

Nanotechnologies

pour la nanomédecine

Questions sur la toxicité et aspects réglementaires

Elias Fattal est professeur de Pharmacie Galénique à l'Université Paris-Sud et directeur de l'Institut Galien¹. Il a présidé l'association de Pharmacie Galénique Industrielle de 2003 à 2010 (APGI²).

L'objectif de ce chapitre est d'aborder les questions de toxicité et les aspects réglementaires relatifs aux nanomédicaments. Nous tenterons d'apporter des réponses à ces questions à la lumière des connaissances scientifiques acquises sur leur devenir dans l'organisme ainsi que leur dégradation et leur élimination.

1 Les nanomédicaments sont-ils des médicaments comme les autres ?

1.1. Le développement clinique des nanomédicaments est similaire à celui des autres médicaments

Les nanomédicaments sont des médicaments comme les

autres pour toute une partie de leur développement (**Figure 1**) puisqu'ils subissent pendant de nombreuses années les étapes d'évaluation clinique telles que décrites sur la **Figure 1** (et dans le **Chapitre de D. Bazile** dans cet ouvrage *Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies*, EDP Sciences, 2019). À la suite de leur commercialisation, l'apparition d'effets indésirables reste sous observation. Il faut enfin souligner que l'étude de la sécurité des médicaments est très importante comparativement aux produits de consommation.

1.2. Les nanomédicaments, une facette particulière des nanotechnologies

Les nanomédicaments font partie des nanomatériaux dans le domaine de la santé dans la mesure où ils répondent aux définitions

1. www.umr-cnrs8612.u-psud.fr/

2. www.apgi.org/

Phase I : étude de l'évolution de la molécule testée dans l'organisme en fonction du temps (pharmacocinétique) et analyse de la toxicité sur l'être humain.	Phase II : administration du médicament à un petit nombre de patients pour rechercher la plus petite dose efficace et observer des effets secondaires nocifs en utilisant différentes doses .
Phase III : comparaison de l' efficacité du nouveau médicament par rapport au traitement de référence et/ou à un placebo.	Phase IV : les essais sont réalisés une fois le médicament commercialisé . Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande échelle et sur le long terme sa tolérance .

Figure 1

Les nanomédicaments doivent subir les mêmes étapes d'études cliniques que les autres médicaments pour aboutir à la demande d'autorisation de mise sur le marché par les agences du médicament.

et aux normes définies par l'Union Européenne. La Commission Européenne définit les nanotechnologies ainsi : « Un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres ou sous forme d'agrégat ou encore sous forme d'agrégat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ».

Il existe aussi une Norme ISO TS 80004-1 dont la définition est la suivante : « Un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm, ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique »

1.3. Les caractéristiques d'un nanomédicament

Un nanomédicament est constitué d'un cœur liquide ou solide contenant la substance active et entouré d'une couronne (Figure 2). C'est la couronne qui sera exposée au milieu biologique et qui permettra d'exercer trois fonctions importantes :

- une fonction de stabilisation, c'est-à-dire permettre d'éviter les phénomènes d'agrégation en milieu biologique ;

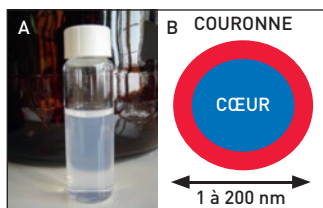
- la possibilité d'éviter sa destruction par les cellules du système immunitaire ;
- la possibilité d'y attacher un ligand pour permettre la reconnaissance d'une cible cellulaire (Figure 2).

Il existe une grande diversité parmi les nanomédicaments présents sur le marché et/ou en phase d'études cliniques (Figure 3). Les plus anciens sont les liposomes³, qui sont à l'origine de toute la démarche dite de vectorisation⁴. On distingue aussi les nanoparticules solides lipidiques et les nanoémulsions, qui ont fait l'objet d'applications plus mineures. Les systèmes conçus à partir de polymères ou de copolymères biodégradables, que l'on dénomme des nanosphères ou des nanocapsules, ont été découverts bien plus tard. La taille de ces nanomédicaments varie de 50 à 200 nm.

Il existe des objets de plus petite taille, de l'ordre de la dizaine ou de la vingtaine de nanomètres : les micelles, les petites nanoparticules de silice ou d'oxyde métallique

3. Liposome : vésicule artificielle formée par des bicouches lipidiques emprisonnant un compartiment aqueux.

4. Vectorisation : consiste à moduler et contrôler la distribution d'un principe actif vers une cible en l'associant à un vecteur.

**Figure 2**

A) Une suspension aqueuse de nanoparticules.
B) Un nanomédicament est composé d'un cœur, réservoir des substances actives, et d'une couronne.

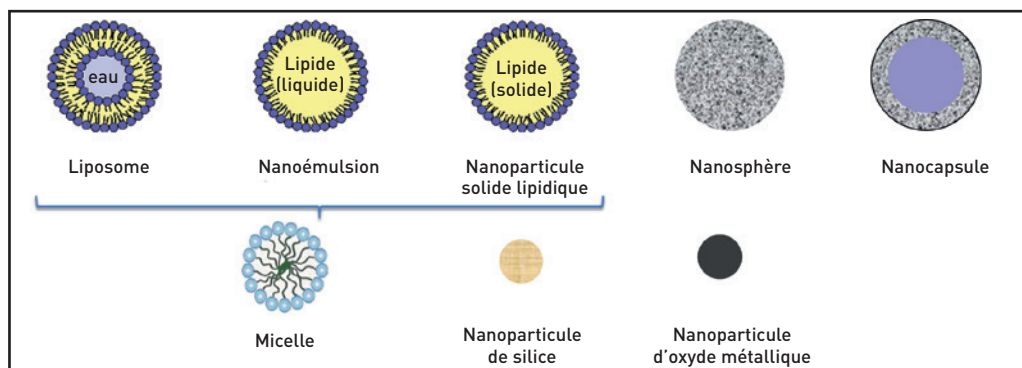


Figure 3

Diversité des nanomédicaments sur le marché et en phase d'étude clinique (à titre d'exemples, des particules de diamètre entre 50 et 200 nm de composition lipidique ou polymère sur la première rangée, et des particules de diamètre inférieur à 50 nm sur la seconde rangée).

(Figure 3). Sur la Figure 4, sont listés des nanomédicaments qui sont sur le marché. Ce sont les particules découvertes les premières, c'est-à-dire les liposomes, qui ont donné naissance à un plus grand nombre de médicaments. Parmi les substances actives, on distingue très nettement des molécules qui existaient déjà et qui ont été reformulées au sein de ces liposomes pour obtenir des propriétés nouvelles grâce à la vectorisation.

L'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM). Les autres agences européennes (European medicine evaluation agency, EMEA), américaine (Food and Drug Agency, FDA) ou japonaise (Ministry of Health Labour and WellFare (MHLV) ont émis un certain nombre de recommandations que l'on peut trouver sur leurs sites Internet (Figure 4). La recommandation française concernant les études de toxicité à réaliser sur les nanomédicaments est très détaillée.

2 Développement d'un nanomédicament

2.1. La réglementation pour la mise sur le marché

Il n'existe pas de réglementation précise pour la mise sur le marché des nanomédicaments comparativement à d'autres médicaments mais uniquement des recommandations effectuées par les agences nationales ou européennes. En France, ces recommandations sont proposées par



Figure 4

Les industriels souhaitant développer des nanomédicaments doivent suivre des recommandations extrêmement détaillées qui diffèrent selon les États et que l'on peut trouver sur les sites Internet des différentes agences qui réglementent la mise sur le marché des médicaments.

Tableau

Liste des principaux nanomédicaments sur le marché (à noter que toutes ces spécialités n'ont pas obtenu l'autorisation de mise sur le marché en France).

	Nom commercial	Substance Active	Domaine d'application	Voie d'administration	Année de commercialisation
Nanoparticules Protéiques					
Albumine	Abraxane®	Paclitaxel	Cancer	Intraveineuse	2005
Nanoparticules lipidiques					
Liposomes	AmBisome®	Amphotéricine B	Infectieux	Intraveineuse	1997
Liposomes	DaunoXome®	Daunorubicine	Cancer	Intraveineuse	1996
Liposomes	DepoCyt®	Cytarabine	Cancer	Intratéchale	1999
Liposomes	DepoDur®	Morphine	Douleur	Épidurale	2004
Liposomes	Doxil/ Caelyx®	Doxorubicin	Cancer	Intraveineuse	1995
Liposomes	Exparel®	Bupivacaine	Analgésie	Local	2011
Liposomes	Marqibo®	Vincristine	Cancer	Intraveineuse	2012
Liposomes	Mepact®	Mifamurtide	Cancer	Intraveineuse	2009
Liposomes	Myocet®	Doxorubicin	Cancer	Intraveineuse	2000
Liposomes	Visudyne®	Verteporfin	Ophtalmologie	Intraveineuse	2002
Liposomes	MM-398®	Irinotecan	Cancer	Intraveineuse	2015
Liposomes	Onpatro®	ARN interférent	Amyloïdose héréditaire à transthyrétine	Intraveineuse	2018
Nanoparticules solides lipidiques	Abelcet®	Amphotéricine B	Infectieux	Intraveineuse	1995
Nanoparticules solides lipidiques	Amphotec®	Amphotéricine B	Infectieux	Intraveineuse	1996
Nanoémulsion	Diprivan®	Propofol	Anesthésie	Intraveineuse	1989
Nanoémulsion	Durezol®	Difluprednate	Ophtalmologie	Oculaire	2008
Nanoémulsion	Restasis®	Cyclosporine A	Ophtalmologie	Oculaire	2003
Nanoémulsion	Ikervis®	Cyclosporine A	Ophtalmologie	Oculaire	2015
Nanoparticules métalliques					
Nanoparticules d'oxyde métallique	Feraheme®	Ferumoxytol	Anémie par carence en fer	Intraveineuse	2009

Cependant, elle date de 2011 et n'a pas fait l'objet d'une mise à jour. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces documents est extrêmement important et constitue une base solide pour guider les industriels qui souhaitent développer un nanomédicament.

2.2. Recommandations pour la conception d'un nanomédicament

En amont de la formulation d'un nanomédicament, il est important de réfléchir aux caractéristiques du support (le cœur). La propriété la plus importante concerne la biodégradabilité du matériau qui le compose. On utilisera donc de préférence des lipides, des polymères, qui peuvent être synthétiques ou des biopolymères, ou encore des protéines (albumine). Des matériaux solubles, comme la silice, peuvent être envisagés ou d'autres considérés insolubles tels que les oxydes métalliques (oxydes de fer). Ces derniers ne sont pas considérés biodégradables mais ils peuvent se dissoudre très lentement dans l'organisme et être ensuite éliminés. Il faudra cependant en faire la démonstration.

Une autre approche très récente consiste à associer de manière covalente la substance active à un polymère ou à un lipide et transformer ces conjugués en nanoparticules.

La seconde caractéristique à prendre en compte, notamment du point de vue toxicologique, concerne la composition de la surface (la couronne). Cette couronne peut être

constituée de lipides chargés, de polymères amphiphiles, de polymères hydrophiles [polyéthylène glycol (PEG)] ou de biopolymères comme l'acide hyaluronique. Il est possible, pour réaliser un ciblage, d'ajouter à cet édifice un ligand spécifique d'un récepteur membranaire. Le ligand peut être un anticorps, un aptamère⁵ ou une petite molécule.

Quand le cœur et la couronne sont assemblés, il faut s'assurer de la stabilité chimique de cet ensemble, particulièrement de ce que l'on appelle la stabilité colloïdale⁶, car l'aggrégation des particules dans l'organisme peut entraîner des embolisations et induire ainsi un effet délétère d'un point de vue toxicologique.

2.3. Recommandations concernant la caractérisation d'un nanomédicament

La fabrication d'un nanomédicament est accompagnée d'un ensemble de caractérisations de manière à bien définir ses propriétés. Il s'agit du diamètre moyen, de la distribution granulométrique, de la stabilité, de la morphologie, de la charge de surface, de la déformabilité, de la cristallinité et de l'organisation moléculaire quand cela est possible et nécessaire. Les

5. Aptamère : oligonucléotide synthétique, le plus souvent un ARN, qui est capable de fixer un ligand spécifique et parfois de catalyser une réaction chimique sur ce ligand.

6. Colloïde : suspension d'une ou plusieurs substances, dispersées régulièrement dans une autre substance, formant un système à deux phases séparées.

recommandations insistent sur le fait qu'il faut absolument mesurer la libération des substances actives à partir du nanomédicament dans des milieux simulés.

Pour ce qui est du procédé de fabrication, il faut absolument prendre en compte les possibilités de transposition d'échelle. C'est un élément important qu'il faut anticiper pour être capable d'industrialiser le procédé et de produire de manière semi-industrielle ou industrielle des lots pour les essais cliniques dont les caractéristiques sont les plus proches de celles du produit de départ.

2.4. Exemple de la formulation des nanoparticules lipidiques de Dexaméthasone

Une équipe de l'Institut Galien Paris-Sud a développé un nanomédicament constitué par du palmitate de Dexaméthasone (DXP), un anti-inflammatoire capable de former, en présence d'un phospholipide couplé au polyéthylène glycol (DSPE-PEG), des nanoparticules⁷. Les études de morphologie réalisées en microscopie électronique ont permis de confirmer la forme sphérique des nanoparticules. Leur taille et leur potentiel zêta ont permis de conclure sur leur homogénéité et leur excellente stabilité colloïdale.

7. Lorscheider M., Tsapis N., Ur-Rehman M., Gaudin F., Stolfa I., Abreu S., Mura S., Chaminade P., Espeli M., Fattal E. (2019). Dexamethasone palmitate nanoparticles: An efficient treatment for rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 296 : 179-18.

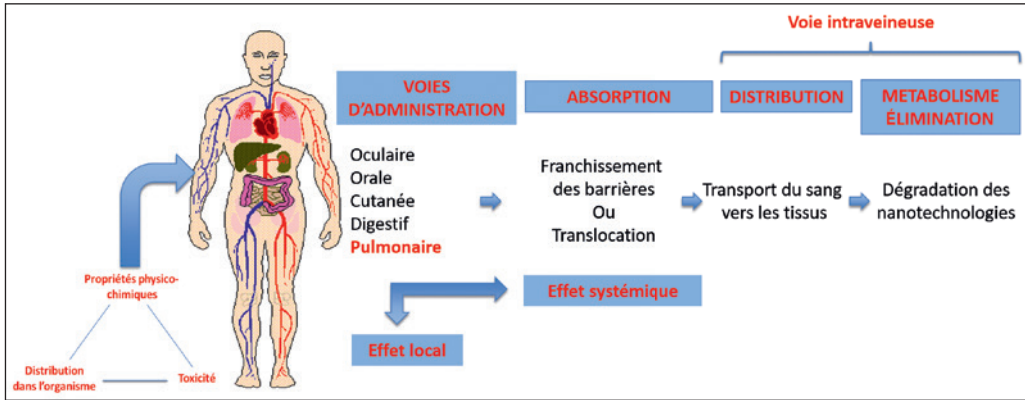
Enfin, grâce à la diffraction aux rayons, il a été possible de déterminer que le principe actif, qui ici est cristallin, se retrouve sous forme amorphe quand il est formulé sous forme de nanoparticules.

3 Les nanomédicaments dans le corps humain

3.1. Biodistribution des nanomédicaments

Les voies d'administration des nanomédicaments sont très variables. Bien que la plupart des formulations sur le marché aient été envisagées pour la voie parentérale (particulièrement la voie intraveineuse), ils peuvent aussi être administrés par voie oculaire, orale, cutanée, digestive, nasale ou pulmonaire (*Figure 5*). Pour ces dernières voies, les nanomédicaments peuvent être retenus localement et libérer la substance active *in situ*. Le corps humain possède cependant des barrières qui ne sont pas toujours infranchissables. Une certaine quantité de nanoparticules pourra subir un phénomène d'absorption correspondant au franchissement de ces barrières. L'action du médicament passe d'un effet local à un effet systémique⁸ puisque les particules se retrouvent dans le sang et seront ensuite transportées vers les tissus dans ce qui constitue la phase de distribution. Les nanomédicaments subissent ensuite un métabolisme puis l'élimination

8. Effet systémique : action d'une substance après son transport à travers les vaisseaux et sa pénétration dans les tissus.



des produits de dégradation. Quand le nanomédicament est directement administré par voie intraveineuse, la phase d'absorption est absente et les particules se distribuent directement dans les tissus accessibles.

Les propriétés physico-chimiques des nanomédicaments conditionnent leur distribution dans l'organisme. De cette biodistribution peuvent découler des effets toxiques (Figure 5).

Les paramètres qui régissent les différentes phases de la pharmacocinétique des nanoparticules sont illustrés sur la Figure 6. Il existe dans l'organisme deux organes possédant une grande surface favorisant l'absorption des nanoparticules : ce sont les poumons et le tube digestif. Une fois dans le sang, leur distribution vers les tissus dépend de leur durée de vie dans le compartiment sanguin.

Celle-ci est fonction de l'adsorption des protéines et plus précisément de qu'on appelle l'opsonisation, qui, selon qu'elle survient ou non, entraîne deux types de

comportements : une élimination rapide par le système immunitaire dans le cas d'une adsorption importante, ou une longue circulation dans le sang si la surface des nanoparticules est conçue de manière à repousser les opsonines.

La métabolisation des nanoparticules concerne leurs constituants qui sont dégradés au niveau de certains organes ou au niveau des cellules cibles, et leur élimination. Cependant dans certains cas, les nanoparticules de très faible diamètre (<5 nm)

Figure 5

Étapes de la pharmacocinétique des nanoparticules.

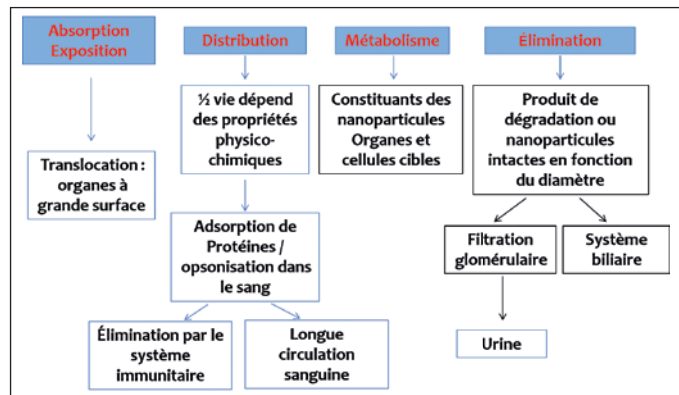
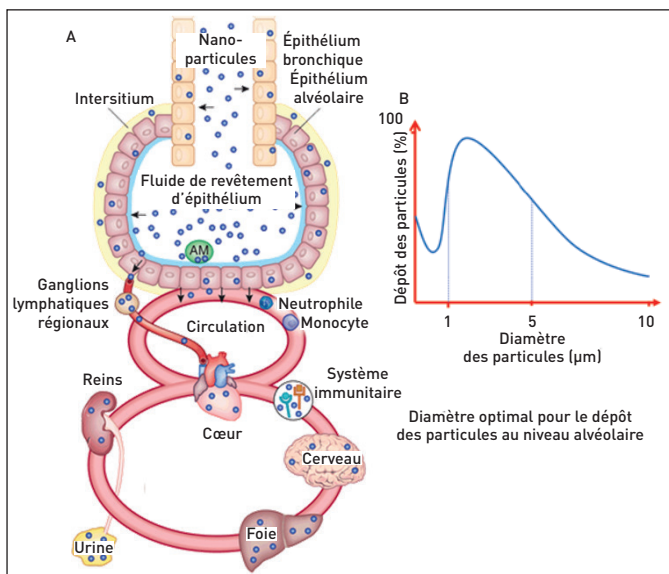


Figure 6

Les principales étapes de la biodistribution des nanoparticules.

Figure 7

Voies de biodistribution des nanoparticules administrées au niveau pulmonaire : A) lorsque des nanoparticules sont administrées au niveau pulmonaire, en fonction de leur taille, elles vont soit rester au niveau pulmonaire soit passer au niveau sanguin ; B) les particules de petite taille sont captées et restent localisées au niveau bronchique ou alvéolaire.



sont éliminées intactes. L'élimination s'effectue par filtration glomérulaire⁹ au niveau des urines ou des fèces après passage par le foie et excrétion biliaire.

3.2. Exposition aux nanoparticules et toxicité cellulaire

Parmi les différentes voies d'exposition aux nanoparticules, c'est la voie pulmonaire qui entraîne le plus de risques. En effet, après inhalation de nanoparticules, deux situations peuvent se présenter (**Figure 7**) :

- soit les nanoparticules passent au niveau sanguin où elles vont subir le même circuit que les particules injectées par voie intraveineuse : le plus souvent ce sont les particules de très petite taille qui

traversent les barrières (ici, les barrières épithéliales et endothéliales) ;

- soit les nanoparticules demeurent localement au niveau pulmonaire et peuvent être captées par des cellules appelées macrophages alvéolaires ou par des cellules bronchiques ou alvéolaires. Fort heureusement, suite à leur inhalation, les nanoparticules sont en partie exhalées ou alors captées au niveau bronchique là où elles subissent une élimination par le biais de la clairance muco-ciliaire. Cependant, une fraction non négligeable sera capable d'atteindre la zone alvéolaire. Dans ce cas, l'exposition pulmonaire aux nanoparticules entraînera une toxicité locale qui va affecter l'ensemble des populations cellulaires de l'arbre pulmonaire.

Au niveau cellulaire, les nanoparticules peuvent présenter différents types de toxicité cellulaire : la réponse

9. Filtration glomérulaire : filtration du sang par le glomérule du rein, menant à la formation d'urine primitive.

inflammatoire, la génotoxicité¹⁰, l'immunotoxicité et la toxicité sur la reproduction. Les nanoparticules peuvent aussi en raison du phénomène de ciblage favoriser la toxicité des substances actives. Elles peuvent enfin augmenter la toxicité des additifs et donc entraîner des toxicités inattendues alors que souvent, les études toxicologiques, réalisées sur des nanomédicaments, ont tendance à oublier ces additifs.

4 Exemple d'étude de toxicité

4.1. Les nanoparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) induisent-elles une toxicité pulmonaire après inhalation ?

L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA, **Figure 8**) est un copolymère biodégradable qui en se dégradant produit l'acide lactique ainsi que l'acide glycolique, bien tolérés par l'organisme et totalement éliminés. Ces copolymères possèdent donc des propriétés intéressantes pour la vectorisation (voir le **Chapitre de D. Bazile**). Des nanoparticules de PLGA ont été formulées en présence d'additifs, qui confèrent à ces particules des charges de surfaces différentes, tout en gardant un diamètre de l'ordre de 200 nm avec une excellente homogénéité. Leur toxicité a ensuite été testée avec

10. Génotoxicité : une substance (produit chimique de synthèse ou agent naturel naturellement génotoxique) ou un rayonnement sont dits génotoxiques quand ils peuvent compromettre l'intégrité physique (cassure chromosomique) ou fonctionnelle du génome.

des cellules bronchiques, qui sont les premières cellules avec lesquelles les nanoparticules rentrent en contact.

4.2. Toxicité cellulaire

4.2.1. Interaction avec les cellules bronchiques modèles

Afin de tester la toxicité locale des nanoparticules de PLGA, nous avons cultivé sous la forme de monocouches des cellules d'origine cancéreuse (appelées Calu-3) mimant les cellules bronchiques et capables de produire en surface du mucus (**Figure 9**). Les nanoparticules de PLGA sont déposées sur ce tapis cellulaire, et grâce au marquage fluorescent du mucus (vert) et des nanoparticules (rouge), il a été possible d'observer leur comportement vis-à-vis de ces cellules (**Figure 9**). On a constaté des comportements très différents selon les propriétés de surface des nanoparticules. Une forte interaction avec le mucus se traduit par une superposition des deux couleurs alors que lors d'une mucopénétration, la superposition est beaucoup plus faible. Les nanoparticules recouvertes de poloxamère 188 se sont montrées les plus

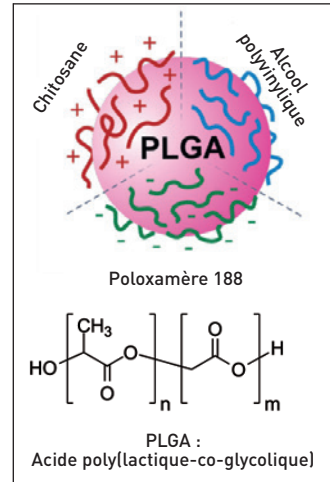


Figure 8

Le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) représente le cœur du médicament, on peut y ajouter une surface chargée positivement ou négativement, ou encore une surface neutre, qui constitue la couronne. Le chitosane est un polymère cationique naturel. Le poloxamer 188 est un copolymère d'oxyde d'éthylène et de propylène et enfin le PVA est l'alcool polyvinylique.

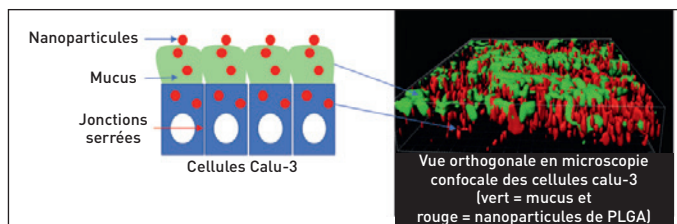


Figure 9

Les cellules bronchiques, les Calu-3, modélisent les bronches et produisent du mucus à la surface.

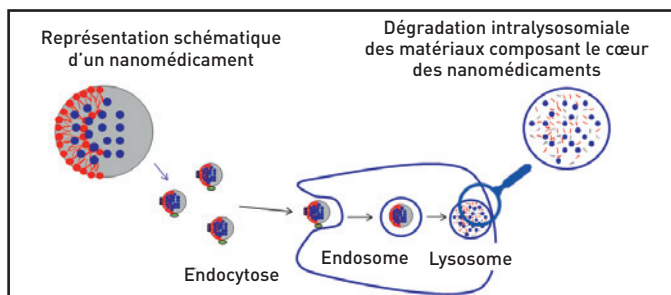


Figure 10

Internalisation des nanoparticules par endocytose.

mucopénétrantes. Elles traversent le mucus et sont très vite capturées par les cellules¹¹. D'une manière générale, les nanoparticules sont captées par endocytose¹² (Figure 10).

Dans la cellule, les particules se concentrent dans un compartiment appelé lysosome. Les lysosomes sont riches en enzymes capables de détruire les matériaux constituant les nanoparticules à condition qu'ils soient biodégradables (Figure 18). Si ce n'est pas le cas, il y a une accumulation qui entraîne une mort cellulaire.

4.2.2. Réponse inflammatoire

Même si les nanoparticules de PLGA pénètrent dans les cellules bronchiques, il a été montré qu'elles n'entraînent pas de réponse inflammatoire comme le témoigne

la sécrétion des cytokines (interleukine 6 et 8) par ces cellules au contact des nanoparticules¹³.

4.2.3. Génotoxicité

La génotoxicité des nanoparticules de PLGA a été étudiée par une équipe de l'Institut Pasteur de Lille sur des modèles de cellules bronchiques proches des cellules Calu-3. Le principe du test est le suivant : les particules sont incubées en présence des cellules. Le noyau cellulaire est ensuite isolé. Si l'ADN contenant les gènes est brisé par la toxicité, on voit apparaître une comète, d'où le nom de test des comètes. Dans le cas du PLGA, la génotoxicité observée est faible, elle n'apparaît qu'à des concentrations élevées quand les particules sont recouvertes à leur surface par un tensioactif cationique¹⁴.

4.2.4. Immunotoxicité

L'étude de l'immunotoxicité consiste à déterminer si les nanoparticules agissent comme des antigènes, c'est-à-dire qu'elles génèrent des signaux de danger en présence de certaines cellules qui vont entraîner une réponse

11. Mura S., Hillaireau H., Nicolas J., Kerdine-Roemer S., Le Droumaguet B., Delomenie C., Nicolas V., Pallardy M., Tsapis N., Fattal E. (2011). Biodegradable Nanoparticles Meet the Bronchial Airway Barrier: How Surface Properties Affect Their Interaction with Mucus and Epithelial Cells. *Biomacromolecules*, 12 : 4136-43.

12. Endocytose : mécanisme de transport en commun de molécules voire de particules (virales, bactériennes, etc.) vers l'intérieur de la cellule.

13. Mura S., Hillaireau H., Nicolas J., Le Droumaguet B., Gueutin C., Zanna S., Tsapis N., Fattal E. (2011). Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International Journal of Nanomedicine*, 62591-2605.

14. Platel A., Carpentier R., Becart E., Mordacq G., Betbeder D., Nesslany F. (2016). Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. *Journal of Applied Toxicology*, 36 : 434-44.

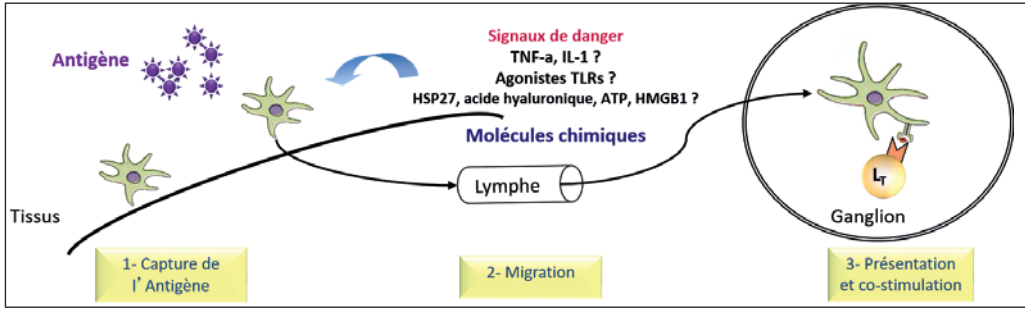


Figure 11

Principe du test d'immunotoxicité sur les cellules dendritiques : la capture d'un antigène (1) par la cellule déclenche un signal de danger vis-à-vis des lymphocytes (2) et une réponse immunitaire (3).

immunitaire. Ce test est réalisé avec des cellules dendritiques avec lesquelles des nanoparticules de PLGA sont mises en contact (Figure 11) et les résultats sont comparés à une endotoxine¹⁵, signal de danger, le lipopolysaccharide (LPS) (Figure 12). Quelle que soit la nature de la surface des particules, on ne voit pas de modification du phénotype des cellules dendritiques, ni de sécrétion très élevée de cytokines pro-inflammatoires¹⁶.

4.3. Biodistribution et élimination des nanoparticules chez la souris

L'étude de la biodistribution et de l'élimination des nanoparticules administrées dans

15. Endotoxine : toxine contenue dans un germe (bactérie) qui reste à l'intérieur du cytoplasme au lieu de diffuser à l'extérieur [opposé à exotoxine].

16. Barillet S., Fattal E., Mura S., Tsapis N., Pallardy M., Hillaireau H., Kerdine-Römer S., Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology*, <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1564078>.

	LPS	NP PLGA/CS	NP PLGA/PVA	NP PLGA/PF68
Phénotype				
CD86	+	-	-	-
CD83	+	-	-	-
CD40	+	-	-	-
HLA-DR	-	-	-	-
Cytokines/chimiokines inflammatoires				
IL-6	+++	-	+	-
TNF-α	+++	-	++	+
IL-8	+++	++	++	-
IL-10	++	+	+	-
RANTES	+++	-	+	-
MCP-1	-	-	-	-

- Peu ou pas d'induction de marqueurs membranaires
- Augmentation de la sécrétion de cytokines/chimiokines (< LPS)

la trachée, réalisée par un suivi en temps réel à partir de mesures spectrométriques en proche infrarouge, montrent que les nanoparticules de PLGA, quelles que soient leurs propriétés de surface, se concentrent principalement au niveau des poumons sans être absorbées. Le temps de demi-vie d'élimination de ces particules, notamment par la contribution de l'exhalation et de la clairance muco-ciliaire,

Figure 12

Effet des nanoparticules sur les cellules dendritiques : comparaison des résultats des nanoparticules de PLGA avec différentes surfaces, avec ceux du LPS qui est immunotoxique et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

est d'une vingtaine d'heures environ¹⁷.

4.4. Réaction inflammatoire des poumons chez la souris

L'étude de la réaction inflammatoire pulmonaire a été réalisée chez la souris à la suite de l'administration dans la trachée de ces nanoparticules. On constate ainsi que les nanoparticules de PLGA n'entraînent pas de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Si on compare avec des nanoparticules d'oxyde de titane ou de polystyrène de la même taille, on observe dans ces deux cas une réponse inflammatoire qui croît puis diminue au cours du temps, mais la répétition de la réponse inflammatoire, à la suite d'administration répétées, peut entraîner des processus assez graves notamment d'insuffisance respiratoire.

Il a ainsi été montré qu'au niveau de la sphère pulmonaire, les nanoparticules de PLGA ne passaient pas la barrière épithéliale/endothéliale, n'induisaient pas de réponse inflammatoire, ni d'immunotoxicité, et selon les additifs utilisés pour les formuler, n'entraînaient pas de génotoxicité.

5 Biodistribution et toxicité

Afin d'aborder le problème de la biodistribution des

nanoparticules, il faut imaginer qu'elles circulent dans le compartiment sanguin et qu'elles devront ensuite franchir la paroi des vaisseaux afin d'atteindre les tissus. La biodistribution est une question complexe contrôlée par de nombreux paramètres physico-chimiques des nanoparticules :

- le diamètre ;
- les propriétés de surface, la composition, la charge, l'hydrophobie ;
- la morphologie : ce dernier paramètre fait l'objet d'études récentes que nous n'aborderons pas mais certaines études démontrent que des morphologies de nanoparticules peuvent changer leur devenir dans l'organisme. Nous nous limiterons ici au cas des particules sphériques.

5.1. Adsorption des protéines sériques à la surface des nanoparticules

L'analyse qualitative des protéines sériques qui s'associent à la surface des particules a fait l'objet de nombreuses études. La richesse du point de vue quantitatif et qualitatif des protéines associées résulte de la très grande surface des nanoparticules mais aussi de la nature de cette surface, son hydrophobie/hydrophilie, sa composition chimique. L'adsorption des protéines dépend aussi du diamètre, comme on le voit sur la **Figure 13**. Les protéines sont représentées par les points de couleur. Les nanoparticules à gauche en adsorbent énormément, celles du milieu en adsorbent moins parce qu'elles sont recouvertes de polymères hydrophiles qui ont tendance

17. Santiago L., Hillaireau H., Grabowski N., Mura S., Nascimento T., Dufort S., Coll J-L, Tsapis N., Fattal E. (2016). Compared *in vivo* toxicity in mice of lung delivered biodegradable and non-biodegradable nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10 : 292-302.

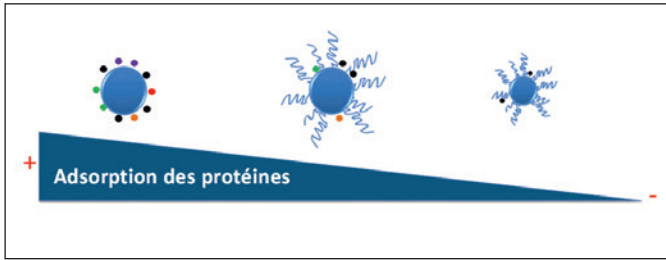


Figure 13

L'adsorption des nanoparticules dépend des propriétés de surface et du diamètre.

à repousser ces protéines, et celles de droites sont de petites tailles, ce qui diminue encore plus l'adsorption.

L'adsorption des protéines sur les nanoparticules peut entraîner des effets délétères. Il est aussi possible qu'en modifiant leur surface, on confère aux nanoparticules un tropisme extrêmement important pour l'une ou l'autre de ces protéines permettant une reconnaissance cellulaire extrêmement spécifique. L'effet toxique résultant de l'adsorption des protéines est représenté par les molécules du complément, et notamment des fractions C3 et C5, qui est discuté dans le paragraphe 5.2.

5.2. Effets toxiques de l'adsorption des protéines : le syndrome « CARPA »

Une fraction majoritaire des protéines du sang qui interagit avec les nanoparticules appartient à un ensemble de molécules appelé le système du complément¹⁸, qui est impliqué dans l'élimination des agents pathogènes. Dans ce que l'on appelle la voie alternative, la fraction importante qui interagit est la

18. Complément : le système du complément regroupe 35 protéines sériques, 12 étant impliquées directement dans l'élimination des pathogènes, les autres régulant l'activité de ces dernières.

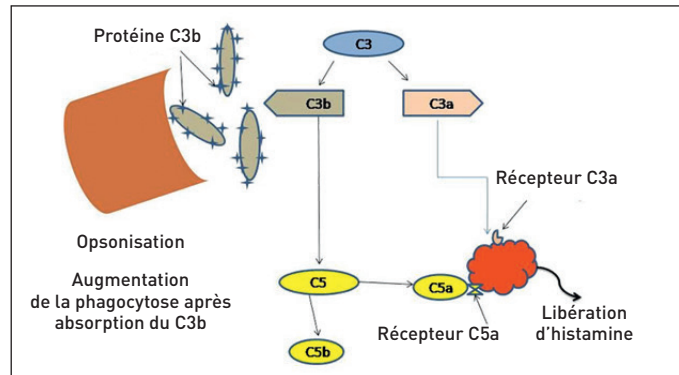


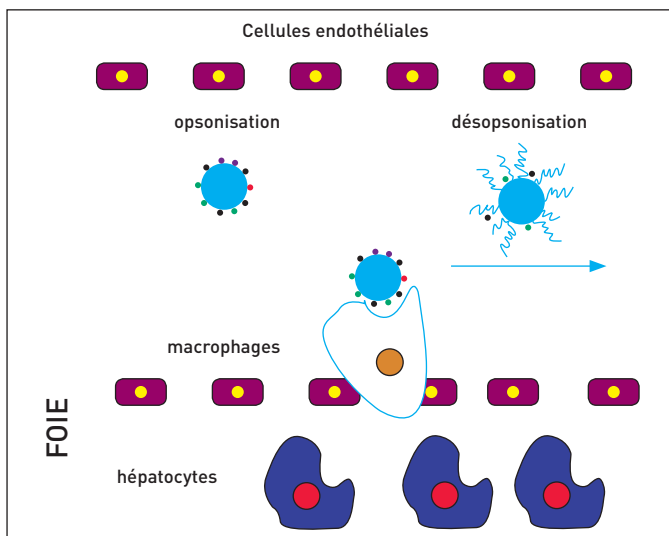
Figure 14

Effets de l'adsorption de la fraction C3 des protéines du sang sur les nanoparticules : la protéine C3 se fragmente en deux espèces, qui ont des rôles différents : les protéines C3b (rôle dans la reconnaissance par le système immunitaire) et C3a (rôle dans la libération d'histamine).

fraction C3, qui est la protéine du complément la plus abondante que l'on trouve dans le sang. Son activation engendre la formation des produits d'activation C3a, C3b, et C5a. Les espèces C3a et C5a sont responsables de la libération de médiateurs par les mastocytes dont l'histamine. Cet ensemble constitue la réponse d'hypersensibilité immédiate ou allergique à la suite de l'administration des nanoparticules (Figure 14). Ce dernier processus est dénommé syndrome CARPA pour « *complement activation-related of pseudoallergy* ». Certains patients qui ont reçu des traitements par des nanoparticules (mais aussi d'autres types de traitements) peuvent présenter cette réponse allergique qui se traduit par des effets comme par exemple une dépression respiratoire. Il est donc essentiel de contrôler *in vitro* l'activation du complément

Figure 15

Influence de l'adsorption des opsonines sur le comportement in vivo des nanoparticules. L'opsonisation permet une capture rapide par des cellules macrophagiques (cellules de Kupffer dans le foie). La désopsonisation permet une plus longue circulation des particules dans le sang.



et de développer des tests prédictifs. Il est tout aussi essentiel de mettre en œuvre une démarche clinique en préalable à l'administration par voie intraveineuse des nanoparticules, comme par exemple interroger le patient sur ses antécédents allergiques, réaliser une prémédication par des corticoïdes, ou encore effectuer une injection lente ou en perfusion.

5.3. Adsorption des protéines : opsonisation

L'espèce C3b de la fraction C3 du complément, ainsi que d'autres protéines, qui s'adsorbent sur les nanoparticules telles des immunoglobulines ou aussi de la fibronectine¹⁹, sont dénommées opsonines car elles favorisent la reconnaissance des nanoparticules par le système des phagocytes

19. Fibronectine : nom d'une classe de glycoprotéines présente dans la matrice extracellulaire et jouant un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire.

mononucléés²⁰, constitué des macrophages hépatiques (dénommées cellules de Kupffer²¹), spléniques, médullaires et pulmonaires. C'est la capture par les cellules du Kupffer qui est la plus élevée (Figure 15). La capture cellulaire s'effectue ici aussi par endocytose et les nanoparticules se retrouvent au sein des lysosomes avec les mêmes conséquences vues précédemment quant à la métabolisation des matériaux qui les constituent. Néanmoins, il existe un moyen de contourner cette capture par le phénomène de désopsonisation (Figure 15). Cet effet résulte des modifications de surface des nanoparticules qui le rendent capable

20. En immunologie, le système des phagocytes mononucléés (SPM) est une partie du système immunitaire constituée des cellules phagocytaires.

21. Cellules de Kupffer : macrophages propres au foie et notamment au lobule hépatique où ils sont très nombreux (jusqu'à environ 30 % de toutes les cellules hépatiques chez l'être humain).

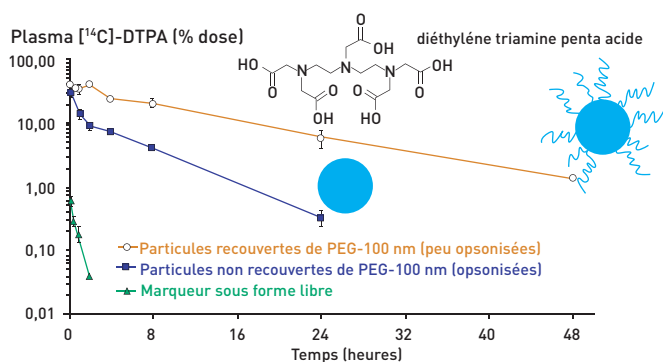


Figure 16

La pharmacocinétique de particules contenant du PEG ou non montre que l'ajout de PEG augmente considérablement la durée de vie dans le sang.

de repousser les opsonines lors des tentatives d'adsorption dans le sang.

5.3. Opsonisation : pharmacocinétique et biodistribution

La durée de vie des nanoparticules dans le sang dépend beaucoup des phénomènes d'opsonisation, comme évoqué précédemment. On voit sur la **Figure 16** que la durée de vie des nanoparticules dans le sang est très différente selon que les nanoparticules contiennent ou non du PEG.

Pour les nanoparticules qui subissent une désopsonisation, il résulte de leur longue circulation dans le sang une possibilité de sortir des vaisseaux sanguins appelée l'extravasation²² qui survient lorsque les vaisseaux sont suffisamment poreux pour les laisser passer. Ces effets sont observés non seulement dans les tumeurs mais aussi dans l'inflammation où les néovaisseaux sont désorganisés et présentent des lacunes (**Figure 17**). Dans le cas des

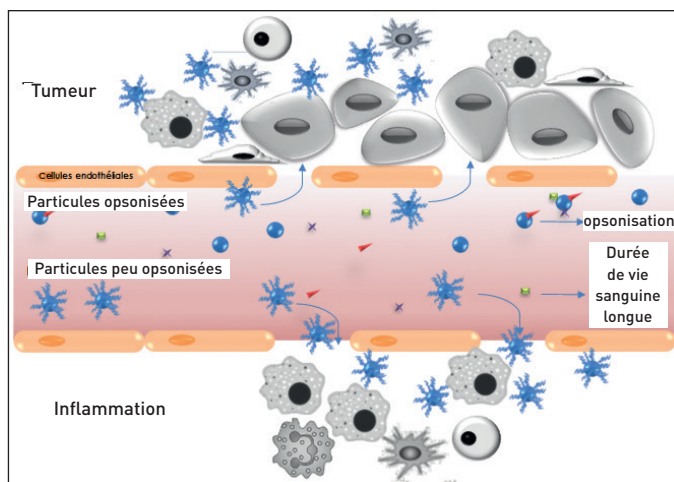


Figure 17

Extravasation des nanoparticules au niveau des endothéliums de grande perméabilité.

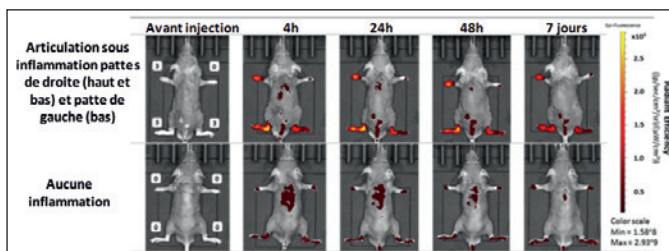
tumeurs, on dénomme cet effet EPR²³ pour « *enhanced permeability and retention* » car en raison d'un drainage lymphatique très faible, les nanoparticules sont retenues au sein du tissu tumoral. Dans le cas de l'inflammation, la rétention des nanoparticules est liée à la forte proportion de cellules phagocytaires présentes à ce niveau qui captent les nanoparticules. La biodistribution des nanoparticules à la suite de leur administration intraveineuse concerne sûrement d'autres

22. Extravasation : passage de produits intraveineux d'un vaisseau sanguin vers les tissus environnants.

23. Effet EPR (« *Enhanced Permeability and Retention* ») : effet de perméabilité et de rétention accrue.

Figure 18

Administration intraveineuse de nanoparticules dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde. Accumulation passive des nanoparticules dans les zones inflammatoires en raison de l'extravasation des nanoparticules à travers les vaisseaux perméables au niveau des tissus atteints. Source : modifié selon *Journal of Controlled Release*, 2019, 296 : 179-18.



tissus et il existe des cas où, par exemple, un tropisme cardiaque, pulmonaire, ou encore cérébral, a été identifié. Il est fort possible, dans ces cas, que l'adsorption de certaines protéines spécifiques à la surface des nanoparticules, même en faible quantité, soit liée à ces modifications en termes de devenir dans l'organisme. Des recherches restent encore à réaliser pour comprendre, d'un point de vue fondamental, les relations entre la couche de protéines adsorbées à leur surface et la biodistribution des nanoparticules.

La **Figure 18** est une illustration de l'extravasation en termes d'inflammation. Ce travail a été réalisé sur des souris atteintes d'arthrite rhumatoïde. On voit que les trois pattes atteintes d'arthrite sont gonflées et que lorsqu'on administre des nanoparticules, ces dernières se concentrent uniquement dans les tissus situés dans la zone inflammatoire.

5.4. Cas des nanoparticules de petite taille

Les exemples précédents se rapportent à des nanoparticules de 100 à 200 nm. Mais certaines peuvent être de très petite taille, entre 1 et 5 nm. C'est le cas des nanoparticules de types boîtes quantiques ou

quantum dots²⁴ qui sont fluorescentes et que l'on peut suivre par imagerie. Après administration intraveineuse, ces particules se retrouvent rapidement dans la vessie et dans l'urine. Elles sont donc éliminées par les reins. À noter qu'il est important dans ce cas d'examiner leur toxicité rénale.

6 Recommandations : pharmacocinétique et toxicité préclinique

Les recommandations du législateur seront bien évidemment au préalable de toute étude toxicologique pour déterminer la pharmacocinétique et la biodistribution des nanoparticules, ce qui nécessite de mettre au point une méthodologie de suivi de ces nanoparticules qui ne modifie pas leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques. Elle peut être réalisée chez l'animal en utilisant le radiomarquage²⁵ ou des techniques d'imagerie, mais elle est plus complexe au cours de la première phase des études cliniques où il est impératif de

24. Quantum dot (ou boîte quantique) : nanostructure de semi-conducteurs.

25. Radiomarquage : le fait de marquer un composé avec un traceur radioactif.

suivre quantitativement les nanoparticules dans le sang des sujets.

En ce qui concerne les études toxicologiques comme pour toutes celles relatives à un médicament, il faudra réaliser des études de toxicité aiguë et chronique. Pour la toxicité aiguë, elles seront réalisées sur deux espèces de mammifères (généralement rat et souris), avec deux voies d'administration (dont l'une sera la voie d'administration utilisée chez l'homme). Elles servent à établir la DL50 (dose létale tuant la moitié des animaux), la dose maximale tolérée (dose qui provoque un effet toxique mais qui n'affecte pas la survie des animaux), la dose maximale sans effet toxique. Pour les études de toxicité chronique, elles visent à obtenir des renseignements sur l'aptitude du produit à s'accumuler dans les tissus et à confirmer quels organes souffrent électivement de cette toxicité, notamment les organes cibles. Cette étape doit être réalisée chez au moins deux espèces de mammifères dont un non-rongeur (généralement rat et chien/singe). La voie d'administration utilisée sera celle choisie pour l'administration à l'homme.

6.1. Étude toxicologique d'un organe cible : le foie

Un modèle d'étude toxicologique exemplaire réalisé sur des nanoparticules est celui du Livatag[®], qui fait l'objet d'une phase III (Onxeo[®]) et dont le développement pharmaceutique et préclinique a démarré au sein de l'Institut Galien Paris-Sud. Il s'agit

de nanoparticules à base de poly(alkylcyanoacrylate) (PACA) contenant une substance active anticancéreuse, la doxorubicine²⁶. L'indication du Livatag[®] est le traitement des hépatocarcinomes²⁷ résistants à la doxorubicine. Étant donné la forte affinité de ces nanoparticules pour le tissu hépatique, il était essentiel de savoir si les fonctions de cet organe n'étaient pas altérées. Par ailleurs, toute administration de nanoparticules entraîne une distribution plus au moins intense au niveau hépatique. Par conséquent, le foie est un organe essentiel dont l'exploration toxicologique est importante à la suite de l'administration des nanoparticules.

La première étude a consisté à voir si les propriétés des cellules de Kupffer n'étaient pas altérées. Elles ont consisté à mesurer la capacité de ces cellules à éliminer des particules d'encre de Chine et par conséquent le calcul d'un index de phagocytose. Suite à l'administration de nanoparticules de PACA « nues », l'index de phagocytose diminue immédiatement après administration puis remonte très vite, ce qui ne correspond pas tout à fait à une toxicité vis-à-vis des cellules macrophagiques, ni à un effet d'accumulation d'un nombre très élevé de nanoparticules. Une étude plus approfondie a conclu sur une déplétion de la protéine fibronectine qui s'adsorbe

26. Doxorubicine : également appelée adriamycine, c'est un médicament anticancéreux utilisé dans la chimiothérapie du cancer.
27. Hépatocarcinome : cancer primitif du foie.

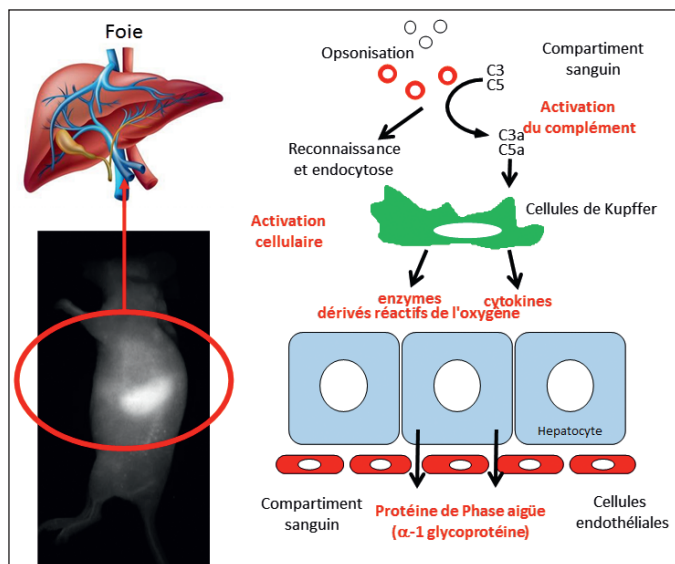


Figure 19

Capture hépatique de nanoparticules au niveau du tissu hépatique chez la souris (imagerie optique grâce à une sonde émettant dans l'infrarouge proche) et conséquences de la capture hépatique observée chez le rat qui produit au final une protéine de phase aiguë caractéristique d'une inflammation au niveau des hépatocytes.

rapidement sur les nanoparticules de PACA réduit, de manière transitoire, la possibilité de reconnaissance des particules d'encre de Chine par les cellules Kupffer.

Afin d'étudier la réponse inflammatoire du foie, la présence d'une protéine marqueur dite de phase aiguë (α -glycoprotéine acide ou orosomucoïde), produite par les hépatocytes au cours de l'inflammation, a été déterminée. Le niveau de production de cette protéine a été mesuré suite à une injection unique de 20 mg/kg de nanoparticules de PACA « nues » et comparé à des nanoparticules constituées par d'autres polymères.

On observe effectivement pour les nanoparticules de PACA et pour celles d'acide polylactique une légère réponse inflammatoire qui diminue puis disparaît. De manière très singulière, on n'observe pas d'effet inflammatoire quand

les nanoparticules sont recouvertes de polyéthylène glycol. L'administration de nanoparticules de PACA entraîne une réponse inflammatoire du foie, cependant l'augmentation de la protéine marqueur (α -1-glycoprotéine) est réversible et dépend des propriétés de surface de ces nanoparticules.

Nous avons aussi étudié la sécrétion de l' α 1-glycoprotéine par les hépatocytes de rat après cinq jours d'administration de 20 mg/kg de nanoparticules. On observe là aussi une augmentation de la protéine marqueur de l'inflammation, liée à l'activation des cellules de Kupffer (Figure 19), mais cette augmentation est réversible et revient à son niveau de base à l'arrêt du traitement.

Le Livatag[®], médicament fabriqué à partir des nanoparticules, a subi des essais de toxicité hépatique chez le chien, et on observe qu'avec la doxorubicine, mais aussi de manière très légère avec les nanoparticules de PACA « nues », une sécrétion de ces enzymes qui sont significatives d'une cytolys²⁸ au niveau hépatique, mais avec un effet qui disparaît après l'arrêt du traitement.

7 Métabolisme et élimination des nanomédicaments

L'étude du métabolisme des nanoparticules est certainement un paramètre extrêmement difficile à documenter chez l'homme notamment par des études de pharmacocinétique et de toxicocinétique.

28. Cytolyse : dissolution ou destruction des cellules.

Certaines nanoparticules sont éliminées intactes par l'urine ou la bile, d'autres le sont partiellement ou complètement. Certaines particules sont dissoutes dans les fluides biologiques mais la cinétique de

dissolution *in vivo* est souvent méconnue. Certaines particules sont dégradées par scission de liaisons chimiques, mais il n'est souvent pas facile d'identifier ni la cinétique, ni le mécanisme de dégradation.

Conclusion

Les nanomédicaments sont des médicaments comme les autres et doivent subir le même cycle d'études précliniques et cliniques non seulement du point de vue pharmacologique mais aussi toxicologique. Le problème de leur toxicité a été pris en compte très tôt par les pharmaciens et par l'industrie pharmaceutique.

Le dossier doit au minimum contenir une caractérisation complète du nanomédicament. Le procédé de fabrication doit être transposable industriellement et permettre de reproduire les caractéristiques de départ des nanoparticules. La pharmacocinétique, la biodistribution, l'élimination et la toxicité vis-à-vis des organes et des cellules cibles doivent être étudiés. La notion de bénéfice/risque et la notion de réversibilité des effets toxiques sont deux points particulièrement importants qui devraient être pris en compte.