

## Protocoles et Méthodes : Cytotoxicité des nanoparticules

- Synthèse des Nanoparticules d'Argent
  - *Particules de 15 nm de diamètre* Dans un bécher de 250 mL, on prépare 100 mL d'une solution aqueuse de  $\text{AgNO}_3$  à 0,001 M. On ajoute, sous agitation, 10 mL d'une solution d'eau déionisée contenant 0,01 g d'acide gallique. Immédiatement après l'addition, on ajuste le pH à 11 à l'aide d'une solution aqueuse de NaOH à 1,0 M.
  - *Particules de 27 nm de diamètre* Dans un bécher de 250 mL, on dissout 0,0169 g d' $\text{AgNO}_3$  dans 100 mL d'eau déionisée. On prépare 10 mL d'eau déionisée dans lesquels on ajoute 0,01 g d'acide gallique, et on verse cette solution dans la solution d' $\text{Ag}^+$ , sous agitation. On ajuste immédiatement le pH à 10 à l'aide d'une solution aqueuse de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 7,7 M.
  - *Caractérisation* Les particules synthétisées sont caractérisées au granulomètre Zetasizer Malvern Instruments, avec de l'eau distillée pour solvant. On procède à 3 mesures successives de 5 runs chacune. Les mesures sont ensuite refaites, avec pour solvant un milieu de culture DMEM *phenol red free*.
- Test Alamar Blue
  - *Ensemencement des cellules* Tout est pratiqué sous hotte stérile. En salle stérile, on choisit une souche de cellules L929. Comme on veut obtenir 50 000 cellules par puits (donc par mL), pour une plaque de 24 puits, on dilue la solution mère cinq fois (6 millions de cellules environ). Pour cela, on jette le milieu de culture à l'aide d'un pipet boy, en conservant bien les cellules qui sont accrochées sur les parois de la boîte. On rince ensuite consciencieusement la boîte à l'aide de 10 mL de PBS, que l'on jette après. On ajoute dans la boîte 2 mL de trypsine avec le pipet boy, on ferme le couvercle et on agite la boîte afin de répartir la trypsine sur toute la surface, et ainsi bien décoller les cellules. On incube à 37°C pendant 30 secondes, en vérifiant ensuite au microscope que les cellules sont bien détachées de la paroi. Puis on ajoute 9 mL de DMEM *phenol red free*, en rinçant les surfaces avec attention. On prépare une nouvelle boîte (stérile) en y versant 8 mL de milieu propre et 2 mL de notre boîte de cellules fraîchement préparée. On a ainsi dilué cinq fois la solution mère. On place ensuite 50 000 cellules dans chaque puits (pour 20 puits sur les 24), avec 1 mL de milieu, et on laisse incuber 24 heures à 37°C. L'expérience est réalisée en duplicat.
  - *Incubation des nanoparticules* On crée une gamme de concentrations croissantes de nanoparticules dans les plaques. Après les 24 heures précédentes, on enlève le milieu des puits, on les rince avec du milieu frais et on remet 1 mL de milieu propre dans chaque puits. On choisit ensuite les échelles de concentration à l'aide du calcul des concentrations des deux solutions mères de particules : 675  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les 15 nm, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les 27 nm. On ajoute donc, dans les puits, les volumes suivants de nanoparticules (27 nm d'abord, 15 nm ensuite) :

15 nm	C <sub>puits</sub> (µg/mL)	10	10	20	20	50	50	100	100
675 µg/mL	Volume ajouté (µL)	15	15	31	31	80	80	174	174

27 nm	C <sub>puits</sub> (µg/mL)	5	5	10	10	20	20	50	50	100	100
500 µg/mL	Vol ajouté (µL)	10	10	20	20	42	42	111	111	250	250

Les deux puits suivants sont des contrôles (l'un contenant du milieu et des cellules, l'autre seulement du milieu). On laisse incuber 24 heures à 37°C.

- *Alamar Blue* Après l'incubation avec les nanoparticules, on vide chaque puits précautionneusement (sans toucher le fond des puits, où sont accrochées les cellules) et on ajoute partout 200 µL d'Alamar Blue x10 dilué 10 fois. On laisse incuber 4 à 5 heures à 37°C (plus l'incubation sera longue, meilleur sera le résultat). On effectue ensuite une lecture colorimétrique sur les plaques dont les puits ont changé de couleur (passage du bleu au violet-rose).
- *Caractérisation (colorimétrie)* Les plaques sont passées au lecteur de plaques BioteK. Pour cela, on transvase le contenu des plaques dans de nouvelles plaques, afin d'éviter la diffusion due aux cellules collées au fond. On effectue une mesure d'absorbance à 570 nm, une à 600 nm et une mesure de fluorescence. Une seconde lecture est réalisée 48 heures après (soit 3 jours après contact avec les nanoparticules).
- Membranes en compression
  - *Préparation de la membrane* On prépare une membrane lipidique monocouche DPPC-cholestérol 70/30 à 1 mM dans un mélange chloroforme :éthanol 4:1. Le blanc en compression est effectué avec une sous-couche aqueuse. On comprime la membrane phospholipidique jusqu'à 40 mN/m. On injecte ensuite à la seringue 415 µL de nanoparticules 15 nm, ce qui correspond à une concentration de 20 µmol/L. On comprime à nouveau, en présence de nanoparticules, pour observer la différence avec le blanc.
- WGA
  - *Ensemencement* On choisit une souche de cellules épithéliales MDCK. L'ensemencement est réalisé de la même façon que pour le test Alamar Blue, mais dans des puits de 30 µL et avec 15 000 cellules par puits (la confluence sera atteinte à  $2,5 \times 10^5$  cellules par cm<sup>2</sup>, soit 30 000 cellules par puits). On met donc 15 µL de la solution mère contenant 4 millions de cellules dans chaque puits. Néanmoins, il faut

cette fois laisser la trypsine agir 15 minutes au lieu de 30 secondes. Le milieu est lui aussi légèrement différent : on utilise du DMEM avec phénol red contenant 10% de sérum bovin et 1% d'antibiotique/antifongique. On laisse ensuite les plaques à incuber 48 heures à 37°C.

- *Incubation* Après les 48 heures, on ajoute les nanoparticules selon le schéma suivant :

27 nm	Vol (μL)	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2
15 nm	Vol (μL)	0,1	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2

On laisse trois puits contrôle, sans nanoparticules. On laisse incuber 48 heures à 37°C.

- *WGA* Après 48 heures, on rince les puits en remplaçant le milieu par du milieu frais, et on ajoute le WGA à 1 mg/mL, en diluant de façon à avoir 10 μg/mL dans chaque puits. On laisse incuber 30 minutes à 37°C, puis on analyse les résultats au microscope à fluorescence.
- *Caractérisation* L'effet des nanoparticules sur les membranes est étudié au microscope à fluorescence, sous une longueur d'onde correspondant au vert, après rinçage des puits au PBS.