**Contribution aux exercices de prospective 2020-2030**

**Sciences Nucléaires et Vivant**

**Micro-Analyse Chimique Multi-élémentaire par Microsonde Nucléaire. Applications à l’Étude de l’Homéostasie Cellulaire en réponse à différentes conditions de Stress Physico-chimiques**

(contact H. Seznec, P. Barberet)

La spectrométrie d’émission X induite par particules chargées accélérées (PIXE) est une méthode permettant d’analyser les éléments chimiques dont la concentration est au moins supérieure à 1 à 10 µg.g-1. Son principe est basé sur l’ionisation des atomes de l’échantillon par le faisceau de particules chargées incidentes et la mesure du rayonnement X émis par les atomes ionisés lors de leur retour à l’état fondamental. La proportionnalité entre la concentration d’un élément chimique et l’intensité de l’émission X correspondante permet une analyse quantitative de la composition chimique de l’échantillon. La spectrométrie PIXE occupe depuis toujours une place centrale dans l’analyse de la composition chimique des échantillons biologiques en raison de la concordance entre les éléments chimiques constitutifs du Vivant et ceux observables par la méthode PIXE. La méthode permet d’analyser tous les éléments chimiques de numéro atomique supérieur ou égal à celui sodium. La conjonction de ces deux facteurs, forte sensibilité et gamme de Z observables, donne à la méthode PIXE la possibilité d’analyser la concentration d’une part importante des éléments chimiques constitutifs de la matière biologique. La mesure de la composition chimique des échantillons biologiques avec une grande sensibilité a été rapidement mise à profit dans le cadre d’études du fonctionnement normal ou pathologique des organismes vivants. L’idée d’utiliser la composition chimique comme un marqueur de l’activité biologique s’est imposée rapidement et constitue le socle des études PIXE des échantillons biologiques.

L’adéquation de la méthode PIXE avec le domaine de la biologie s’est malgré tout renforcée grâce au développement de lignes d’analyse possédant une résolution spatiale micrométrique (µ-PIXE). Le gain en résolution spatiale de la méthode PIXE correspond à une avancée majeure pour l’analyse en biologie car il permet d’étudier la distribution des éléments chimiques à l’échelle cellulaire dans les tissus, ou aux interfaces. Les domaines d’application en biologie sont très variés et reflètent la volonté d’exploiter les nouvelles possibilités d’analyse offertes par ces techniques sensibles et spatialement résolues.

L’ensemble des développements techniques et travaux de recherche effectués ces dernières années autour des microsondes nucléaires, et plus particulièrement autour de la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d’Ions en Région Aquitaine), ont permis de créer un environnement propice aux développements de recherche transdisciplinaire en biologie et chimie du vivant afin de caractériser les bases fondamentales **(i)** des effets biologiques induits par des stress physiques et/ou chimiques (Rayonnements ionisants, nanoparticules d’oxydes métalliques, métaux) ; **(ii)** de comparer des conditions physiologiques normales *versus* pathologiques (cancer, maladies neurodégénératives), **(iii)** de développer des méthodes d’analyses et de reconstruction tomographique par proton à l’échelle micrométrique ; **(iv)** d’évaluer de nouvelles potentialités thérapeutiques (biomatériaux,…).

Parmi les développements méthodologiques, nous pouvons citer la mise au point de protocoles permettant d’adapter les techniques d’analyse µ-PIXE aux exigences des études systématiques requises lors d’analyses d’échantillons biologiques à l’échelle cellulaire. Cela concerne l’optimisations des protocoles de préparation d'échantillon, le couplage des microsonde nucléaires avec d'autres techniques d'imagerie dans une approche corrélative et l'augmentation du nombre de cellules analysées par unité de temps afin de répondre aux exigences de l'analyse statistique. Ainsi, la plateforme AIFIRA qui repose sur un accélérateur électrostatique simple étage délivrant des faisceaux d’ions légers (H+, D+, He+) dans la gamme du MeV, dispose d’une microsonde nucléaire et permet la mise en œuvre les techniques analyse quantitative multi-élémentaire à des échelles allant du centimètre au micromètre. Cette approche est particulièrement pertinente pour localiser et quantifier des éléments inorganiques dans des échantillons biologiques à l’échelle de la cellule. L’analyse µ-PIXE a notamment été mise en œuvre dans le cadre de projets scientifique visant à déterminer l’impact de l’internalisation de nanoparticules métalliques ou d’oxydes métalliques sur l’homéostasie ionique. Ces projets ont pu mener à des développements techniques et méthodologiques mis à disposition de la communauté par le groupe iRiBio du CENBG.

Ainsi et pour exemple, dans le cadre de l’étude des conséquences d’exposition à des nanoparticules d’oxydes métalliques (NPs TiO2), nous avons validé une méthodologie expérimentale afin de détecter, de suivre et de déterminer les conséquences biologiques induites par ces NPs TiO2 au sein de systèmes biologiques uni- (*in cellulo*) et multicellulaires (*in vivo*, nématode *Caenorhabditis elegans*).

La synthèse et la caractérisation de NPs TiO2 aux propriétés contrôlées (taille, forme, réactivité de surface, fonctionnalisation) ont été réalisée en étroite relation avec les chimistes de l’ICMCB. Les expositions et les analyses réalisées au CENBG. Ces études, et notamment l’analyse chimique multi-élémentaire par µ-PIXE, ont permis de montrer une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire dans différents types cellulaires (kératinocytes primaires, cellules endothéliales) avec une altération de la prolifération cellulaire et l’induction de processus de différenciation cellulaire. Cette augmentation de calcium intracellulaire est liée à la nature et à la quantité internalisée de NPs TiO2 etest fonction du type de NPs et du type cellulaire.Cette étude a par la suite permis d’associer le niveau de toxicité des de la NPs TiO2, au niveau de calcium intracellulaire et au niveau d’altération des mécanismes de régulation du stress du réticulum endoplasmique.

Ces données originales sont aujourd’hui exploitées afin de contribuer à la compréhension des mécanismes impliquées dans les approches thérapeutiques émergentes associant la combinaison d’injection de nanoparticules métalliques ou d’oxydes métalliques et des rayonnements ionisants dans l’objectif d’optimiser le ratio thérapeutique en radiothérapie. Ces études réalisées en partenariat avec des services cliniques en oncologie-radiothérapie permettent également de reconsidérer les effets biologiques radio-induits en étudiant la réponse de la cellule au travers de son homéostasie ionique.