19] M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, and B. N. Ames, "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 23, pp. 10771–10778, 1994.
- [20] A. Y. Seo, J. Xu, S. Servais et al., "Mitochondrial Iron accumulation with age and functional consequences," *Aging Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 706–716, 2008.

- [21] H. Basti, L. Ben Tahar, L. S. Smiri et al., "Catechol derivatives-coated Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles as potential MRI contrast agents," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 341, no. 2, pp. 248–254, 2010.
- [22] 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. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [23] R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1996.
- [24] A.-L. Charles, A.-S. Guilbert, J. Bouitbir et al., "Effect of post-conditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping," *British Journal of Surgery*, vol. 98, no. 4, pp. 511–516, 2011.
- [25] Z. Mansour, J. Bouitbir, A. L. Charles et al., "Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 55, no. 2, pp. 497.e1–505.e1, 2012.
- [26] R. S. Balaban, S. Nemoto, and T. Finkel, "Mitochondria, oxidants, and aging," *Cell*, vol. 120, no. 4, pp. 483–495, 2005.
- [27] E. Cadenas and K. J. A. Davies, "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, no. 3-4, pp. 222–230, 2000.
- [28] A. Lejay, A. Meyer, A. I. Schlagowski et al., "Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 50, pp. 101–105, 2014.
- [29] D. Boffoli, S. C. Scacco, R. Vergari et al., "Ageing is associated in females with a decline in the content and activity of the b-c1 complex in skeletal muscle mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, vol. 1315, no. 1, pp. 66–72, 1996.
- [30] L. K. Kwong and R. S. Sohal, "Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 373, no. 1, pp. 16–22, 2000.
- [31] B. Ventura, M. L. Genova, C. Bovina, G. Formiggini, and G. Lenaz, "Control of oxidative phosphorylation by complex I in rat liver mitochondria: implications for aging," *Biochimica et Biophysica Acta—Bioenergetics*, vol. 1553, no. 3, pp. 249–260, 2002.
- [32] A. Navarro and A. Boveris, "Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 287, no. 5, pp. R1244–R1249, 2004.
- [33] A. Navarro and A. Boveris, "The mitochondrial energy transduction system and the aging process," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 292, no. 2, pp. C670–C686, 2007.
- [34] A. Navarro, C. Gomez, J. M. López-Cepero, and A. Boveris, "Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 286, no. 3, pp. R505–R511, 2004.
- [35] H. Bakala, E. Delaval, M. Hamelin et al., "Changes in rat liver mitochondria with aging: Ion protease-like activity and N-carboxymethyllysine accumulation in the-matrix," *European Journal of Biochemistry*, vol. 270, no. 10, pp. 2295–2302, 2003.
- [36] E. Angelucci, G. M. Brittenham, C. E. McLaren et al., "Hepatic Iron concentration and total body Iron stores in thalassemia major," *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 5, pp. 327–331, 2000.
- [37] J. C. Wood, "Diagnosis and management of transfusion Iron overload: the role of imaging," *American Journal of Hematology*, vol. 82, no. 12, supplement, pp. 1132–1135, 2007.
- [38] M. D. R. Castro, E. Suarez, E. Kraiselburd et al., "Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys," *Experimental Gerontology*, vol. 47, no. 1, pp. 29–37, 2012.
- [39] H. R. Modi, S. S. Katyare, and M. A. Patel, "Ageing-induced alterations in lipid/phospholipid profiles of rat brain and liver mitochondria: implications for mitochondrial energy-linked functions," *Journal of Membrane Biology*, vol. 221, no. 1, pp. 51–60, 2008.
- [40] G. Serviddio, F. Bellanti, A. D. Romano et al., "Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart," *Redox Report*, vol. 12, no. 1-2, pp. 91–95, 2007.
- [41] J. Xu, M. D. Knutson, C. S. Carter, and C. Leeuwenburgh, "Iron accumulation with age, oxidative stress and functional decline," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 8, Article ID e2865, 2008.
- [42] J. Xu, E. Marzetti, A. Y. Seo, J.-S. Kim, T. A. Prolla, and C. Leeuwenburgh, "The emerging role of Iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 131, no. 7-8, pp. 487–493, 2010.
- [43] J. Schnorr, M. Taupitz, S. Wagner, H. Pilgrimm, J. Hansel, and B. Hamm, "Age-related blood half-life of particulate contrast material: experimental results with a USPIO in rats," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 12, no. 5, pp. 740–744, 2000.
- [44] M. Altun, E. Edström, E. Spooner et al., "Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats," *Muscle and Nerve*, vol. 36, no. 2, pp. 223–233, 2007.
- [45] S. H. Jung, L. R. DeRuisseau, A. N. Kavazis, and K. C. DeRuisseau, "Plantaris muscle of aged rats demonstrates Iron accumulation and altered expression of Iron regulation proteins," *Experimental Physiology*, vol. 93, no. 3, pp. 407–414, 2008.
- [46] J. Xu, J. C. Y. Hwang, H. A. Lees et al., "Long-term perturbation of muscle Iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy," *Experimental Gerontology*, vol. 47, no. 1, pp. 100–108, 2012.
- [47] B. E. Bulvik, E. Berenshtein, A. M. Konijn et al., "Aging is an organ-specific process: changes in homeostasis of Iron and redox proteins in the rat," *Age*, vol. 34, no. 3, pp. 693–704, 2011.
- [48] J. C. Duvinneau, C. Piskernik, S. Haindl et al., "A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free Iron, and free Iron-mediated mitochondrial dysfunction," *Laboratory Investigation*, vol. 88, no. 1, pp. 70–77, 2008.
- [49] H. Chen, B. Liu, T. J. Lukas, G. Suyeoka, G. Wu, and A. H. Neufeld, "Changes in Iron-regulatory proteins in the aged rodent neural retina," *Neurobiology of Aging*, vol. 30, no. 11, pp. 1865–1876, 2009.
- [50] V. Gogvadze, P. B. Walter, and B. N. Ames, " Fe^{2+} induces a transient Ca^{2+} release from rat liver mitochondria," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 398, no. 2, pp. 198–202, 2002.
- [51] V. Gogvadze, P. B. Walter, and B. N. Ames, "The role of Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 414, no. 2, pp. 255–260, 2003.
- [52] A. Mukhopadhyay, N. Joshi, K. Chattopadhyay, and G. De, "A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles

- and their prevention of the reduction of cytochrome C,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 4, no. 1, pp. 142–149, 2012.
- [53] W. Kai, X. Xiaojun, P. Ximing, H. Zhenqing, and Z. Qiqing, “Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 6, article 480, 2011.
- [54] L. Barhoumi and D. Dewez, “Toxicity of superparamagnetic Iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*,” *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 647974, 11 pages, 2013.

DISCUSSION GENERALE

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux effets des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) *in vitro* sur la respiration mitochondriale et *in vivo* sur la fonction hépatique.

Les résultats des différentes recherches concernant la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer retrouvées sont contradictoires et beaucoup reste encore à découvrir. Généralement, les réponses toxiques de nanoparticules observées *in vitro* ne sont pas reproductibles *in vivo* (Mahmoudi et al., 2010). Ceci est dû au principe d'homéostasie que possède le corps humain pour neutraliser les effets nuisibles et par ailleurs, il y a une certaine divergence dans la littérature entre les méthodes utilisées *in vivo* par rapport à celle *in vitro* en ce qui concerne l'évaluation toxicologique et l'interprétation des résultats.

Cependant, dans un premier temps, les essais *in vitro* peuvent sembler préférables, étant plus simple, plus rapide et sans problème d'éthique par comparaison aux études *in vivo* (Sayes et al., 2007).

1) Etude 1

Cette première étude *in vitro* a pour but est de déterminer si les nanoparticules d'oxyde de fer altèrent la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau de cinq organes caractérisés par des capacités oxydatives différentes.

Ainsi, nous avons incubé pendant 30 min les mitochondries isolées du cerveau, cœur, poumon, foie et des reins avec chacune des différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer (100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$) et nous avons déterminé la respiration des différents complexes de la chaîne mitochondriale ainsi que le couplage mitochondrial.

Nos résultats montrent que l'exposition aux différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer (100, 200, 300 et 500 $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}$) n'altère pas la respiration des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (I, II, III, et IV) au niveau des mitochondries isolées du cerveau, cœur, poumon, foie et rein, choisis du fait de leurs capacités de détoxification de l'organisme et de leurs capacités oxydatives différentes.

En ce qui concerne les études *in vitro*, plusieurs paramètres comme le revêtement des nanoparticules, la taille, le temps d'incubation, la concentration des nanoparticules appliquée peuvent influencer le résultat de l'effet des nanoparticules et méritent d'être discutés.

En effet Ying et Hwang (2010) ont rapporté que la couche de revêtement appliquée au niveau des nanoparticules pourrait faire changer le résultat. Le facteur taille des nanoparticules pourrait être aussi important. Nous avons choisi les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) de taille 9 nm. Elles sont utilisées comme des remarquables agents de contraste qui ont le potentiel d'améliorer l'évaluation des métastases axillaires des ganglions lymphatiques chez des patients atteints de cancer du sein (Harada et al., 2007). Li et al. (2012) ont montré que des substitutes thermiques liés aux nanoparticules d'oxyde de fer (TCLSPION) avec la même taille que nos nanoparticules pourraient être utilisés comme de nouvelles plateformes d'imagerie de tumeurs et de thérapie de contrôle. Salnikov et al. (2007) ont montré que la membrane externe mitochondriale n'est pas perméable aux particules de 6 nm alors que celles de 3 nm entrent au niveau de l'espace inter membranaire mitochondrial des cellules perméabilisées et des mitochondries isolées du cœur.

Ainsi, nos nanoparticules d'oxyde de fer de taille 9 nm pourraient être trop volumineuses pour pénétrer la mitochondrie isolée. Nous ne pouvons pas exclure une telle hypothèse, mais comme il a été précédemment cité, les nanoparticules peuvent montrer une toxicité mitochondriale même si elles ne peuvent pas entrer dans la mitochondrie (Au et al., 2007).

En ce qui concerne le facteur concentration Naqvi et al. (2010) ont montré que pour des concentrations basses de nanoparticules d'oxyde de fer (25-200 $\mu\text{g/ml}$) incubées pendant 3h avec les cellules de murine macrophage (J774), la viabilité cellulaire est supérieure à 95% tandis que pour des concentrations plus forte (500 $\mu\text{g/ml}$) et une durée d'incubation plus longue (6h), la viabilité cellulaire est réduite de 75 à 60%. Karlsson et al. (2008) ont montré que la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer était absente ou très basse au niveau des cellules humaines épithéliales du poudon jusqu'à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ et Jeng et Swanson. (2006) ont montré que les nanoparticules Fe_3O_4 n'avaient aucun effet mesurable sur les cellules jusqu'à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ et Hussain et al. (2005) ont montré que les nanoparticules d'oxyde de fer ne montrent aucun effet aux faibles doses (10-50 $\mu\text{g/ml}$) alors qu'elles montrent un effet toxique à des doses plus élevées (100–250 $\mu\text{g/ml}$).

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'exposer les mitochondries des différents organes (cerveau, cœur, poudon, foie et reins) à une large gamme de concentrations de nanoparticules (100, 200, 300 et 500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$). Nous avons aussi examiné l'effet dose en appliquant une forte concentration (500 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$).

En ce qui concerne la durée d'exposition, Buyukhatipoglu et Clyne. (2011) ont montré que les effets de l'exposition des cellules endothéliales aux nanoparticules d'oxyde de fer dépendent de la formation dose et temps-dépendante des espèces réactives à l'oxygène (ERO) intracellulaires. La formation de ces espèces augmente significativement jusqu'à une concentration de 0,5-1,0 mg/ml d'oxyde de fer et les ERO augmentent significativement après 2h d'exposition à 0,5 mg/ml de nanoparticules. La relative courte période d'exposition de nos organes aux nanoparticules (30 min) pourrait expliquer l'inaltération mitochondriale observée au niveau de notre étude. Cependant, il est important de noter qu'au niveau de l'étude citée, la concentration ainsi que la taille des nanoparticules (20 - 40 nm) sont beaucoup plus élevés que celle de notre étude.

En outre, la période d'incubation varie beaucoup au niveau des données publiées, s'étendant de 1h (Costa et al., 2010) à 24h (Hussain et al., 2005). Costa et al. (2010) ont montré que 1h d'incubation était suffisante pour que les nanoparticules d'argent puissent diminuer la respiration mitochondriale, mais comme Steib et al. (2013) ont montré qu'il existe une production accrue d'ERO après une exposition de 30 min des cardiomyocytes au Diltiazem et N-Acetylcysteine, nous avons décidé de soumettre les mitochondries à 30 min d'incubation.

En ce qui concerne le complexe IV, il pourrait y avoir besoin d'une discussion supplémentaire. En effet, bien que nous n'observons pas de différence significative par comparaison avec les valeurs témoins de la respiration mitochondriale, nous avons constaté une diminution de la V_{tmpd} du cœur en comparant les nanoparticules Fe_3O_4 (200 $\mu g/ml$ vs 500 $\mu g/ml$; $p < 0,05$) et celle de la V_{tmpd} du poumon en comparant les nanoparticules Fe_3O_4 (100 $\mu g/ml$ vs 500 $\mu g/ml$; $p < 0,05$). D'après Mukhopadhyay et al. (2012), les nanoparticules Fe_3O_4 présentent un magnétisme considérable à température ambiante et leurs interactions avec le cytochrome c mènerait à la réduction de la protéine. De plus, les mêmes traitements ont changé l'état redox du cytochrome c (Kai et al., 2011) et de façon intéressante, la concentration utilisée au niveau de cette étude était comparable à notre plus forte concentration (0,5 mg/ml).

2) Etude 2

La deuxième étude *in vitro* compare les effets potentiels des nanoparticules d'oxyde de fer sur la mitochondrie de rats âgés.

Les résultats retrouvés pour cette étude sont complètement différents de ceux retrouvés au niveau de la mitochondrie jeune. En effet après une incubation de 30 min avec chacune des différentes concentrations de nanoparticules (250, 300 et 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$), on observe une altération de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique des rats âgés.

En effet, Shigenaga et al. (1994) ont montré que l'accumulation de fer liée à l'âge augmente le potentiel redox pour le fer et peut ainsi promouvoir le stress oxydant et des dégâts mitochondriaux. Plus récemment Seo et al. (2008) ont rapporté que l'accumulation de fer dépend de l'âge mitochondrial et peut ainsi augmenter le dysfonctionnement mitochondrial et les dégâts oxydatifs favorisant ainsi la possibilité d'apoptose. Donc, l'âge pourrait modifier la sensibilité de la mitochondrie par rapport aux nanoparticules.

Le foie apparait comme un organe clé dans la détoxification du fer et des nanoparticules. Pour cela, nous avons examiné et comparé les effets de trois concentrations différentes de Fe_3O_4 nanoparticules (250, 300 et 350 $\mu\text{g/ml}$) sur le foie de rat jeune (3mois) et de rat âgé (18mois) et plus spécifiquement nous avons examiné leur effet sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que sur le couplage mitochondrial.

Les principaux résultats obtenus montrent que les rats âgés sont plus sensibles aux effets des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique est altérée indépendamment de la concentration des nanoparticules de Fe_3O_4 utilisées. De plus les concentrations utilisées (250, 300, and 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$) altèrent aussi le couplage mitochondrial hépatique des rats âgés. Une telle altération n'est pas observée en utilisant une solution de Fe^{3+} sous forme non particulaire de concentration 350 $\mu\text{g/ml}$.

Plusieurs études montrent que les mitochondries sont des sources majeures de production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) et sont affectées durant le vieillissement (Balaban et al., 2005). En fait, les mitochondries issues des tissus des rats âgés utilisent l'oxygène inefficacement, ce qui détériore la synthèse de l'ATP et entraîne une augmentation de la production d'oxydants (Cadenas et Davies, 2000). Le dommage oxydatif concerne principalement les activités de transport des électrons au niveau des complexes de la

membrane mitochondriale intérieure (Lejay et al., 2014), ce qui est spécifiquement modifié pendant le vieillissement (Boffoli et al., 1996 ; Kwong and Sohal, 2000).

En ce qui concerne l'effet de l'âge *per se* sur la respiration mitochondriale hépatique, il existe des études contradictoires, plusieurs études ont montré que sous l'effet de l'âge il y a eu diminution de l'activité de transfert des électrons au niveau des complexes I et IV des mitochondries des rats âgés (30 mois) par comparaison avec celles des rats jeunes (4 mois) (Navarro et al., 2004 ; Ventura et al., 2002). D'un autre côté, Bakala et al (2003) ont montré l'absence de différence significative de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale entre un rat âgé de 10 mois et un autre âgé de 27 mois quelque soit le substrat utilisé.

En ce qui concerne notre étude, on a remarqué que les nanoparticules d'oxyde de fer n'altèrent pas les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale hépatique de rats jeunes (3 mois) et de même pour le couplage mitochondrial qui a conservé des valeurs proches de celles du témoin. Ce résultat retrouvé est en accord avec nos précédents travaux publiés (Baratli et al., 2013). A nos connaissances, il n'existe pas de données disponibles qui ont étudié l'effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur la mitochondrie de foie de rats âgés. Ceci est particulièrement intéressant car le foie est un organe de stockage majeur de fer (Angelucci et al., 2000 ; Wood, 2007).

De plus, les résultats obtenus sont différents quand on a appliqué les mêmes concentrations de nanoparticules Fe_3O_4 sur des mitochondries de foie de rats âgés (18 mois). En fait ces mitochondries incubées avec des nanoparticules d'oxyde de fer à des concentrations de 250, 300, et 350 $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ ont montré une diminution significative au niveau de la V_{max} , V_{succ} et la V_{tmp} qui correspondent à l'activité des complexes I, II, III, et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale et cette diminution est observable aussi pour le couplage mitochondrial.

Ce résultat peut être expliqué par une fragilisation de la mitochondrie qui semble augmenter avec l'âge. Ainsi Navarro and Boveris. (2004) ont rapporté que les mitochondries isolées des organes d'animaux d'âge avancé vieillissent en terme cytosolique, de stress oxydant mitochondrial avec une perte des activités enzymatiques. En plus, plusieurs études ont montré que le vieillissement induit une perte de la fonction mitochondriale du foie des rongeurs et des singes (Castro Mdel et al., 2012 ; Serviddio et al., 2007). De même des études ont constaté une accumulation du fer sur l'intégrité de la mitochondrie sous l'effet de l'âge (Seo et al., 2008 ; Xu et al., Xu et al., 2010).

En examinant la pharmacocinétique des nanoparticules d'oxyde de fer, Schnorr et al. (2000) ont montré que la demi-vie et les changements de signal au niveau du sang et du foie varient significativement avec l'âge. Ainsi l'accumulation du fer considéré comme une caractéristique du processus de vieillissement (Altun et al., 2007 ; Jung et al., 2008 ; Xu et al., 2012) pourrait être associé avec une augmentation du fer au niveau de la mitochondrie. En particulier dans des conditions de stress cellulaire, ceci pourrait être un facteur potentiel de dysfonctionnement mitochondrial lié à l'âge (Bulvik et al., 2011 ; Duvigneau et al., 2008 ; Seo et al., 2008 ; Xu et al., 2010).

Les dégâts mitochondriaux sous l'effet de l'accumulation excessive du fer apparaît comme un facteur intrinsèque contribuant à la baisse de la perméabilité du pore de transition ainsi que de la fonction mitochondriale, ce qui peut potentiellement mener à la dégénérescence cellulaire (Chen et al., 2009 ; Gogvadze et al., 2002, 2003).

Conformément à nos données qui montrent une altération du complexe IV sous l'effet des nanoparticules, Mukhopadhyay et al. (2012) ont montré que l'interaction des nanoparticules Fe_3O_4 avec le cytochrome c a mené à la réduction de la protéine. De plus, Kai et al. (2011) ont montré une diminution dose dépendante du potentiel de la membrane mitochondriale après une exposition aux nanoparticules Fe_3O_4 avec une concentration de 1mg/ml. Pris dans leur globalité, ces données confirment que l'âge module probablement la toxicité des nanoparticules Fe_3O_4 au niveau du foie.

Les résultats rapportés par Bakala et al. (2003) sont probablement l'explication de nos résultats au moins en partie, ils ont montré que l'accumulation de protéines oxydés et de carboxymethyl protéine possède des effets délétères au niveau de la matrice concomitants avec la perte de l'activité de la protéase des nanoparticules d'oxyde de fer appelés « IONPs protease ». Ces nanoparticules pourraient affecter la capacité de la mitochondrie âgée à répondre au stress supplémentaire. D'un autre coté et pour confirmer si les effets observés sont spécifiques à l'oxyde de fer dans sa forme nanoparticulaire, nous avons exposé les mitochondries hépatiques des rats âgés à une solution de Fe^{3+} , et de façon intéressante, aucun effet délétère n'a été observé au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Donc l'effet hépatotoxique observé serait bien lié à la forme nanoparticulaire de l'oxyde de fer.

3) Etude 3

En ce qui concerne la partie, *in vivo*, pour étudier l'état hépatique après exposition aux nanoparticules Fe_3O_4 , on a mesuré les différents paramètres de stress oxydant, déterminé l'activité plasmatique des transaminases et de la lactate déshydrogénase et enfin on a réalisé une étude histologique.

En raison de leur réactivité de surface, les nanoparticules sont suspectées et ont été parfois démontrées comme étant capables d'induire la production d'espèce réactives de l'oxygène (ERO) et de provoquer un stress oxydant pour la cellule (Foucaud et al., 2007; Garza et al., 2008). Il s'agit donc actuellement d'une des principales hypothèses pour expliquer leur mode d'action dans la cellule.

Le foie est un des organes cibles et un site important d'accumulation des nanoparticules (Cherukuri et al., 2006; Yang et al., 2007, 2008). Plusieurs études ont rapporté que la majorité des nanoparticules d'oxyde de fer injectées sont captées par le système réticulo-endothélial (RES), en particulier au niveau des cellules du foie kupffer (Chouly et al., 1996; Okon et al., 1994 ; Jalilian et al., 2009). De même Wang et al. (2010) ont montré que le foie et la rate étaient les principaux tissus et organes cibles pour les nanoparticules Fe_3O_4 .

Par ailleurs, Briley-Saebo et al. (2004) ont montré que suite à une injection intraveineuse des nanoparticules d'oxyde de fer (5mg/kg), il y a distribution égale des nanoparticules entre les cellules endothéliales et les cellules de kupffer hépatiques. De plus, selon une étude de Jain et al. (2008) les nanoparticules d'oxyde de fer injectées sont localisées à 55% au niveau du foie 6h après l'injection.

Les résultats de notre étude ont montré que le traitement oral aigu de rats Wistar par les nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 entraîne une hépatotoxicité qui diffère en fonction de la dose d'administration et en fonction du temps.

En effet, l'exposition aiguë aux nanoparticules d'oxyde de fer à la concentration de 40 mg Fe_3O_4 /kg induit une augmentation de la concentration du MDA hépatique, en accord avec l'étude de Ma et al., 2012. Ce résultat pourrait être la cause de la désintégration de la membrane cellulaire suite au phénomène peroxydation lipidique déjà constaté au niveau histologique. Cependant, pour le traitement avec 20 mg Fe_3O_4 /kg, on a constaté une diminution du taux du MDA à 5j. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le fer agirait

comme étant un antioxydant vis-à-vis des membranes en les protégeant de la peroxydation. Un tel comportement qui dépend de la dose serait lié à l'interaction du fer avec les membranes, délicat à interpréter à cette échelle.

Les résultats obtenus montrent également qu'à la concentration de 40 mg Fe₃O₄/kg, les nanoparticules induisent après 24h, 48h et 5j du traitement, une augmentation de la CAT et de la GPX. Cet effet s'expliquerait par la forte présence du peroxyde d'hydrogène. En effet, l'augmentation de la CAT et la GPX est associée à leurs interactions avec le H₂O₂ puisqu'elles sont responsables de son élimination. L'activité de la SOD totale est inchangée mais cette enzyme montre une fluctuation pour la concentration 20 mg Fe₃O₄/kg. Cette fluctuation serait due soit à une interaction directe entre le fer et les cofacteurs de la SOD à cette concentration et/ou à une interaction indirecte dans les processus de réaction de Fenton. Avec la dose de 40 mg Fe₃O₄/kg, il y aurait une interaction tardive vers le 30ème jour puisque l'activité de la SOD hépatique n'a pas été modifiée avant cette période.

Notre étude montre donc une perturbation des paramètres de stress oxydant suite au traitement aigu aux nanoparticules d'oxyde de fer pour les deux doses utilisées (20mg Fe₃O₄/kg et 40mg Fe₃O₄/kg), qui est plus prononcée pour la forte dose. Cette perturbation est visible surtout à 24h et 5jours post traitement.

L'explication la plus probable à cette perturbation est la surproduction d'ERO intracellulaires. Ces ERO pourrait être libérées suite à l'interaction entre les particules et les composants cellulaires comme par exemple la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique.

Les systèmes de régulation sont donc dépassés et une partie des radicaux libres est alors non consommée : la cellule subit alors un stress oxydant. Lors de ce stress, les radicaux libres non consommés provoquent des lésions directes sur les molécules biologiques (protéines, lipides, ADN), mais aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Valko et al., 2007 ; Toyokuni, 2002). A terme, cela peut provoquer la mort cellulaire (Lum et al., 2001). Ceci pourrait expliquer la nécrose observée sur nos coupes.

On peut émettre l'hypothèse que le stress oxydant pourrait être visible par une activation des systèmes de régulation afin de contrer la surproduction d'ERO ce qui se traduit par une

augmentation des activités enzymatiques comme la SOD, la catalase (CAT) et celle de la peroxydation lipidique (MDA) (Podda abnd Grundmann-Kollmann, 2001 ; Sardesai, 1995).

Au niveau de notre étude, les nanoparticules utilisées sont des oxydes de fer (Fe_3O_4) et selon plusieurs études, le fer étant un métal de transition, il peut produire des ERO plus particulièrement des radicaux hydroxyles en agissant comme des catalyseurs au niveau des réactions de type Fenton (Lewinski et al., 2008 ; Risom et al., 2005).

La magnétite (Fe_3O_4) qui est le mélange de FeO et Fe_2O_3 , n'est pas stable et peut facilement subir une oxydation sous l'effet de l'air, la lumière et l'humidité pour former la maghémite (Fe_2O_3) [$\text{Fe}_3\text{O}_4 + 2\text{H}^+ \rightarrow \gamma \text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$](Laurent et al., 2008) et selon la réaction de Fenton, le H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) [$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$](Valko., 2006). Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss [$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et de fer permet la production de radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$). L' $\text{OH}^\bullet$, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires (Apopa et al., 2009 ; Puntarulo, 2005 ; Srinivas et al., 2012). L' $\text{OH}^\bullet$ apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ERO (Kehrer, 2000). Ceci pourrait être un mécanisme fort probable dans le cas de notre traitement.

Parmi les mécanismes possibles expliquant ceci, est l'augmentation de la concentration du fer dans l'organisme (Briley-Saebo et al., 2004 ; Wang et al., 2010). En effet, après l'absorption dans le sang, un grand nombre de nanoparticules Fe_3O_4 ont été ingéré par des macrophages mononucléaires dans le foie, ensuite, le foie a sorti le fer ferrique qui a participé au cycle du métabolisme de fer in vivo aboutissant à une diminution de la concentration de nanoparticules Fe_3O_4 (Wang et al., 2010). De plus Moore et al. (2004) ont montré qu'en temps normal, environ 80% de fer sont combinés avec la transferrine et entrent dans la moelle osseuse et participent à la synthèse de réticulocytes. Puis environ 4 à 6 jours plus tard, ce fer entre à la circulation de nouveau, menant à augmenter la teneur en fer dans le sang. Un dosage du fer,

de la transferrine et de la ferritine serait nécessaire pour mieux comprendre ce mécanisme cytotoxique.

La déplétion des groupements sulfhydriles enregistré, renseigne sur l'état du pouvoir réducteur de la cellule qui concerne surtout le taux de GSH réduit. Cette déplétion explique l'état des stress oxydant observé.

Les transaminases sont présentes dans tous les tissus, mais leur présence dans le sang à une concentration élevée est souvent liée à des maladies du myocarde (infarctus) ou du foie (nécrose, hépatite). Dans ces cas, les niveaux sériques des transaminases sont augmentés. Cet effet est retrouvé au niveau de nos résultats pour l'activité de l'aspartate amino transférase (ASAT) qui montrent une augmentation significative 5 jours après gavage des nanoparticules d'oxyde de fer au niveau des groupes de rats traités avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ et 40mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$. Par ailleurs, Jain et al. (2008) ont montré une augmentation significative du taux de l'ASAT 24h après injection des nanoparticules Fe_2O_3 chez des rats Sprague-Dawley. Cependant les mêmes auteurs n'ont pas enregistré des modifications dans l'activité de l'ALAT. Aussi Kumari et al. (2013) ont montré une augmentation significative du taux d'ASAT aux doses de 1000 mg/kg et 2000 mg/kg pour un traitement oral aigu avec des nanoparticules Fe_2O_3 , alors que le taux d'ALAT a augmenté significativement à seulement la dose de 2000 mg/kg. De même Lin et al. (2008) après administration par gavage pendant 4 semaines de nanoparticules Fe_3O_4 ont montré des taux d'ALAT et d'ASAT plus élevés que ceux des témoins.

Le dosage du lactate déshydrogénase (LDH) est souvent utilisé pour détecter des atteintes tissulaires au niveau du foie, du poumon et des muscles. Une augmentation de la LDH dans le sérum reflète une cytolysse tissulaire. En effet une étude réalisée par Kumari et al. (2013) a montré que l'exposition aux nanoparticules induit une élévation dose-dépendant du taux de LDH, ce qui entraîne des altérations tissulaires. Dans notre étude les résultats obtenus montrent une augmentation significative du taux de LDH à 5jours post gavage au niveau du groupe traité avec 40 mg/kg de nanoparticules Fe_3O_4 alors que celui traité avec 20 mg/kg, ne montre aucune modification. L'altération de l'activité des transaminases et de LDH observée dans notre étude confirme la lyse tissulaire observée sur nos coupes histologiques.

En effet, cette étude a révélée que l'exposition aiguë aux nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une réponse inflammatoire périvasculaire au niveau du foie qui se traduit plus tardivement par l'apparition de figures nécrotiques dont l'intensité dépend de la dose administrée et du temps. Ces résultats obtenus sont concordants avec des études réalisées avec

les nanoparticules Fe_3O_4 . En effet Lin et al. (2008) ont montré une légère hépatotoxicité avec une dégénérescence hépatique avec quelques infiltrations observées lors de l'analyse pathologique. De même Ma et al. (2012) ont montré que les souris traitées avec les nanoparticules Fe_3O_4 ont subi sur le plan histologique des dégâts hépatiques plus grands avec des doses de nanoparticules croissantes.

Si les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) ne présentent pas de toxicité au niveau des mitochondries isolées à partir d'organes jeunes, il n'en est pas de même au niveau du foie chez des animaux plus âgés. L'atteinte mitochondriale hépatique observée *in vitro* pourrait survenir en lien avec l'altération des capacités antioxydantes observées *in vivo*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis de caractériser les nanoparticules utilisées et d'étudier leurs effets sur le plan *in vivo* et *in vitro*.

Les nanoparticules utilisées sont les nanoparticules d'oxydes de fer et plus spécifiquement la magnétite Fe_3O_4 .

Les études de caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) par la technique de diffraction des rayons X et la technique de microscopie électronique à transmission montrent que les particules sont sphériques, faiblement agglomérées, avec une taille nanométriques de diamètre moyen de 9 nm et possèdent une structure de type spinelle.

In vivo, le traitement oral aigu de rats Wistar par les nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une perturbation des paramètres du stress oxydant qui diffère en fonction de la dose d'administration et en fonction du temps.

Cette perturbation se traduit pour la dose de 20 mg/kg, par une diminution de la superoxyde dismutase (SOD) à 24h, la peroxydation lipidique (MDA) à 5j, le taux des groupements sulfhydriles à 5j et une augmentation de la catalase (CAT) à 24h. En ce qui concerne la dose de 40 mg/kg, on remarque une diminution de la SOD à 30j, le taux des groupements sulfhydriles à 48h et une diminution de la GPX, CAT et la MDA à 24h.

L'évaluation biochimique de l'atteinte hépatique après exposition aux nanoparticules Fe_3O_4 montre que l'activité de l'aspartate amino transférase présente une augmentation à 5j post traitement pour les deux doses administrées (20 mg/kg, 40 mg/kg) alors que l'activité de l'alanine amino-transférase, elle n'est pas affectée pour les mêmes doses. En ce qui concerne l'activité du lactate déshydrogénase (LDH) on remarque qu'elle présente qu'une augmentation à 5j pour la dose de 40 mg/kg.

En corrélation avec les perturbations des paramètres du stress oxydant, on assiste à une atteinte hépatique qui diffère en fonction de la dose d'administration et en fonction du temps. En effet, l'analyse histopathologique révèle que l'exposition aiguë aux nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une réponse inflammatoire périvasculaire au niveau du foie qui se traduit plus tardivement par l'apparition de figures nécrotiques dont l'intensité dépend de la dose administrée.

En effet, chez les rats traités avec 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on note l'apparition d'infiltrations inflammatoires après 24h de l'exposition et qui s'accroissent vers le 5ème jour alors que pour les rats recevant 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$, on observe une inflammation vers 24 h qui atteint un pic vers 48 h. On observe également pour la dose de 40 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{kg}$ une nécrose focale à partir de 24h qui devient zonale vers le 15ème jour post-exposition.

In vitro, le traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer a été subdivisé en deux parties : une première partie est consacrée pour l'étude des effets de la magnétite sur les mitochondries isolées de plusieurs organes de rat (cerveau, cœur, poumon, foie et rein) et une deuxième partie réalisée pour étudier l'effet de l'âge sur la toxicité mitochondriale hépatique des nanoparticules Fe_3O_4 .

En ce qui concerne la première partie, on constate que les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) n'altèrent pas les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (I, II, III, et IV) au niveau des mitochondries isolées à partir des cinq organes étudiés (Cerveau, Cœur, Poumon, Foie et Reins) quelque soit la concentration utilisée (100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de même pour le couplage mitochondrial. Ces cinq organes ayant été choisis vu leurs capacités de détoxification de l'organisme et de leurs capacités oxydatives différentes (Baratli Y et al., *Toxicol In Vitro* 2013, 27:2142-2148).

Pour la deuxième partie, nous avons montré pour la première fois que les rats âgés sont plus susceptibles à l'exposition des nanoparticules d'oxyde de fer en termes de respiration et de couplage mitochondrial. Ce travail confirme nos résultats initiaux trouvés dans la première partie sur le foie « jeune ». L'âge sera donc un élément déterminant à prendre en compte lors des analyses ultérieures de toxicité ainsi que dans les études précliniques et cliniques d'agents de contraste à l'état nanoparticulaire (Baratli Y et al., *Biomed Res Int* 2014, 474081).

En perspective, la partie, *in vivo*, peut être complétée par un traitement aigu de rats Wistar par les nanoparticules d'oxyde de fer en utilisant les mêmes concentrations (20 mg/kg, 40 mg/kg) sur un autre organe comme par exemple le rein et faire ainsi une comparaison des effets des nanoparticules Fe_3O_4 sur les différents paramètres du stress oxydant.

En ce qui concerne la partie, *in vitro*, elle peut être complétée par une culture cellulaire comme étudier les effets des nanoparticules Fe_3O_4 sur des myoblastes et étudier leurs effets

sur la respiration mitochondriale, la production des radicaux libres ainsi que la mesure du potentiel membranaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

A

Abramson, J., Svensson-Ek, M., Byrne, B., Iwata, S., 2001. Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1544, 1-9.

Adams, P.L., Lightowers, R.N., Turnbull, D.M., 1997. Molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 41, 268-270.

Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-LeFranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R., Bottero, J.Y., 2006. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ Sci Technol* 40, 4367-4373.

Al-Abadleh, H.A., Grassian, V.H., 2003. Oxide surfaces as environmental interfaces. *Surface Science Reports* 52, 63-161.

Altun, M., Edstrom, E., Spooner, E., Flores-Moralez, A., Bergman, E., Tollet-Egnell, P., Norstedt, G., Kessler, B.M., Ulfhake, B., 2007. Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats. *Muscle Nerve* 36, 223-233.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7915-7922.

Angelucci, E., Brittenham, G.M., McLaren, C.E., Ripalti, M., Baronciani, D., Giardini, C., Galimberti, M., Polchi, P., Lucarelli, G., 2000. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med* 343, 327-331.

Apopa, P.L., Qian, Y., Shao, R., Guo, N.L., Schwegler-Berry, D., Pacurari, M., Porter, D., Shi, X., Vallyathan, V., Castranova, V., Flynn, D.C., 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol* 6, 1.

B

Bakala, H., Delaval, E., Hamelin, M., Bismuth, J., Borot-Laloi, C., Corman, B., Friguet, B., 2003. Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem* 270, 2295-2302.

- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Baratli, Y., Charles, A.L., Wolff, V., Ben Tahar, L., Smiri, L., Bouitbir, J., Zoll, J., Piquard, F., Tebourbi, O., Sakly, M., Abdelmelek, H., Geny, B., 2013. Impact of iron oxide nanoparticles on brain, heart, lung, liver and kidneys mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling. *Toxicol In Vitro* 27, 2142-2148.
- Boffoli, D., Scacco, S.C., Vergari, R., Persio, M.T., Solarino, G., Laforgia, R., Papa, S., 1996. Ageing is associated in females with a decline in the content and activity on the b-c1 complex in skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1315, 66-72.
- Baysal, B.E., 2006. Role of mitochondrial mutations in cancer. *Endocr Pathol* 17, 203-212.
- Beckmann, N., Cannet, C., Babin, A.L., Ble, F.X., Zurbrugg, S., Kneuer, R., Dousset, V., 2009. In vivo visualization of macrophage infiltration and activity in inflammation using magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 272-298.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155.
- Barlow, P.G., Clouter-Baker, A., Donaldson, K., Maccallum, J., Stone, V., 2005. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. *Part Fibre Toxicol* 2, 11.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G., Curtis, A.S., 2004. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials* 25, 5405-5413.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Curtis, A.S., 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 24, 4551-4557.
- Beji, Z., Ben Chaabane T., Smiri, L.S., Ammar, S., Fiévet, F., Jouini, N., Grenèche, J.M., 2006. Synthesis of nickel–zinc ferrite nanoparticles in polyol: morphological, structural and magnetic studies. *Physica Status Solidi A Appl Res.* 203, 504-512.
- Ben Tahar, L., Artus, M., Ammar, S., Smiri, L.S., Richard, V., Vaulay, M.J., Greneche, J.-M., Fiévet, F., 2008. Magnetic properties of CoFe_{1.9}RE_{0.1}O₄ nanoparticles (RE = La, Ce, Nd, Eu, Tb, Ho) prepared in polyol. *J Magn Magn Mater* 320, 3242-3250.
- Bonnefont-Rousselot D., 1994. Irradiation des membranes cellulaires. *J Chim Phys* 91, 968-983.
- Borisov, V.B., 2002. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 23, 385-412.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., Rotig, A., 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11, 144-149.

Briere, J.J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Benit, P., Gimenez, A.P., Rustin, P., 2005. Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cell Mol Life Sci* 62, 2317-2324.

Briley-Saebo K, Bjornerud A, Grant D, Ahlstrom H, Berg T, Kindberg GM. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res.* 2004; 316(3):315–323.

Bulvik, B.E., Berenshtein, E., Konijn, A.M., Grinberg, L., Vinokur, V., Eliashar, R., Chevion, M.M., 2011. Aging is an organ-specific process: changes in homeostasis of iron and redox proteins in the rat. *Age (Dordr)* 34, 693-704.

Butterworth, J., Yates, C.M., Reynolds, G.P., 1985. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci* 67, 161-171.

C

Carr, A.C., Zhu, B.Z., Frei, B., 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 87, 349-354.

Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* 281, 32724-32727.

Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.

Castro Mdel, R., Suarez, E., Kraiselburd, E., Isidro, A., Paz, J., Ferder, L., Ayala-Torres, S., 2012. Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Exp Gerontol* 47, 29-37.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2050-2055.

Chaudeurge, A., Wilhelm, C., Chen-Tournoux, A., Farahmand, P., Bellamy, V., Autret, G., Menager, C., Hagege, A., Larghero, J., Gazeau, F., Clement, O., Menasche, P., 2011. Can magnetic targeting of magnetically labeled circulating cells optimize intramyocardial cell retention? *Cell Transplant* 21, 679-691.

- Chaudhary, A.K., Reddy, G.R., Blair, I.A., Marnett, L.J., 1996. Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 17, 1167-70.
- Chen, H., Liu, B., Lukas, T.J., Suyeoka, G., Wu, G., Neufeld, A.H., 2009. Changes in iron-regulatory proteins in the aged rodent neural retina. *Neurobiol Aging* 30, 1865-1876.
- Chen, H.J., Chung, F.L., 1996. Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol* 9, 306-12.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031.
- Cheng, K., Li, T.S., Malliaras, K., Davis, D.R., Zhang, Y., Marban, E., 2010. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res* 106, 1570-1581.
- Cherukuri, P., Gannon, C.J., Leeuw, T.K., Schmidt, H.K., Smalley, R.E., Curley, S.A., Weisman, R.B., 2006. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18882-18886.
- Choe, S., Chang, Y.Y., Hwang, K.Y., Khim, J., 2000. Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron. *Chemosphere* 41, 1307-1311.
- Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., Jallet, P., 1996. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul* 13, 245-255.
- Cornell, R. M., and Schwertmann, U., 1996. *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, Wiley-VCH Weinheim, Germany.
- Corot, C., Robert, P., Idee, J.M., Port, M., 2006. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1471-1504.
- Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.W., Arnheim, N., 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7370-7374.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 122-131.

D

Dakhlaoui, A., Bousnina, M.A., Smiri, L.S., Taibi, M., Leone, P., Schoenstein, F., N. Jouini, 2010. Elaboration of nickel nanoparticles by modified polyol process and their sparkplasma sintering, characterization and magnetic properties of the nanoparticles and the dense nano-structured material. *Mater Chem Phys* 123, 821-828.

Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., Brenner, C., 2008. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27, 285-299.

Dimroth, P., Kaim, G., Matthey, U., 2000. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. *J Exp Biol* 203, 51-59.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Duvigneau, J.C., Piskernik, C., Haindl, S., Kloesch, B., Hartl, R.T., Huttemann, M., Lee, I., Ebel, T., Moldzio, R., Gemeiner, M., Redl, H., Kozlov, A.V., 2008. A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free iron, and free iron-mediated mitochondrial dysfunction. *Lab Invest* 88, 70-77.

E

Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otin M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S., Brand, M.D., 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22, 4103-4110.

Edery, P., Gerard, B., Chretien, D., Rotig, A., Cerrone, R., Rabier, D., Rambaud, C., Fabre, M., Saudubray, J.M., Munnich, A., et al., 1994. Liver cytochrome c oxidase deficiency in a case of neonatal-onset hepatic failure. *Eur J Pediatr* 153, 190-194.

Elder, A.C., Gelein, R., Azadniv, M., Frampton, M., Finkelstein, J., Oberdorster, G., 2004. Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains. *Inhal Toxicol* 16, 461-471.

Elder, A.C., Gelein, R., Finkelstein, J.N., Cox, C., Oberdorster, G., 2000. Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhal Toxicol* 12 Suppl 4, 227-246.

Ernster, L., Forsmark-Andree, P., 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig* 71, S60-65.

F

Fontaine, E., Bernardi, P., 1999. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr* 31, 335-345.

Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F., Bernardi, P., 1998. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273, 12662-12668.

Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., Lopez-Barea, J., Peinado, J., 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ Pollut* 139, 214-223.

Foucaud, L., Wilson, M.R., Brown, D.M., Stone, V., 2007. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett* 174, 1-9.

G

Garza, K.M., Soto, K.F., Murr, L.E., 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int J Nanomedicine* 3, 83-94.

Gilkerson, R.W., Selker, J.M., Capaldi, R.A., 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546, 355-358.

Gogvadze, V., Walter, P.B., Ames, B.N., 2002. Fe(2+) induces a transient Ca(2+) release from rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 398, 198-202.

- Gogvadze, V., Walter, P.B., Ames, B.N., 2003. The role of Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 414, 255-260.
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R.S., Rutledge, J.C., Kennedy, I.M., Barakat, A.I., 2007. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* 115, 403-409.
- Grandjean, D., 2005. Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv Prat Vét* 22, 11-15.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gregus, Z., Fekete, T., Halaszi, E., Klaassen, C.D., 1996. Lipoic acid impairs glycine conjugation of benzoic acid and renal excretion of benzoylglycine. *Drug Metab Dispos* 24, 682-688.
- Gun'ko, V., Zarko, V., Leboda, R., Chibowski, E., 2001. Aqueous suspension of fumed oxides : particle size distribution and zeta potential. *Advances in colloid and interface science*, 91, 1-112.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15, 129-135.
- Gupta, A.K., Berry, C., Gupta, M., Curtis, A., 2003. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Trans Nanobioscience* 2, 255-261.
- Gupta, A.K., Curtis, A.S., 2004. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* 25, 3029-3040.
- Gupta, A.K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995-4021.
- Gupta, A.K., Wells, S., 2004. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobioscience* 3, 66-73.
- Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66-73.

- Hanini, A., Schmitt, A., Kacem, K., Chau, F., Ammar, S., Gavard, J., 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int J Nanomedicine* 6, 787-794.
- Harrison, R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 33, 774-797.
- Hillyer, J.F., Albrecht, R.M., 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci* 90, 1927-1936.
- Hong, J.H., Kim, M.J., Park, M.R., Kwag, O.G., Lee, I.S., Byun, B.H., Lee, S.C., Lee, K.B., Rhee, S.J., 2004. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107-115.
- Hofmann, A., Wenzel, D., Becher, U.M., Freitag, D.F., Klein, A.M., Eberbeck, D., Schulte, M., Zimmermann, K., Bergemann, C., Gleich, B., Roell, W., Weyh, T., Trahms, L., Nickenig, G., Fleischmann, B.K., Pfeifer, A., 2009. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 44-49.
- Hong, S., Leroueil, P.R., Janus, E.K., Peters, J.L., Kober, M.M., Islam, M.T., Orr, B.G., Baker, J.R., Jr., Banaszak Holl, M.M., 2006. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjug Chem* 17, 728-734.
- Hu, J., Chen, G., Lo, I.M., 2005. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Res* 39, 4528-4536.
- Hulbert, A.J., 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277-288.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., Michel, H., 2000. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8, 669-684.
- Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J., 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 975-983.

J

- Jain, T.K., Reddy, M.K., Morales, M.A., Leslie-Pelecky, D.L., Labhasetwar, V., 2008. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 5, 316-327.
- Jakobs, S., 2006. High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1763, 561-575.

- Jalilian, A.R., Panahifar, A., Mahmoudi, M., Akhlaghi, M., Simchi, A., 2009. Preparation and biological evaluation of [67 Ga]-labeled- superparamagnetic nanoparticles in normal rats. *Radiochimica Acta* 97, 51–56.
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 42, 821-826.
- Jani, P., McCarthy, D., Florence, A. T., 1994. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International journal of pharmaceutics* 105, 157-168.
- Jain, T.K., Reddy, M.K., Morales, M.A., Leslie-Pelecky, D.L., Labhasetwar, V., 2008. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 5, 316-327.
- Jankowska, E., Lukaszewska, J., 2013. [Potential exposure to silver nanoparticles during spraying preparation for air-conditioning cleaning]. *Med Pr* 64, 57-67.
- Jayakumar, O.D., Ganguly, R., Tyagi, A.K., Chandrasekharan, D.K., Nair, C.K., 2009. Water dispersible Fe₃O₄ nanoparticles carrying doxorubicin for cancer therapy. *J Nanosci Nanotechnol* 9, 6344-6348.
- Jeng, H.A., Swanson, J., 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 41, 2699–2711.
- Jenkins, R. R., 2000. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr* 72(suppl), 670-674.
- Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W., 1992. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* (1985) 73, 1854-1859.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Cavener, D.R., Wek, R.C., 2003. Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol* 23, 5651-5663.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci Total Environ* 338, 3-14.
- Jolivet, J.P., Chaneac, C., Tronc, E., 2004. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem Commun (Camb)*, 481-487.
- Jung, S.H., DeRuisseau, L.R., Kavazis, A.N., DeRuisseau, K.C., 2008. Plantaris muscle of aged rats demonstrates iron accumulation and altered expression of iron regulation proteins. *Exp Physiol* 93, 407-414.

K

Kai, W., Xiaojun, X., Ximing, P., Zhenqing, H., Qiqing, Z., 2011. Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res Lett* 6, 480.

Kanel, S.R., Manning, B., Charlet, L., Choi, H., 2005. Removal of arsenic(III) from groundwater by nanoscale zero-valent iron. *Environ Sci Technol* 39, 1291-1298.

Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.

Khalil, A., 2002. [Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis]. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 662-669.

Kitamura, M., 2011. Control of NF-kappaB and inflammation by the unfolded protein response. *Int Rev Immunol* 30, 4-15.

Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12-15.

Krause, K.H., 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schultz H *et al.* 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lungs epithelium to extrapulmonary organs in size dependent but very low. *J Tox Environ Health* 65 (20) : 1513-1530

Krinsky, N.I., 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7, 617-635.

Kumari, M., Rajak, S., Singh, S.P., Murty, U.S., Mahboob, M., Grover, P., Rahman, M.F., 2013. Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 36, 296-305.

Kwong, L.K., Sohal, R.S., 2000. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch Biochem Biophys* 373, 16-22.

L

Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R., Hamza-Chaffai, A., 2007. Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus* : Metallothionein quantification by using two techniques. *Inter J Environ Pollu* 30, 593-601.

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N., 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 108, 2064-2110.

Lejay, A., Meyer, A., Schlagowski, A.I., Charles, A.L., Singh, F., Bouitbir, J., Pottecher, J., Chakfe, N., Zoll, J., Geny, B., 2014. Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 50, 101-105.

Leshinsky-Silver, E., Levine, A., Nissenkorn, A., Barash, V., Perach, M., Buzhaker, E., Shahmurov, M., Polak-Charcon, S., Lev, D., Lerman-Sagie, T., 2003. Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency. *Mol Genet Metab* 79, 288-293.

Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 790-796.

Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R., 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4, 26-49.
Ma, P., Luo, Q., Chen, J., Gan, Y., Du, J., Ding, S., Xi, Z., Yang, X., 2012. Intraperitoneal injection of magnetic Fe(3)O(4)-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *Int J Nanomedicine* 7, 4809-4818.

Lomer, M.C., Thompson, R.P., Powell, J.J., 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 61, 123-130.

Lowry, G.V., Johnson, K.M., 2004. Congener-specific dechlorination of dissolved PCBs by microscale and nanoscale zerovalent iron in a water/methanol solution. *Environ Sci Technol* 38, 5208-5216.

Lin, B., Xi, Z., Zhang, Y., Zhang, H., 2008. [Primary study on the hepatotoxicity and nephrotoxicity of rats induced by three kinds of nanomaterials]. *Wei Sheng Yan Jiu* 37, 651-653.

Liu, G., Gao, J., Ai, H., Chen, X., 2013a. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 9, 1533-1545.

Lum, H., Roebuck, K.A., 2001. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C719-741.



Ma, P., Luo, Q., Chen, J., Gan, Y., Du, J., Ding, S., Xi, Z., Yang, X., 2012. Intraperitoneal injection of magnetic Fe(3)O(4)-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *Int J Nanomedicine* 7, 4809-4818.

Mandelker, L., 2008. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38, 1-30, v.

Mandzy, N., Grulke, E., Druffel, T., 2005. Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder technology*, 160, 121–126.

Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.

Mayo, J.T., Yavuz, C., Yean, S., Cong, L., Shipley, H., Yu, W., Falkner, J., Kan, A., Tomson, M., Colvin, V.L., 2007. The effect of nanocrystalline magnetite size on arsenic removal. *Science and Technology of Advanced Materials* 8, 71-75.

Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M.A., Hosseinkhani, M., 2011a. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision" versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano* 5, 7263-7276.

Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M.R., Monopoli, M.P., Bombelli, F.B., Laurent, S., 2011b. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 111, 5610-5637.

Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A., 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 103, 317-324.

Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. Tracking the recruitment of diabetogenic CD8(+)T-cells to the pancreas in real time. *Diabetes*. 2004;53(6):1459–1466.

Moore, A., Weissleder, R., Bogdanov, A., Jr., 1997. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging* 7, 1140-1145.

Mueller, R. H., Maassen, S., Weyhers, H., Specht, F., Lucks, J. S., 1996. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 138, 85-94.

Mukhopadhyay, A., Joshi, N., Chattopadhyay, K., De, G., 2012. A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome c. *ACS Appl Mater Interfaces* 4, 142-149.

Muller, K., Skepper, J.N., Posfai, M., Trivedi, R., Howarth, S., Corot, C., Lancelot, E., Thompson, P.W., Brown, A.P., Gillard, J.H., 2007. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials* 28, 1629-1642.

McMichael, M.A., 2007. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 231, 714-720.

Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.

Modi, H.R., Katyare, S.S., Patel, M.A., 2008. Ageing-induced alterations in lipid/phospholipid profiles of rat brain and liver mitochondria: implications for mitochondrial energy-linked functions. *J Membr Biol* 221, 51-60.

Mitchell, P., 1975. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c₁ complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56, 1-6.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-3175.

N

Navarro, A., Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C670-686.

Navarro, A., Gomez, C., Lopez-Cepero, J.M., Boveris, A., 2004. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R505-511.

Nefzger, M., Kreuter, J., Voges, R., Liehl, E., Czok, R., 1984. Distribution and elimination of polymethyl methacrylate nanoparticles after peroral administration to rats. *J Pharm Sci* 73, 1309-1311.

Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B., 2002a. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.

Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Dinsdale, D., Smith, T., Xu, H., Vermynen, J., Nemery, B., 2002b. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 998-1004.

Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Vermylen, J., Nemery, B., 2003. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 186, 38-45.

Neuwelt, E.A., Weissleder, R., Nilaver, G., Kroll, R.A., Roman-Goldstein, S., Szumowski, J., Pagel, M.A., Jones, R.S., Remsen, L.G., McCormick, C.I., et al., 1994. Delivery of virus-sized iron oxide particles to rodent CNS neurons. *Neurosurgery* 34, 777-784.

Ngomsik, A. F., Bee, A., Draye, M., Cote, G., Cabuil, V., 2005. Magnetic nano-andmicroparticles for metal removal and environmental applications: a review. *Comptes Rendus Chimie* 8, 963-970.

O

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823-839.

Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388-38393.

Okon E, Pouliquen D, Okon P, et al. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Invest.* 1994;71:895–903.

Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., Ménard, L., 2008. Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

P

Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19, 227-250.

Paddenberg, R., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Braun-Dullaeus, R.C., Kummer, W., 2003. Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature. *Adv Exp Med Biol* 536, 163-169.

- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., Barja, G., 2000. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.
- Podda, M., Grundmann-Kollmann, M., 2001. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 26, 578-582.
- Puntarulo, S., 2005. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* 26, 299-312.
- Srinivas, A., Rao, P.J., Selvam, G., Goparaju, A., Murthy, P.B., Reddy, P.N., 2012. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum Exp Toxicol* 31, 1113-1131.
- Puppi, J., Mitry, R.R., Modo, M., Dhawan, A., Raja, K., Hughes, R.D., 2011. Use of a clinically approved iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes. *Cell Transplant* 20, 963-975.
- Pislaru, S.V., Harbuzariu, A., Agarwal, G., Witt, T., Gulati, R., Sandhu, N.P., Mueske, C., Kalra, M., Simari, R.D., Sandhu, G.S., 2006. Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts. *Circulation* 114, I314-318.
- Polyak, B., Fishbein, I., Chorny, M., Alferiev, I., Williams, D., Yellen, B., Friedman, G., Levy, R.J., 2008. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 698-703.
- Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276.

R

- Rahman, S., Taanman, J.W., Cooper, J.M., Nelson, I., Hargreaves, I., Meunier, B., Hanna, M.G., Garcia, J.J., Capaldi, R.A., Lake, B.D., Leonard, J.V., Schapira, A.H., 1999. A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet* 65, 1030-1039.
- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-6467.
- Risom, L., Moller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 592, 119-137.
- Riu, J., Maroto, A., Rius, F.X., 2006. Nanosensors in environmental analysis. *Talanta* 69, 288-301.

Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., Rustin, P., 1997. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17, 215-217.

Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2006. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci* 91, 159-165.

S

Sardesai, V.M., 1995. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract* 10, 19-25.

Sauter, C., Emin, M.A., Schuchmann, H.P., Tavman, S., 2008. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrason Sonochem* 15, 517-523.

Savasta, S., Comi, G.P., Perini, M.P., Lupi, A., Strazzer, S., Rognoni, F., Rossoni, R., 2001. Leigh disease: clinical, neuroradiologic, and biochemical study of three new cases with cytochrome c oxidase deficiency. *J Child Neurol* 16, 608-613.

Sazanov, L.A., 2007. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46, 2275-2288.

Schapira, A.H., 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366, 225-233.

Scherrer, P., 1918. Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of roentgen rays. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* 96, 96–100.

Schnorr, J., Taupitz, M., Wagner, S., Pilgrimm, H., Hansel, J., Hamm, B., 2000. Age-related blood half-life of particulate contrast material: experimental results with a USPIO in rats. *J Magn Reson Imaging* 12, 740-744.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J., 2001. [Alcohol and oxidative stress]. *Pathol Biol (Paris)* 49, 689-695.

Serviddio, G., Bellanti, F., Romano, A.D., Tamborra, R., Rollo, T., Altomare, E., Vendemiale, G., 2007. Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox Rep* 12, 91-95.

Seo, A.Y., Xu, J., Servais, S., Hofer, T., Marzetti, E., Wohlgemuth, S.E., Knutson, M.D., Chung, H.Y., Leeuwenburgh, C., 2008. Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. *Aging Cell* 7, 706-716.

Sies, H., 1997. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.

Simon, P., Joner, E., 2008. Conceivable interactions of biopersistent nanoparticles with food matrix and living systems following from their physicochemical properties. *Journal of Food and Nutrition Research* 47, 51-59.

Skulachev, V.P., 1996. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 397, 7-10.

Skulachev, V.P., 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280.

Srinivas, A., Rao, P.J., Selvam, G., Goparaju, A., Murthy, P.B., Reddy, P.N., 2012. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum Exp Toxicol* 31, 1113-1131.

Stipp, S.L.S., Hansen, M., Kristensen, R., Hochella, J.M.F., Bennedsen, L., Dideriksen, K., Balic-Zunic, T., Leonard, D., Mathieu, H.J., 2002. Behaviour of Fe-oxides relevant to contaminant uptake in the environment. *Chemical Geology* 190, 321-337.

Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., Culotta, V.C., 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276, 38084-38089.

Sunderman, F.W., Jr., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C., 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann Clin Lab Sci* 15, 229-236.

Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B., Colvin, V.L., 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 92, 174-185.

Singh, S.P., Rahman, M.F., Murty, U.S., Mahboob, M., Grover, P., 2013. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 266, 56-66.

Stroh, A., Zimmer, C., Gutzeit, C., Jakstadt, M., Marschinke, F., Jung, T., Pilgrimm, H., Grune, T., 2004. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med* 36, 976-984.

Soto, K. F., Carrasco, A., Powell, T. G., Garza, K. M., and Murr, L. E., 2005. Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *Journal of Nanoparticle Research* 7, 145–169.

T

Tanimoto, A., Kuribayashi, S., 2006. Application of superparamagnetic iron oxide to imaging of hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol* 58, 200-216.

Toyokuni, S., 2002. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Rep* 7, 189-197.

U

Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., Lipton, S.A., 2006. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517.

Uheida, A., Salazar-Alvarez, G., Bjorkman, E., Yu, Z., Muhammed, M., 2006. Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ nanoparticles for the adsorption of Co²⁺ from aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* 298, 501-507.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.

van den Bos, E.J., Wagner, A., Mahrholdt, H., Thompson, R.B., Morimoto, Y., Sutton, B.S., Judd, R.M., Taylor, D.A., 2003. Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplant* 12, 743-756.

Ventura, B., Genova, M.L., Bovina, C., Formiggini, G., Lenaz, G., 2002. Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. *Biochim Biophys Acta* 1553, 249-260.

Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17, 43-52.

W

Wang, Y.F., Tsai, P.J., Chen, C.W., Chen, D.R., Hsu, D.J., 2010b. Using a modified electrical aerosol detector to predict nanoparticle exposures to different regions of the respiratory tract for workers in a carbon black manufacturing industry. *Environ Sci Technol* 44, 6767-6774.

Wang, Y.X., 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* 1, 35-40.

Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 396, 279-282.

Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., Cheng, J., Jin, N., Zhou, Y., Li, X., Tang, M., Wang, X.M., 2010. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine* 5, 861-866.

Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., Li, Y., Jiao, F., Zhao, Y., Chai, Z., 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 168, 176-185.

Wagner, A.J., Bleckmann, C.A., Murdock, R.C., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2007. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J Phys Chem B* 111, 7353-7359.

Wang, J.J., Sanderson, B.J., Wang, H., 2007. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 628, 99-106.

Wang, L., Ding, W., Zhang, F., 2010. Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 10, 8617-8624.

Wang, Y., Wang, B., Zhu, M.T., Li, M., Wang, H.J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z.F., Feng, W.Y., Zhao, Y.L., 2011. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicol Lett* 205, 26-37.

Weissleder, R., Cheng, H.C., Bogdanova, A., Bogdanov, A., Jr., 1997. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 7, 258-263.

Wei-xian, Z., 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J.Nanoparticle Research* 5, 323-332.

- Wikstrom, M., Verkhovsky, M.I., 2007. Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1767, 1200-1214.
- Wilhelm, C., Bal, L., Smirnov, P., Galy-Fauroux, I., Clement, O., Gazeau, F., Emmerich, J., 2007. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells. *Biomaterials* 28, 3797-3806.
- Wilhelm, C., Gazeau, F., Bacri, J.C., 2002. Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur Biophys J* 31, 118-125.
- Win, K.Y., Feng, S.S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 2713-2722.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1), 17-29.
- Wiogo, H.T., Lim, M., Bulmus, V., Yun, J., Amal, R., 2011. Stabilization of magnetic iron oxide nanoparticles in biological media by fetal bovine serum (FBS). *Langmuir* 27, 843-850.
- Wood, J.C., 2007. Diagnosis and management of transfusion iron overload: the role of imaging. *Am J Hematol* 82, 1132-1135.
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F.D., 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett* 191, 1-8.
- Wu, W.T., Liao, H.Y., Chung, Y.T., Li, W.F., Tsou, T.C., Li, L.A., Lin, M.H., Ho, J.J., Wu, T.N., Liou, S.H., 2014. Effect of nanoparticles exposure on fractional exhaled nitric oxide (FENO) in workers exposed to nanomaterials. *Int J Mol Sci* 15, 878-894.

X

- Xu, J., Hwang, J.C., Lees, H.A., Wohlgemuth, S.E., Knutson, M.D., Judge, A.R., Dupont-Versteegden, E.E., Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2012. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. *Exp Gerontol* 47, 100-108.
- Xu, J., Knutson, M.D., Carter, C.S., Leeuwenburgh, C., 2008. Iron accumulation with age, oxidative stress and functional decline. *PLoS One* 3, e2865.

Xu, J., Marzetti, E., Seo, A.Y., Kim, J.S., Prolla, T.A., Leeuwenburgh, C., 2010. The emerging role of iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging. *Mech Ageing Dev* 131, 487-493.

Y

Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* 42, 2266-2274.

Yamago, S., Tokuyama, H., Nakamura, E., Kikuchi, K., Kananishi, S., Sueki, K., Nakahara, H., Enomoto, S., Ambe, F., 1995. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem Biol* 2, 385-389.

Yang, S. T., Guo, W., Lin, Y., Deng, X. Y., Wang, H. F., Sun, H. F., 2007. Biodistribution of pristine single-walled carbon nanotubes in vivo. *J Phys Chem C* 111:17761–17764.

Yang, S.T., Wang, X., Jia, G., Gu, Y., Wang, T., Nie, H., Ge, C., Wang, H., Liu, Y., 2008. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicol Lett* 181, 182-189.

Yean, S., Cong, L., Yavuz, C.T., Mayo, J.T., Yu, W.W., Kan, A.T., Colvin, V.L., Tomson, M.B., 2005. Effect of magnetic particle size on adsorption and desorption of arsenite and arsenate. *Journal of Material Research* 20, 3255-3264.

Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74, 139-162.

Yurchenko, O.V., Todor, I.N., Khayetsky, I.K., Tregubova, N.A., Lukianova, N.Y., Chekhun, V.F., 2010. Ultrastructural and some functional changes in tumor cells treated with stabilized iron oxide nanoparticles. *Exp Oncol* 32, 237-242.

Z

Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X., Kroemer, G., 1997. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 29, 185-193.

Zhang, K., Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462.

Zhou, Y.M., Zhong, C.Y., Kennedy, I.M., Leppert, V.J., Pinkerton, K.E., 2003. Oxidative stress and NFkappaB activation in the lungs of rats: a synergistic interaction between soot and iron particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 190, 157-169.

Zielinski, S., Portner, H.O., 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125, 147-160.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., Sollott, S.J., 2009. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 83, 213-225.

ORIGINAL ARTICLE

Synthesis of new N,N'-bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides and evaluation of their cytotoxicity against human hepatoma and breast cancer cells

Kaan Kucukoglu¹, H. Inci Gul¹, Rengul Cetin-Atalay², Yosra Baratli³, Anne-Laure Charles³, Murat Sukuroglu⁴, Mustafa Gul⁵, and Bernard Geny³

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, Erzurum, Turkey, ²Department of Molecular Biology and Genetics, Bilkent University, Ankara, Turkey, ³Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Strasbourg, France, ⁴Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, Turkey, and ⁵Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey

Abstract

N,N'-Bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides were synthesized by the reaction of 2 mols of 1-aryl-3-(piperidine-1-yl)-1-propanone hydrochlorides with 1 mol of hydrazine hydrate. Aryl part was C₆H₅ (**P1**), 4-CH₃C₆H₄ (**P2**), 4-CH₃OC₆H₄ (**P3**), 4-HOC₆H₄ (**P4**), 4-ClC₆H₄ (**P5**), 3-CH₃OC₆H₄ (**P6**), 4-FC₆H₄ (**P7**) and 4-BrC₆H₄ (**P8**). Except **P1**, all compounds were reported for the first time. The chemical structures were confirmed by UV, ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS spectra. **P1**, **P2**, **P7** and **P8** against human hepatoma (Huh7) cells and **P1**, **P2**, **P4**, **P5**, **P6**, **P7** and **P8** against breast cancer (T47D) cells have shown cytotoxicity. **P1**, **P2** and **P7** had more potent cytotoxicity against Huh7 cells than the reference compound 5-FU, whereas only **P2** was more potent than the 5-FU against T47D cells. Representative compound **P7** inhibited the mitochondrial respiration at 144, 264 and 424 μM concentrations dose-dependantly in liver homogenates. The results suggest that **P1**, **P2**, **P7** and **P8** may serve as model compounds for further synthetic studies.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common neoplasm in the world and it ranks at third place in the list of cancer-related mortality^{1,2}. As HCC is usually asymptomatic in the early stages, it is diagnosed at an advanced stage^{3,4}. Furthermore, for most patients with HCC, surgery is the only curative treatment procedure, because HCC cells have high resistance to chemotherapeutic agents, so treatment options of HCC is very limited⁵. On the other hand, breast cancer is the leading cause of cancer death among women with approximately a million new cases each year⁶. Despite some therapy options such as surgery, chemotherapy, endocrine and radiation therapy in the treatment of breast cancer, several side effects and drug resistance to chemotherapeutic agents are often encountered problems in the course of therapy⁷. Therefore, it is necessary to develop novel approaches and discover new drug candidates that can be used in the treatment of HCC and/or breast cancer.

Mannich bases are synthesized by using a compound containing a reactive hydrogen atom, formaldehyde and a secondary amine in general. This process is known as the Mannich reaction⁸. They have various biological activities such as cytotoxic^{9–13},

anti-cancer⁸, anti-inflammatory¹⁴, anti-convulsant¹⁵ and anti-fungal^{16,17} activities. Their cytotoxic activities may be attributed to the α,β-unsaturated ketone, which is available in the chemical structure of the compound or is produced by deamination process *in vivo* or under simulated conditions *in vitro*^{18–20} or inhibition of mitochondrial respiration^{21,22}.

In the 1920s, Warburg et al.²³ showed that tumour cells produce large quantities of lactic acid from glucose via the glycolytic pathway, even under aerobic conditions. It has been proposed that this so-called “aerobic glycolysis” and the consequent export of lactic acid leads to the low extracellular pH (pHe) characteristic of solid tumours. More recent works suggest that other metabolic pathways may also contribute to acid production^{24,25}. Alternatively, the pHe of solid tumours may be independently regulated *in vivo* because it is an intrinsic part of the tumour phenotype²⁶. A theoretical model has proposed that a low pHe may confer survival and growth advantages for tumour cells at the expense of the surrounding normal cells²⁷ and *in vitro* studies have shown that a low pHe favours metastatic behaviour and production of angiogenic factors by human cells^{28,29}. In any case, as the intracellular pH (pHi) is tightly controlled and maintained at neutral or slightly alkaline levels, the low pHe of solid tumours leads to a pH gradient (pHe–pHi) across the plasma membrane, which is the reverse of that found in normal tissue³⁰. This reverse or negative pH gradient (ΔpH) can also have important consequences for the effective delivery of chemotherapeutic drugs from the blood stream to the tumour intracellular space³¹.

Address for correspondence: Prof. Dr Halise Inci Gul, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, 25240, Erzurum, Turkey. Tel: +90 442 2325203. Fax: +90 442 2360962. E-mail: incigul1967@yahoo.com.

Keywords

Cytotoxicity, Huh7, hydrazone, Mannich bases, mitochondrial respiration, T47D

History

Received 5 March 2013
Revised 8 April 2013
Accepted 10 April 2013
Published online 15 July 2013

A large $-\Delta$ pH has been shown to be an important determinant for tumour cell uptake of the anti-cancer drug 5-fluorouracil^{32,33}, and a low pH favours cellular uptake of other chemotherapeutic drugs that are weak acids, such as chlorambucil, or reduces uptake of weak bases such as mitoxanthrone^{6,34,35}.

The pH of tumours grown s.c. from 30 human tumour xenograft lines in rats were analysed with the use of H^+ ion-sensitive semi-microelectrodes prior to and following stimulation of tumour cell glycolysis by intravenous infusion of glucose. Without exception, all xenografts responded to the temporary increase in plasma glucose concentration by an accumulation of acidic metabolites, as indicated by a pH reduction to an average value of 6.43 from 6.83. This pH value corresponds to a ten-fold increase in H^+ ion activity in tumour tissues as compared to arterial blood³⁶. If this is the case, tumour-selective activation of pH-sensitive anti-cancer agents, e.g. alkylating drugs, acid-labile prodrugs or pH-sensitive immunoconjugates may thus be feasible in a wide variety of human cancers.

Hydrazone is a special group of compounds in the Schiff base family among condensation compounds which are synthesized with aldehyde or ketones and amine derivatives in organic chemistry. A great attention has been focused on hydrazones for many researchers because of their various biological activities such as anti-microbial, anti-fungal, anti-inflammatory, anti-tubercular, anti-convulsant, anti-tumoural and anti-viral activities³⁷.

Some polymeric micellar drug delivery systems having hydrazone structure were developed for the delivery of doxorubicin³⁸. Hydrazone bond was included as it is cleavable under biologically relevant conditions under slightly acidic conditions (pH ca. 5, typical of the interstitial space of most solid tumours and of the endosomal environment) and is relatively stable under neutral conditions in blood plasma (pH 7.4)^{39,40}. It was expected that this should minimize the release of toxic-free doxorubicin during delivery into tumour tissue and thus decrease side effects and increase the range of doses exploitable in therapy. In another study, the anti-cancer drug, adriamycin is conjugated to the core-forming segments through the hydrazone linkers that are stable under physiological conditions (pH 7.4), but cleavable under acidic intracellular environments in endosomes and lysosomes (pH 5–6)⁴¹.

Considering above mentioned problems and the logic explained, the design and synthesis of hydrazones of some Mannich bases, *N,N'*-bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides, were considered to develop new anti-cancer drug candidates. These compounds were designed as bi-functional alkylating agents and prodrug of Mannich bases, which can provide α,β -unsaturated ketones responsible for the cytotoxicity of them following hydrolysis of hydrazone in acidic environment of cancer cells to produce 2 mols of mono Mannich bases from 1 mol of hydrazone compound first. Then,

they undergo deamination to produce α,β -unsaturated ketones which alkylate thiols. Another approach can be deamination of hydrazone first and then reaction of the product generated with cellular thiols by alkylation to produce cytotoxicity.

In addition, as it was previously shown that cytotoxic Mannich bases derived from styryl ketones inhibit mitochondrial respiration in rat liver cells^{21,22}. Inhibition of mitochondrial respiratory chain by the representative compound **P7** was also tested in liver homogenate to elucidate the possible mechanisms of actions of the acid-sensitive hydrazones derived from mono Mannich bases.

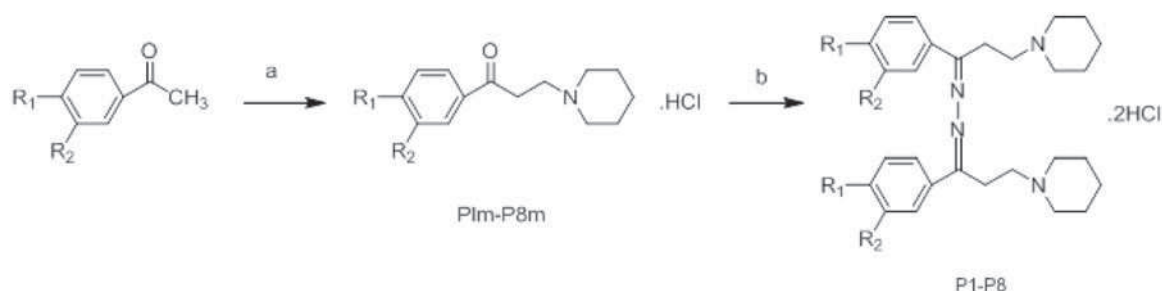
Experimental

Chemistry

Melting points were determined on an Electrothermal 9100 melting point apparatus (IA9100, Electrothermal, Essex, UK). 1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR spectra were recorded employing a Varian 400 MHz FT spectrometer (Danbury, CT) for hydrazone derivatives **P1–P8**, while 1H (60 MHz)-NMR spectra were recorded on a Varian EM-360 spectrometer for precursor mono Mannich bases **P1m–P8m**. NMR spectra of **P1–P8** were measured in $MeOH-d_4$ solutions using tetra methyl silane as an internal standard and chemical shifts are reported as parts per million (δ) while $CDCl_3$ was used for **P1m–P8m**. Coupling constants (J) are reported in Hertz. HRMS were recorded on a V6 Waters Micromass ZQ (Waters Corporation, Milford, MA) and UV spectra were taken on a Thermo Electron HeXios (α) (UVA 114903, Cambridge, UK) spectrophotometer for hydrazone derivatives. Synthetic starting material, reagents and solvents were purchased from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany), Riedel-de Haën (Seelze, Germany), J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, NJ), Fluka AG (Buchs, Switzerland), Acros Organics Chemical Co. (Fair Lawn, NJ) and Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

General procedure for the synthesis of precursor mono Mannich bases, 1-aryl-3-(piperidine-1-yl)-1-propanone hydrochlorides, (**P1m–P8m**)

Except **P2m**, the mixture of corresponding acetophenone, paraformaldehyde and piperidine hydrochloride in 1:1.5:1 mol ratio was dissolved in ethanol. A few drops of HCl (37%) was added into this mixture. Reaction content was refluxed for sometime. Solvent was removed under vacuum. The residue obtained was crystallized from suitable solvent. Crystals formed were filtered, washed with diethyl ether, dried and crystallized. The amount of suitable ketone (mmol), heating period (h), melting point ($^{\circ}C$), crystallization solvent and yield (%) of the compounds **P1m–P8m** (Scheme 1) were as follows: **P1m** (20 mmol, 9 h, 191–194 $^{\circ}C$, methanol, 69%), **P2m** (8 mmol, 22 h, 182–187 $^{\circ}C$, methanol-ether, 25%), **P3m** (30 mmol, 4 h,



Scheme 1. Synthesis of *N,N'*-Bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides, **P1–P8**. Reagents and conditions: (a) paraformaldehyde, piperidine HCl, HCl (37%) and EtOH, 4–9 h, for **P1m**, **P3m–P8m**; acetic acid (99%), 22 h, for **P2m**; (b) Ethanol/acetic acid (3% w/v), hydrazine hydrate for **P1–P8**. R₁ = R₂ = H (**P1**); R₁ = CH₃, R₂ = H (**P2**); R₁ = CH₃O, R₂ = H (**P3**); R₁ = OH, R₂ = H (**P4**); R₁ = Cl, R₂ = H (**P5**); R₁ = H, R₂ = CH₃O (**P6**); R₁ = F, R₂ = H (**P7**); R₁ = Br, R₂ = H (**P8**).

215–218 °C, ethanol, 32%), **P4m** (30 mmol, 4 h, 224–226 °C, ethanol, 33%), **P5m** (20 mmol, 9 h, 196–198 °C, methanol-ether, 48%), **P6m** (30 mmol, 8 h, 152–155 °C, ethanol-ether, 45%), **P7m** (20 mmol, 8 h, 173–177 °C, methanol, 21%), **P8m** (20 mmol, 8 h, 205–207 °C, methanol, 41%). As precursor Mannich bases were registered in literatures with their melting points^{42–45}, NMR data of them was not reported here. In the case of **P2m**, the mol ratio of ketone, aldehyde and amine was 1:2:1. Acetic acid (99%, 30 ml) was used instead of ethanol. After refluxing 22 h, the solvent was evaporated *in vacuo* and diethyl ether was added into the residue and the mixture was cooled for one night at 4 °C. The precipitated compound was filtered, dried and crystallized from methanol-diethyl ether.

General procedure for the synthesis of hydrazones, N,N'-bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P1–P8**)

A solution of hydrazine hydrate (1 mol ratio) in ethanol was added to a solution of mono Mannich base (2 mol ratio) in ethanolic acetic acid (3% w/v). The mixture was stirred at room temperature for 17–26 h. The precipitated compound was filtered, dried and crystallized from suitable solvent to give the corresponding hydrazone derivatives. The crystals formed were filtered and dried at room temperature. Experimental data of **P**-series hydrazone compounds, **P1–P8** (Scheme 1) are shown in Table 1.

N,N'-bis[1-phenyl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P1**). Yield: 57%. M.p. 185–189 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 303 (4.22) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.80–1.95 (m, 12H), 2.97 (m, 8H), 3.54–3.63 (m, 8H), 7.51–7.56 (m, 8H), 8.03–8.06 (m, 2H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.39, 23.05, 23.74, 53.15, 53.5, 127.39, 128.92, 131.09, 136.05, 163.27. HRMS: 431.32 (M⁺), 432.32 (M + 1)⁺.

N,N'-bis[1-(4-methylphenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P2**). Yield: 9%. M.p. 207–210 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 313 (4.28) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.85 (m, 12H), 2.41 (s, 6H), 2.99 (m, 8H), 3.52–3.63 (m, 8H), 7.35 (d, J = 7.7 Hz, 4H), 7.94 (t, J = 8.4 Hz, 4H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 20.23, 21.41, 23.05, 23.61, 53.14, 53.67, 127.36, 129.53, 133.33, 141.77, 163.08. HRMS 459.35 (M⁺), 460.35 (M + 1)⁺.

N,N'-bis[1-(4-methoxyphenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P3**). Yield: 72%. M.p. 214–217 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 276 (4.38) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.85–1.92 (m, 12H), 3.30 (m, 8H), 3.49–3.58 (m, 8H), 3.88 (s, 6H), 7.04 (d, J = 9.2 Hz, 4H), 8.03 (d, J = 8.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.43, 23.04, 32.38, 52.41, 53.59, 54.95, 113.86, 129.02, 130.51, 164.62, 195.17. HRMS 491.34 (M⁺), 492.34 (M + 1)⁺.

N,N'-bis[1-(4-hydroxyphenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P4**). Yield: 64%. M.p. 219–221 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 281 (4.36) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.89 (m, 12H), 3.30 (m, 8H), 3.50–3.53 (m, 8H), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.94 (d, J = 8.8 Hz); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.43, 23.04, 32.21, 52.48, 53.57, 115.22, 127.92, 130.75, 163.20, 195.07. HRMS 463.30 (M⁺).

N,N'-bis[1-(4-chlorophenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P5**). Yield: 48%. M.p. 184–189 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 254 (4.32), 311 (4.06) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.57–1.93 (m, 12H), 3.04–3.15 (m, 8H), 3.51–3.63 (m, 8H), 7.55 (d, J = 7.7 Hz, 4H), 8.04 (d, J = 8.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.41, 23.06, 32.93, 52.15, 53.64, 128.96, 129.78, 134.7, 139.99, 195.5. HRMS 499.24 (M⁺), 501.24 (M + 2)⁺.

N,N'-bis[1-(3-methoxyphenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P6**). Yield: 88%. M.p. 187–192 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 251 (3.94), 308 (3.67) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.84 (m, 12H), 3.26 (m, 8H), 3.53–3.59 (m, 8H), 3.88 (s, 6H), 7.13 (dd, J = 8.3, 2.6 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 7.55 (t, J = 2.2 Hz, 2H), 7.58 (td, J = 7.7, 2.6 Hz); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.4, 23.03, 23.91, 53.19, 53.55, 54.96, 113.01, 116.38, 119.83, 130.1, 137.4, 160.44, 163.01; HRMS 491.34 (M⁺), 492.34 (M + 1)⁺.

N,N'-bis[1-(4-fluorophenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P7**). Yield: 12%. M.p. 204–209 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 306 (4.30) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.80–1.86 (m, 12H), 2.99 (m, 8H), 3.52–3.60 (m, 8H), 7.27 (t, J = 8.8 Hz, 4H), 8.11 (d, J = 8.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.42, 23.05, 23.72, 53.18, 53.4, 115.91, 129.9, 132.37, 163.61, 166.11. HRMS 467.3 (M⁺), 468.3 (M + 1)⁺.

N,N'-bis[1-(4-bromophenyl)-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides (**P8**). Yield: 14%. M.p. 195–199 °C. UV $\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) 263 (4.13), 313 (4.30) nm. ¹H NMR (MeOH-d₄) δ 1.84–2.01 (m, 12H), 3.03 (m, 8H), 3.50–3.61 (m, 8H), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.96 (d, J = 8.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (MeOH-d₄) δ 21.39, 23.04, 32.84, 52.12, 53.66, 128.67, 129.82, 132.03, 135.04, 195.71. HRMS 587.14 (M⁺), 589.14 (M + 2)⁺, 591.14 (M + 4)⁺.

Cytotoxic activity assay

Hydrazone compounds, **P1–P8** and 5-FU, which was used as positive control compound, were tested against human hepatoma (Huh7) and breast cancer (T47D) cells by NCI-60 SulforhodamineB Assay^{46,47} to identify the compounds with growth-inhibitory activity. Briefly, T47D and Huh7 cells (5000 or 10 000) were inoculated into 96-well plates in 100 μ l of standard DMEM medium (Gibco-Invitrogen Corp., Grand Island, NY) 24 h

Table 1. Experimental data of **P** series hydrazone compounds, **P1–P8** (Scheme 1).

Compound	Formula	MW	Reaction time (h)	Crystallization solvent	Yield (%)	Melting point (°C)
P1	C ₂₈ H ₄₀ Cl ₂ N ₄	502.26	17	Ethanol	57	185–189*
P2	C ₃₀ H ₄₄ Cl ₂ N ₄	530.29	23	Ethanol	9	208–210
P3	C ₃₀ H ₄₄ Cl ₂ N ₄ O ₂	562.28	18	Methanol	72	214–217
P4	C ₂₈ H ₄₀ Cl ₂ N ₄ O ₂	534.25	18	Ethanol	64	219–221
P5	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₄ N ₄	570.19	18	Ethanol	48	186–189
P6	C ₃₀ H ₄₄ Cl ₂ N ₄ O ₂	562.28	26	Chloroform	88	190–192
P7	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ F ₂ N ₄	538.24	26	Chloroform/methanol	12	204–209
P8	C ₂₈ H ₃₈ Br ₂ Cl ₂ N ₄	658.08	20	Ethyl acetate/methanol	14	195–199

*Reported melting point of **P1** was 172.5–175 °C⁵².

prior to treatment with the compounds in increasing concentrations (2.5, 5, 10, 20, 40 μ M). After 72 h of treatment, the cell culture medium was discarded and the cells were washed with $1 \times$ PBS (CaCl_2 -, MgCl_2 -free) (Gibco, Invitrogen). Then cells were fixed by gentle addition of 50 μ l of ice-cold 10% (w/v) trichloroacetic acid (MERCK) for 60 min at 4 °C. After fixation, cells were washed with distilled water and dried in air. The cells were stained using 50 μ l of a 0.4% (m/v) of sulforhodamine (Sigma-Aldrich) in 1% acetic acid solution at room temperature for 10 min. Extra unbound dye was washed five times with 200 μ l of 1% acetic acid and air-dried. Sulforhodamine stain, which was bound to cellular proteins, was then solubilized by adding 200 μ l of 10 mM Tris-base solution and the absorbance was acquired at 515 nm. Absorbance values of the compounds were normalized to their corresponding controls (DMSO). The IC_{50} values were calculated as previously described⁴⁸. The IC_{50} values reported are the average of two independent determinations which differed by <10%.

Inhibition of mitochondrial respiration assay

Animals

Experiments were performed on nine adult male Wistar rats (8-week-old), housed in a thermo-neutral environment (22 ± 2 °C), on a 12:12 h photoperiod, and provided food and water *ad libitum*. This investigation was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory published by the US National Institute of Health and approved by the institutional animal care committee (NIH publication No. 85-23, revised 1996). Animals were submitted to a general anaesthesia with isoflurane and the liver was excised and immediately used for the study of mitochondrial respiration.

Study of mitochondrial respiration

Isolation of liver mitochondria. All operations were carried out at 4 °C. Liver was finely minced in ice-cold isolation buffer (50 mM Tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.4 at 4 °C) and then homogenized with a Potter–Elvehjem device. The homogenate was centrifuged at 1300g for 3 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 10000g for 10 min at 4 °C to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.4 at 4 °C. Protein content was routinely assayed with a Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard⁴⁹. Mitochondria were kept on ice until use.

Measurement of the mitochondrial respiratory chain complexes. Mitochondrial respiration was measured using a Clark-type electrode (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK) as previously reported⁵⁰. Before oxygraph measurement, 3 ml of solution M (100 mM KCl, 50 mM Mops, 1 mM EGTA, 5 mM Kpi, 1 mg/ml BSA) was added to the oxygraph chambers for 10 min then, 0.15 mg of isolated liver mitochondria were introduced with 10 mM glutamate and 2.5 mM malate and the temperature was maintained at 25 °C. After that, succinate (25 mM) and adenosine diphosphate were added. Mitochondrial respiration in these conditions allowed determining the activities of the complexes I, II, III and IV (Figure 2). After that, the representative Fluor-bearing compound P7 was added at different concentrations.

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post-test. (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA). Statistical significance required a $p < 0.05$.

Results

In this study, hydrazone compounds **P1–P8** bearing a piperidine moiety were synthesized as presented in Scheme 1 for the first time, except compound **P1**. Experimental data of **P-series** of compounds are presented in Table 1. Compounds were obtained with the yield of 9–88%. The chemical structures of newly synthesized compounds were assigned on the basis of their spectroscopic data such as UV, ^1H NMR and ^{13}C NMR and HRMS. Spectral data are presented at the experimental section. Spectral data of the compounds were in accordance with the chemical structures of the compounds synthesized.

All the synthesized compounds having the chemical structure of *N,N'*-bis[1-aryl-3-(piperidine-1-yl)propylidene]hydrazine dihydrochlorides were evaluated against the human hepatoma cells (Huh7) and breast cancer cells (T47D) in terms of cytotoxic activity. The cytotoxicity of the compounds and reference compound 5-FU are listed in Table 2 in terms of the inhibitory potencies (IC_{50} , μ M).

Hydrazone compounds, **P1** (4.86 times), **P2** (10.08 times), **P7** (5.26 times) and **P8** (1.07 times, almost equal to 5-FU) had higher cytotoxic potency than the reference compound, 5-FU, against Huh7 cells. Of the compounds synthesized, only **P2**, a 4-methyl derivative, had more potent cytotoxic activity than 5-FU against T47D cells (1.45 times). The representative cytotoxic compound **P7** inhibited the mitochondrial respiration significantly at 144, 264 and 424 μ M concentrations dose-dependantly in liver homogenates (Figure 1).

Table 2. Cytotoxic activity of hydrazones **P1–P8** (Scheme 1), against Huh7 and T47D cells (IC_{50} , μ M).

Compound	Huh7	T47D
P1	8.66	19.90
P2	4.18	4.83
P3	*	*
P4	*	51.59
P5	*	114.93
P6	*	229.82
P7	8.01	10.05
P8	39.50	16.09
5-FU	42.12	7.0

5-FU, 5-Fluorouracil; *, no inhibition.

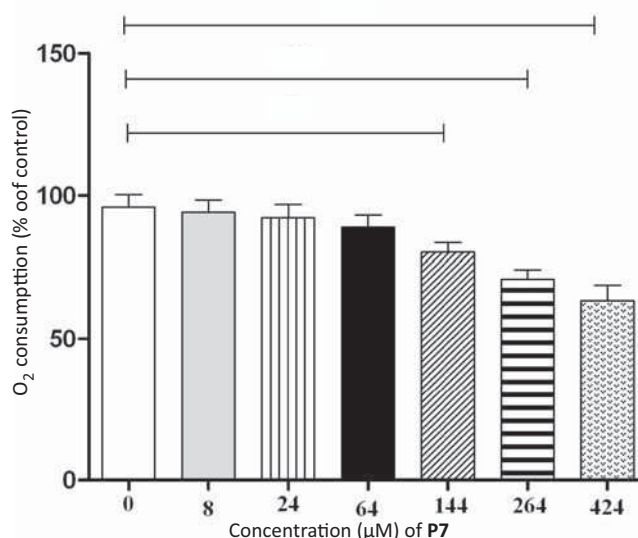


Figure 1. *In vitro* effects of increasing concentrations of **P7** on rat liver mitochondrial respiratory chain. $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey).

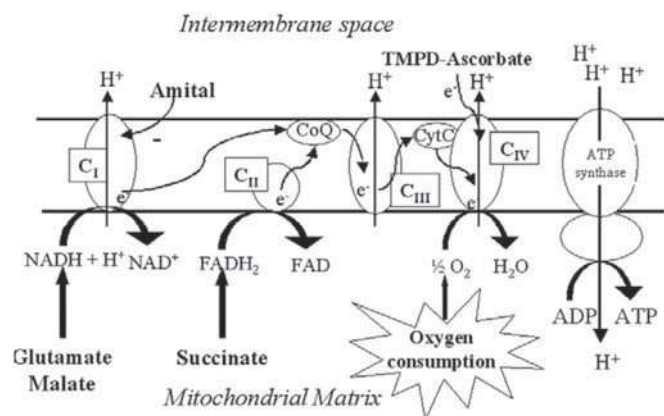


Figure 2. Schematic representation of the mitochondrial respiratory chain with specific substrates and inhibitors (modified from a previous study⁵³). CI, complex I; CII, complex II; CIII, complex III; CIV, complex IV; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride; H, proton.

Discussion

In this study, hydrazone compounds were designed as acid-sensitive compounds targeting cancer cells that have lower pH value than corresponding normal tissues. There are three suggested mechanisms of action for the cytotoxicity of designed chemical structures^{51,52}: firstly, hydrazone compounds may undergo deamination to produce *N,N'*-bis(1-aryl-propylidene)hydrazine, then interact with cellular thiol to form cytotoxicity. Secondly, hydrazone compound undergoes hydrolysis at the acidic pH of cancer cells to produce 2 mols of mono Mannich bases (**Pm**-Series) from 1 mol of hydrazone (**P**-Series) first, then they may undergo deamination to produce biologically active species α,β -unsaturated ketones, which alkylate cellular thiols to produce cytotoxicity. Thirdly, inhibition of mitochondrial respiration by the compounds.

The chemical structures of newly synthesized compounds were assigned on the basis of their spectroscopic data such as UV, ¹H NMR and ¹³C NMR and HRMS. Spectral data are presented in the experimental section. Spectral data of the compounds were in accordance with the chemical structures of the compounds synthesized. As an example, compound **P1**'s spectral data can be summarized. When examined, the ¹H NMR spectrum of **P1**, the protons on the phenyl ring in the molecule were observed as 2-hydrogen-multiplet and 8-hydrogen-multiplet in δ 8.03–8.06 ppm and δ 7.51–7.56 ppm, respectively. The protons belonged to ethylene chain between nitrogen atom of piperidine ring and carbon atom of imine group gave 8-hydrogen multiplet in δ 3.54–3.63 ppm. The protons of methylene group next to the nitrogen atom in piperidine ring were observed in δ 2.97 ppm as 8-hydrogen multiplet. The other protons of piperidine ring gave 12-hydrogen multiplet in δ 1.80–1.95 ppm. In ¹³C NMR spectrum, the carbon signal belonged to the imine group, which has shown that expected structure had synthesized, was observed in δ 163.27 ppm and it was the most important signal of the spectrum. The signal observed in δ 136.05 ppm belonged to carbons of phenyl ring next to the imine group. The signals of other protons of phenyl ring was in δ 131.09 ppm, δ 128.92 ppm and δ 127.39 ppm. The carbon atoms of methylene group next to nitrogen atom in piperidine ring gave signals of δ 53.50 ppm. The carbon atoms of ethylene chain next to nitrogen atom of piperidine ring was observed at δ 53.15 ppm, while the signal of carbon atoms in the same ring next to the imine group was in δ 23.74 ppm. The carbon atoms on the position 4 according to

the nitrogen atom of piperidine ring gave signal in δ 23.05 ppm. In the spectrum, the signal observed in δ 21.39 ppm belonged to the carbon atoms which were on positions 3 and 5 according to the nitrogen atom of piperidine ring. In HRMS spectrum of compound **P1**, molecular ion signal which confirmed the structure of **P1** was observed in m/z 431.32. $M+1$ signal was in m/z 432.32. The signal that had the highest rate of relative abundance and confirmed that the fragmentation of the molecule occurred between the imine groups was in m/z 216.16. In UV spectrum of compound **P1**, the signal which was observed in 303 nm belonged to the chromophore imine group-conjugated phenyl ring. This signal was due to $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic transition of imine group.

When the relationships between the cytotoxicity of the compounds and physicochemical parameters tested (Hammett σ , Hansch π and log *P*, data not shown) were investigated, there were no correlation. Data were analysed by using the bivariate, Pearson correlation method in SPSS for Windows program (IBM, New York, NY). Observed cytotoxicities with **P**-Series of compounds against cell lines used, may be explained with the optimum deamination ratio of the compounds in cancer cells tested to produce biologically active alkylation centre or interaction with some steps at the electron transport chain in mitochondria. On the other hand, absence of cytotoxicity with some compounds of **P**-Series may be explained by faster deamination of the compounds than the optimal level in the tested cells, which can cause faster elimination of the active metabolite before reaching their target. Second explanation for the absence of cytotoxicity may be the lack of interaction with the proper receptors for the bioactivity or the production of 1-aryl-3-(3-aryl-4,5-dihydropyrazol-1-yl)propan-1-one, which does not have suitable centre for thiol alkylation. Third, the compounds which don't have cytotoxicity may not have any interaction with electron transport chain in mitochondria.

Previously, it was shown that cytotoxic Mannich bases derived from styryl ketones inhibit mitochondrial respiration in rat liver cells^{21,22}. Accordingly, inhibition of mitochondrial respiratory chain by the compound **P7** in this study suggests that inhibition of mitochondrial respiration may be one of the contributing mechanisms to the cytotoxic activity of **P7** and the other cytotoxic compounds.

Conclusions

In conclusion, new hydrazones synthesized having a piperidine moiety as potential anti-cancer candidate deserved further structural modification and pharmacological evaluation. We reported here the compounds **P2–P8** for the first time with their synthesis, spectral analysis and cytotoxicities of the **P**-series of compounds against Huh7 and T47D cell lines. Compounds **P1** (4.86 times), **P2** (10.08 times), **P7** (5.26 times) and **P8** (1.07 times, almost equal to 5-FU), against Huh7 cell line, compound **P2** (1.45 times) against T47D cell line may serve as model candidate compounds for further synthetic designs and studies. Inhibition of the mitochondrial respiration by the representative compound **P7** suggests that it may be one of the contributing mechanisms to the cytotoxic activity of the hydrazones.

Acknowledgements

Cytotoxicity experiments were performed at the KANILTEK anticancer biomolecule screening facility, Bilkent University.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

This study was supported by the Research Foundation of Ataturk University (Project Numbers: 2007/58 and 2011/54), Erzurum, Turkey.

References

- Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5–16.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208–36.
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–2.
- Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:424–32.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
- Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 2001;7:548–52.
- Dimmock JR, Kumar P. Anticancer and cytotoxic properties of Mannich bases. *Curr Med Chem* 1997;4:1–22.
- Bilginer S, Gul HI, Mete E, et al. 1-(3-Aminomethyl-4-hydroxyphenyl)-3-pyridinyl-2-propen-1-ones: a novel group of tumour-selective cytotoxins. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012, doi: 10.3109/14756366.2012.700927.
- Gul HI, Das U, Pandit B, Li PK. Evaluation of the cytotoxicity of some mono-Mannich bases and their corresponding azine derivatives against androgen-independent prostate cancer cells. *Arzneimittel-Forsch* 2006;56:850–5.
- Gul HI, Gul M, Erciyas E. Toxicity of some bis Mannich bases and corresponding piperidinols in the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *J Appl Toxicol* 2003;23:53–7.
- Gul HI, Yerdelen KO, Gul M, et al. Synthesis of 4'-hydroxy-3'-piperidinomethylchalcone derivatives and their cytotoxicity against PC-3 cell lines. *Arch Pharm* 2007;340:195–201.
- Gul M, Mete E, Atalay M, et al. Cytotoxicity of 1-Aryl-3-buthylamino-1-propanone hydrochlorides against Jurkat and L6 cells. *Arzneimittel-Forsch* 2009;59:364–9.
- Gul HI, Suleyman H, Gul M. Evaluation of the anti-inflammatory activity of N,N'-bis(3-dimethylamino-1-phenyl-propylidene) hydrazine dihydrochloride. *Pharm Biol* 2009;47:968–72.
- Gul HI, Calis U, Ozturk Z, et al. Evaluation of anticonvulsant activities of bis(3-aryl-3-oxo-propyl)ethylamine hydrochlorides and 4-aryl-3-arylcarbonyl-1-ethyl-4-piperidinol hydrochlorides. *Arzneimittel-Forsch* 2007;57:133–6.
- Gul HI, Sahin F, Gul M, et al. Evaluation of antimicrobial activities of several Mannich bases and their derivatives. *Arch Pharm* 2005;338:335–8.
- Mete E, Ozelgul C, Kazaz C, et al. Synthesis and antifungal activity of 1-aryl-3-phenethylamino-1-propanone hydrochlorides and 3-aroyle-4-aryl-1-phenethyl-4-piperidinols. *Arch Pharm* 2010;343:291–300.
- Gul M, Atalay M, Gul HI, et al. The effects of some Mannich bases on heat shock proteins HSC70 and GRP75, and thioredoxin and glutaredoxin levels in Jurkat cells. *Toxicol In Vitro* 2005;19:573–80.
- Gul M, Gul HI, Hanninen O. Effects of Mannich bases on cellular glutathione and related enzymes of Jurkat cells in culture conditions. *Toxicol In Vitro* 2002;16:107–12.
- Gul M, Gul HI, Vepsalainen J, et al. Effect of acetophenone derived Mannich bases on cellular glutathione level in jurkat cells - A possible mechanism of action. *Arzneimittel-Forsch* 2001;51:679–82.
- Dimmock JR, Shyam K, Hamon NW, et al. bis-Mannich bases of styryl ketones as antileukemic agents. *Neoplasma* 1985;32:85–91.
- Hamon NW, Bassendowski DL, Wright DE, et al. Effect of antineoplastic and cytotoxic Mannich Bases derived from conjugated styryl ketones on mitochondrial respiration in rat liver cells. *J Pharm Sci* 1978;67:1539–42.
- Warburg O, Wind F, Neglers E. On the metabolism of tumours in the body. In: Warburg O, ed. *Metabolism of tumors*. London: Arnold Constable; 1930:254–70.
- Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1127–31.
- Yamagata M, Hasuda K, Stamato T, Tannock IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 1998;77:1726–31.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:13–30.
- Gatenby RA. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Res* 1995;55:4151–6.
- Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R, et al. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57:570–2.
- Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:176–86.
- Stubbs M, Rodrigues L, Howe FA, et al. Metabolic consequences of a reversed pH gradient in rat tumors. *Cancer Res* 1994;54:4011–16.
- Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 1996;56:1194–8.
- McSheehy PM, Seymour MT, Ojugo AS, et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study in vivo of human HT29 tumours using 19F and 31P magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Cancer* 1997;33:2418–27.
- Ojugo AS, McSheehy PM, Stubbs M, et al. Influence of pH on the uptake of 5-fluorouracil into isolated tumour cells. *Br J Cancer* 1998;77:873–9.
- Vukovic V, Tannock IF. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer* 1997;75:1167–72.
- Kozin SV, Gerweck LE. Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient. *Br J Cancer* 1998;77:1580–5.
- Volk T, Jahde E, Fortmeyer HP, et al. pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* 1993;68:492–500.
- Rollas S, Kucukguzel SG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 2007;12:1910–39.
- Hruby M, Konak C, Ulbrich K. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J Control Release* 2005;103:137–48.
- Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjug Chem* 2005;16:122–30.
- Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:149–68.
- Bae Y, Fukushima S, Harada A, Kataoka K. Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;42:4640–3.
- Denton JJ, Turner RJ, Neier WB, et al. Antispasmodics. I. Substituted β -amino ketones. *J Am Chem Soc* 1949;71:2048–50.
- Fry EM. Observations on the Mannich reaction. *J Org Chem* 1945;10:259–62.
- Okuda T. Alkylation with Mannich bases. II. Exchange reaction of p-substituted β -dimethylaminopropiophenone with piperidine. *Yakugaku Zasshi* 1956;76:4–6.
- Pathak VN, Singh RP. Studies in fluorinated Mannich bases. Part 2: synthesis and biological activity of some new 3-alkylaminopropiophenones. *Die Pharmazie* 1980;35:434.
- Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 2006;6:813–23.
- Mete E, Gul HI, Cetin-Atalay R, et al. The design and cytotoxic evaluation of some 1-aryl-3-isopropylamino-1-propanone hydrochlorides towards human Huh-7 hepatoma Cells. *Arch Der Pharm* 2011;344:333–9.
- Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006;1:1112–16.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

50. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 2011;98:511–16.
51. Dimmock JR, Erciyas E, Kirkpatrick DL, King KM. Evaluation of some azines of aminomethylacetophenones and related quaternary ammonium compounds versus the EMT6 tumour. *Die Pharmazie* 1988;43:614–16.
52. Gul HI, Gul M, Vepsalainen J, et al. Cytotoxicity of some azines of acetophenone derived mono-Mannich bases against Jurkat cells. *Biol Pharm Bull* 2003;26:631–7.
53. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2007;46:541–7; discussion 547.