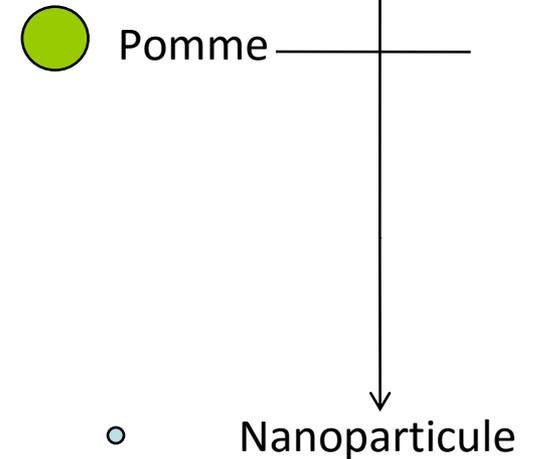


Le point sur les nanoparticules en santé humaine

Dr Olivier Joubert, PhD
Olivier.joubert@univ-lorraine.fr

L'échelle nanométrique

Même différence de taille entre



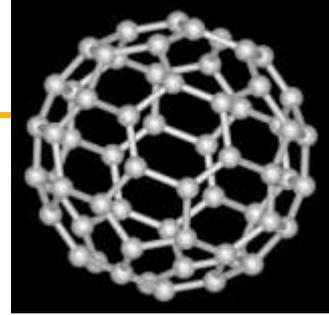
Nanoparticules naturelles

Origine environnementale

érosion éolienne, combustion, volcans

Origine biologique

virus, lipoprotéines, ...



Quelques dates

1959 Richard Feynman « *There is Plenty of Room at the Bottom* »

1981 Heinrich Rohrer et Gerd Binnig, Microscope à effet tunnel
Prix Nobel de Physique en 1986 : cartographie atomes par atomes

1985 Robert Curl, Harold Kroto et Richard Smalley premières molécules de C-60 :

60 atomes de carbone sous forme de « ballon de football »

cristaux hexagonaux « mille feuilles », le graphite,
forme cubique, le diamant.

prix de Nobel de Chimie en 1996 : avancée cruciale en synthèse artificielle
d'objets nanométriques.

Rapport SURFACE / VOLUME très supérieur

- Plus grande fraction des atomes/molécules composant la particule est exposée
- Ainsi, si les constituants sont solubles, dissolution plus rapide
- Changement des propriétés physicochimiques



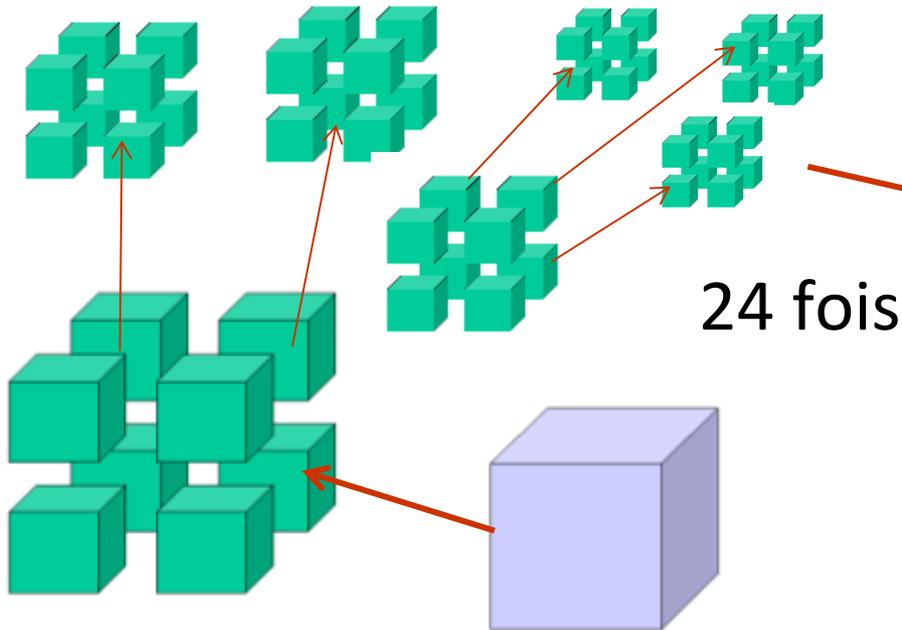
Surface/Volume

Cube de **1,7 cm** d'arête = $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$

24 divisions successives

Cubes de **1 nm** d'arête

Surface = terrain de rugby = 5000 m^2



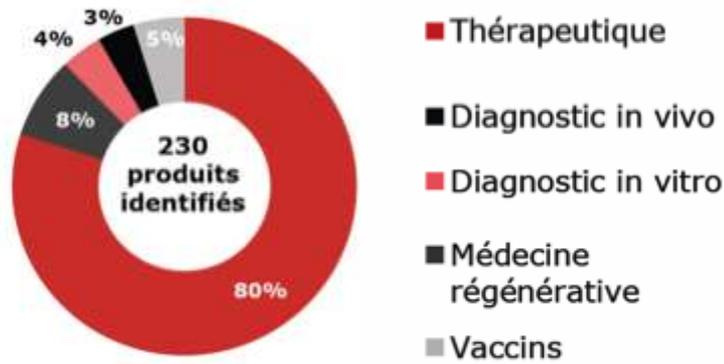
Nanoparticules (NP)

Objets : 50 % < 100 nm, > 60 m²/cm³

Applications : Industrielles, alimentaires, médicales,...

Application en médecine*

- Systèmes de délivrance
- IRM



Exemples de nanovecteurs



* Rapport LEEM, 2014

NP à visée thérapeutique

Protection du principe actif (PA) contre la dégradation

Passage des barrières physiologiques

Amélioration de la délivrance du PA aux cellules cibles

Diminution de la toxicité du PA

Libération prolongée du PA

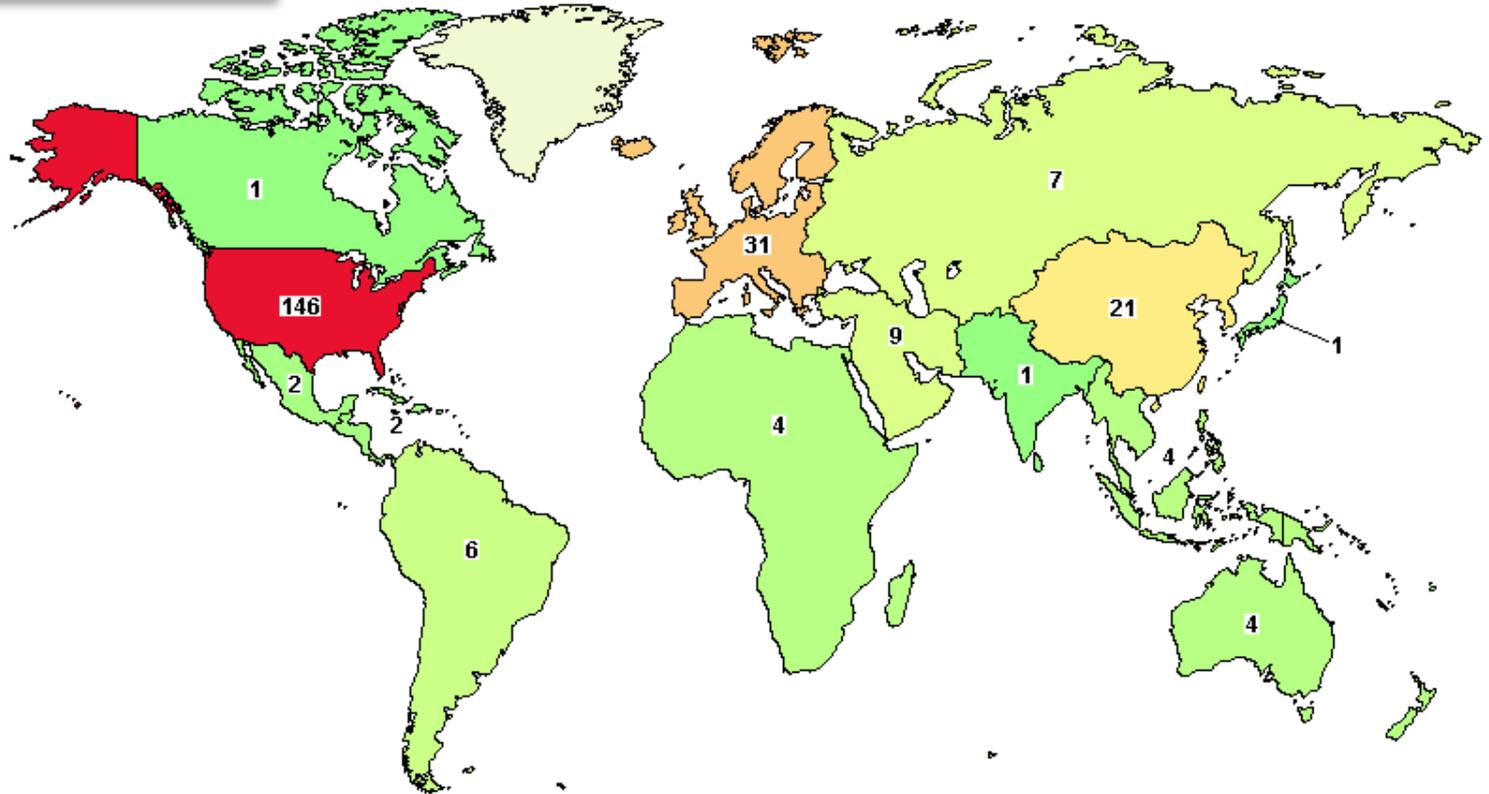


Nanoparticules faisant l'objet d'essais cliniques

31/05/2016 requête « nanoparticules »



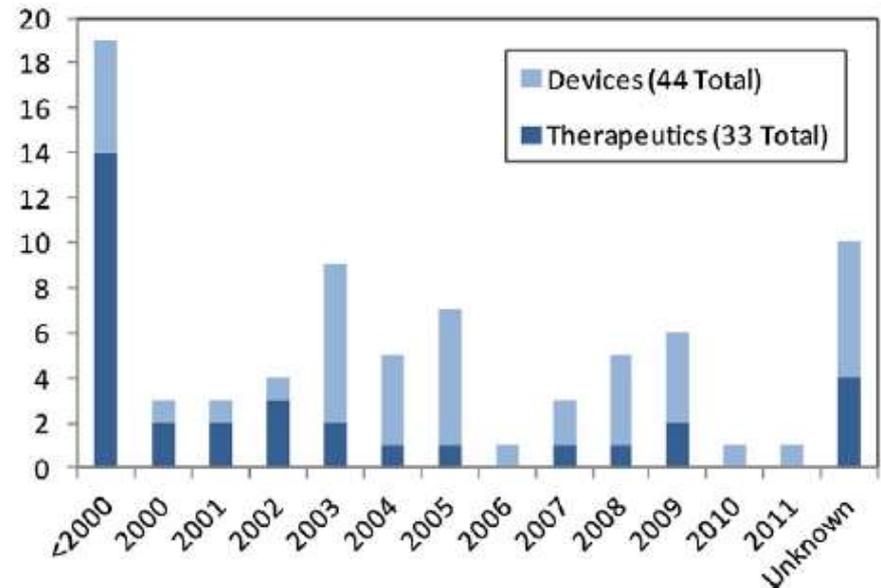
235 essais
169 Cancer



Chiffres:

247 « nanomédicaments » sur le marché et/ou divers niveaux d'essais cliniques.¹

En France,
36 nanoproduits médicaux ont l'AMM
21 formulations pour véhiculer un
médicament
et 9 biomatériaux.²



(1) Michael L et al, 2013.

(2) Étude Leem. « Les nanotechnologies appliquées à la médecine

Figure 2. Year of approval for confirmed and likely nanomedicine products identified (search conducted through May 2011).

Exemples:

Liposome et particules lipidiques:

Ambisome (antifongique)

Doxil (doxorubicine)

DepoDur (morphinique)

Polymer-Protein Conjugates:

PEG-Asys (Hepatite)

Superparamagnetic Iron Oxide products:

Feridex (imagerie par RMN foie)

Nanoproduits approved by CHMP in EU:

Abraxane (paclitaxel+albumine)

Mepact

Myocet

Rapamune



NP et Toxicologie

Échelle nano :

Rapport surface / volume très supérieur

Nouvelles propriétés physico-chimiques → effets ?

Facteurs de toxicité

- Petite taille
- Charge positive
- Instabilité chimique

Limites des études de nanotoxicité

- Hétérogénéité méthodologique, comparaisons difficiles
- Exposition aiguë, doses élevées
- Méthodes classiques inadaptées à leur évaluation^{1,2}

¹ AFSSET, 2008

² Claude, AFFSAPS, 2009

Quels dangers ?

Franchissement de barrière : ex. hémato-encéphalique

Surcharge de phagocytes

Maladie thromboembolique

Stress oxydant

Risque écologique...



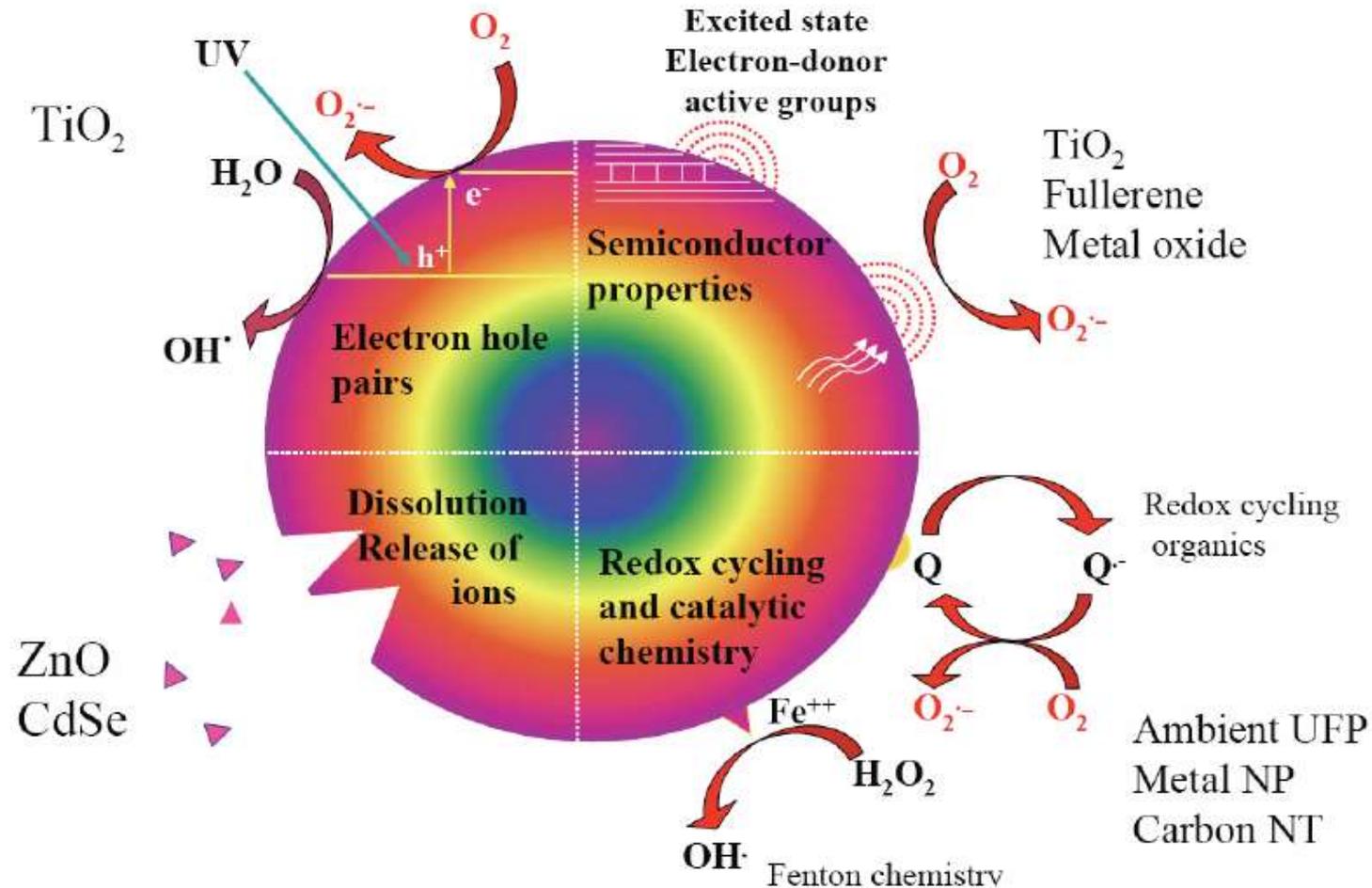
Patient



Population

Le stress oxydant : un rôle central dans la toxicité des NP -

- **Propriétés de surface des NP** responsables d'une génération d'espèces réactives de l'oxygène
- **Réponse cellulaire aux NP** : génération d'espèces réactives de l'oxygène



NP et Toxicologie

Modèles

- *In vitro* : Lignées cellulaires, relations NP / cellules
- *In vivo* : Animal / Homme ; essais cliniques, études épidémiologiques

Techniques

- Cytotoxicité / viabilité, prolifération
- Imagerie : confocale, microscopie électronique
- Cytométrie en flux
- **Toxicogénomique** : qRT-PCR, puces à ADN

Etudes mécanistiques



« Formulations nanoparticulaires de donneurs d'oxyde nitrique afin d'améliorer sa biodisponibilité »



Nanoformulation retenue : NP polymériques d'Eudragit[®]

Donneur de •NO utilisé : S-Nitrosoglutathion (GSNO)

Evaluation de la toxicité, **Approche classique**

Compréhension des mécanismes, **Approche transcriptomique.**

- Améliorer la compréhension de la réponse biologique
- Identifier une signature moléculaire, biomarqueurs

Objets / objectifs du travail de recherche

Objets :

1. NP chargées ou non en Principe Actif (PA)
2. Monocytes / macrophages (murin ou humain)

Objectifs :

Évaluation toxicologique de NP

1. Internalisation ? Immunotoxicité éventuelle ?
2. Effet thérapeutique du PA (GSNO) ?
3. Différentiation entre effet nanoparticulaire et effet du PA
4. Identification de danger

Mieux comprendre les interactions vivant / NP

Eudragit[®] CAS number 51822-44-7

Pas de dégradation *in vivo*

Pas de toxicité connue

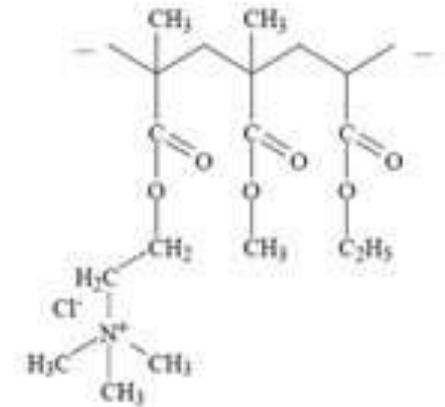
Excipient (voie orale)

Eudragit[®] RL PO : copolymère (1/2/0,2)

- Acrylate d'éthyle
- Méthacrylate de méthyle
- Méthacrylate d'éthyle triméthylammonium

Diamètre : 54 nm

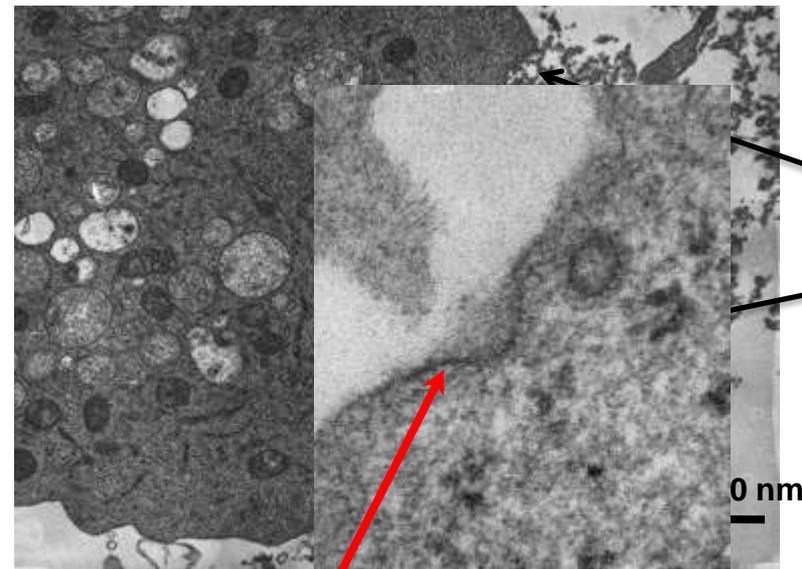
Potentiel ζ : +63 mV



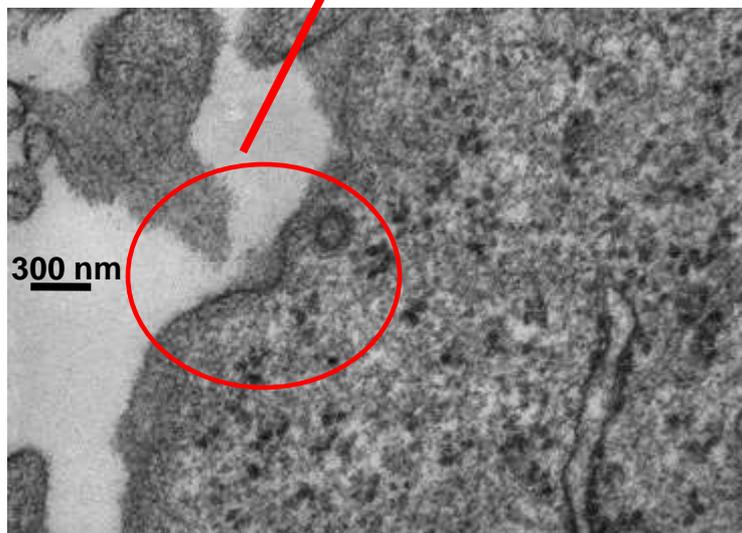
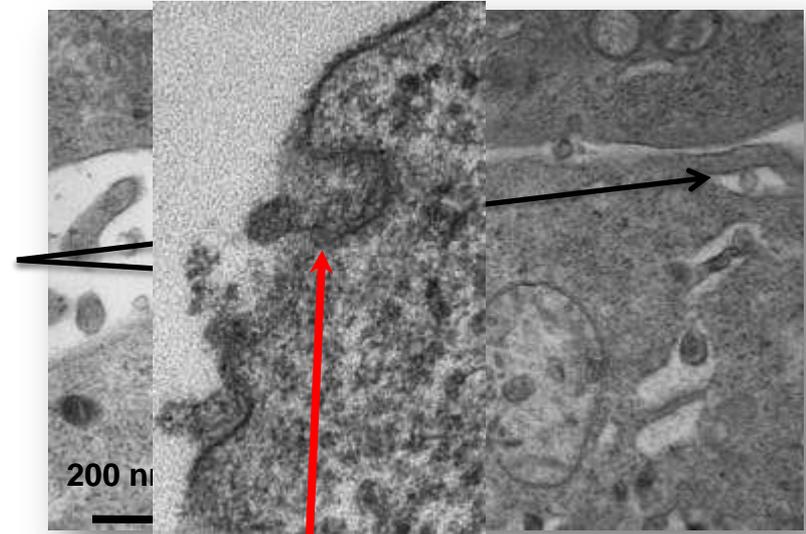
Eudragit[®] RL PO
Evonik

Internalisation

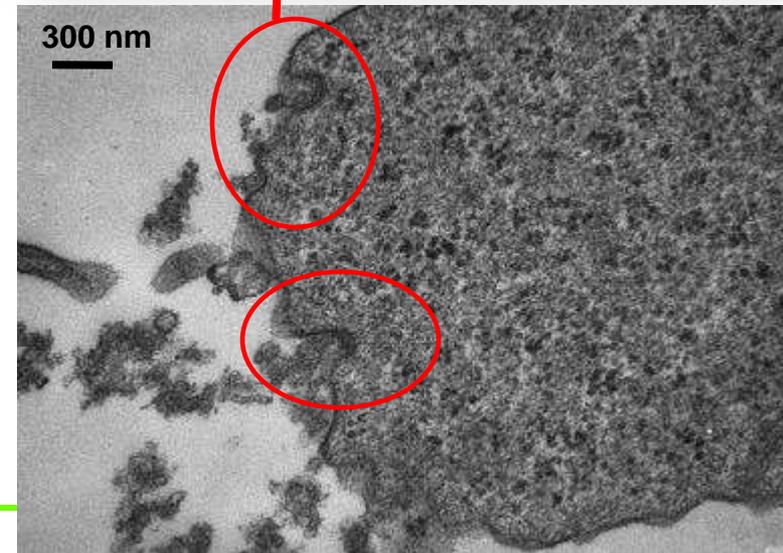
NR8383 incubées avec 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP/RS-, 6h



Endocytose

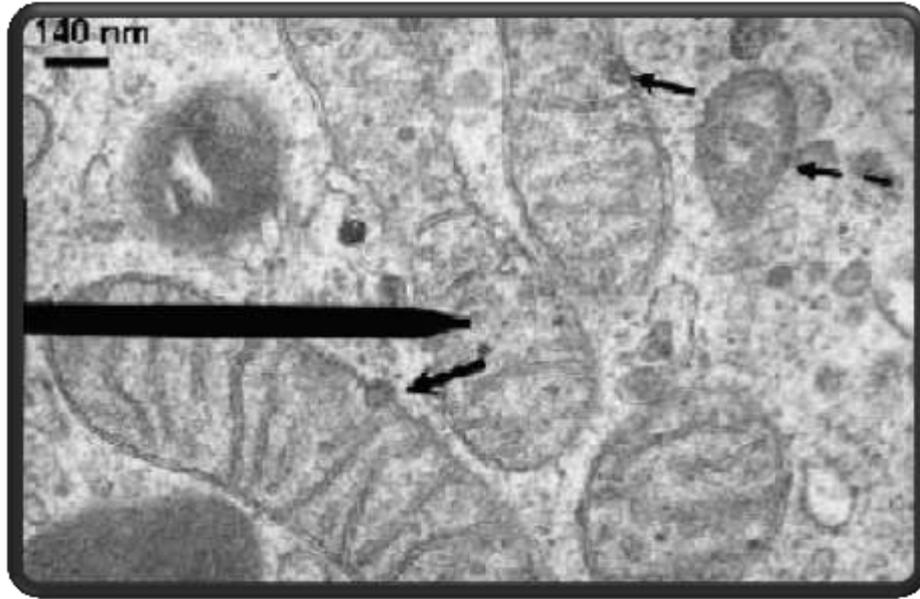


Endocytose
clathrine-
dépendante



Internalisation (murin)

Souffrance mitochondriale



NR8383 +20µg/ mL NP/RS-, 1h

- NPs pénètrent les 2 Mb de mitoch.



NR8383 +100µg/ mL NP/RS-, 24h

- Cellules très altérées
- Accumulation de mitochondries très endommagées

Modèle humain vs murin

NR8383 (rat)

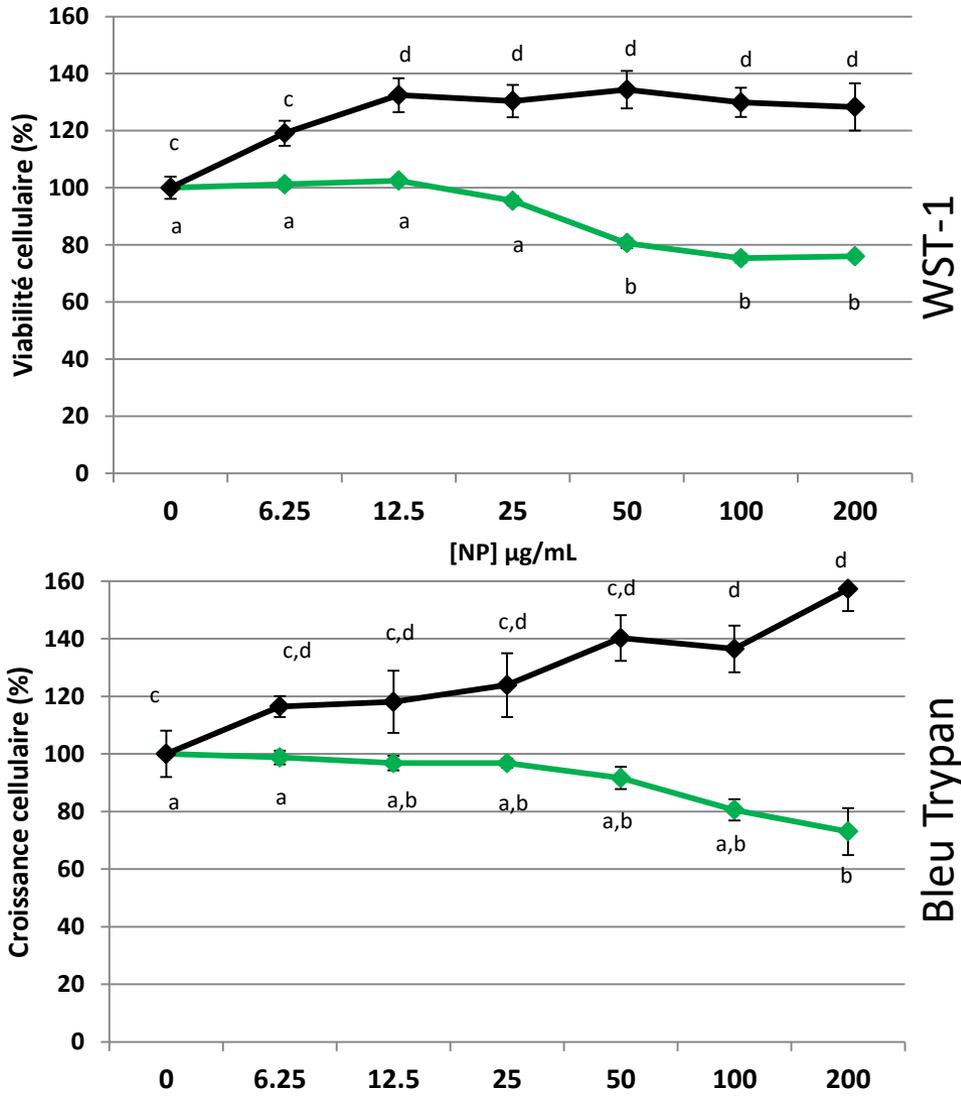
↓ la viabilité

↓ la croissance cellulaire

THP-1 (humain)

↑ la viabilité

↑ la croissance cellulaire



[NP] : de 6,25 à 200 µg/mL
t : 24h; n = 4

Ronzani et al., 2014

Groupes non associés avec la même lettre sont significativement différents p: 0,05 tukey kramer

Étude transcriptomique

Gènes étudiés (qRT-PCR) :

NCF1 (stress oxydant)

NFKB, *TNFA*, *IL1B* (inflammation)

ATG16L (autophagie)

PDCD4, *BCL2*, *CASPAS8*

(balance apoptotique)

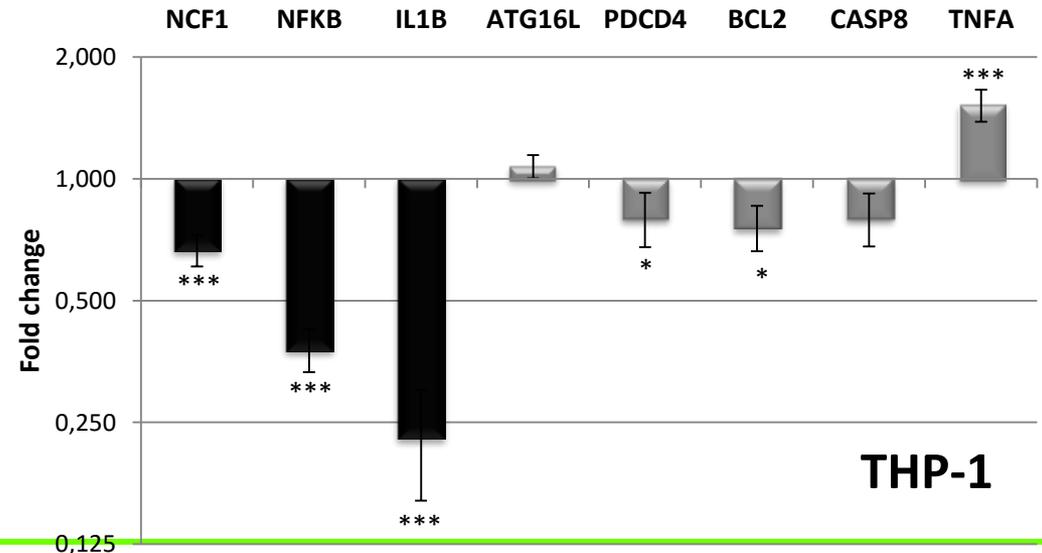
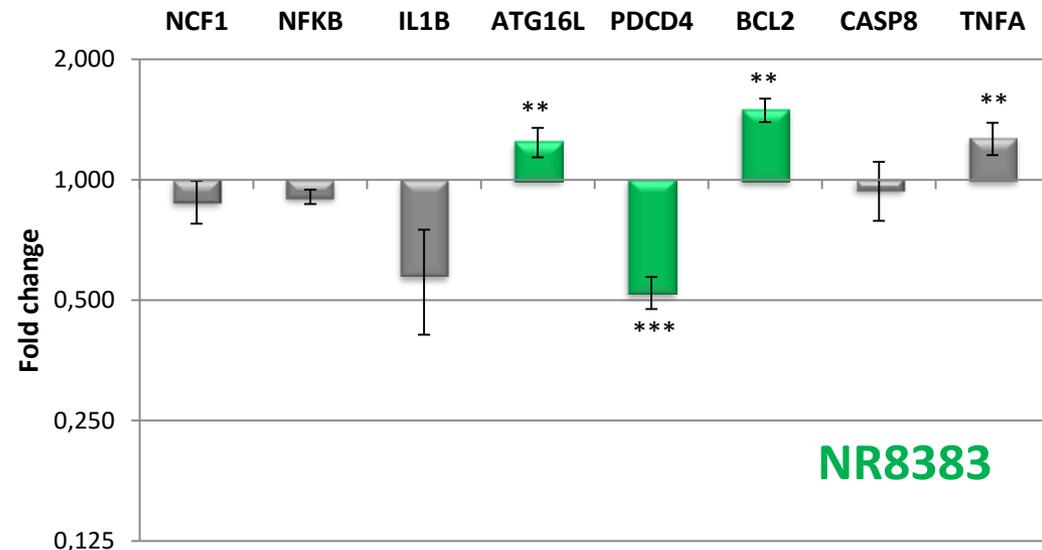
NR8383 (rat)

↑ *ATG16L*, *BCL2*, ↓ *PDCD4*
Autophagie

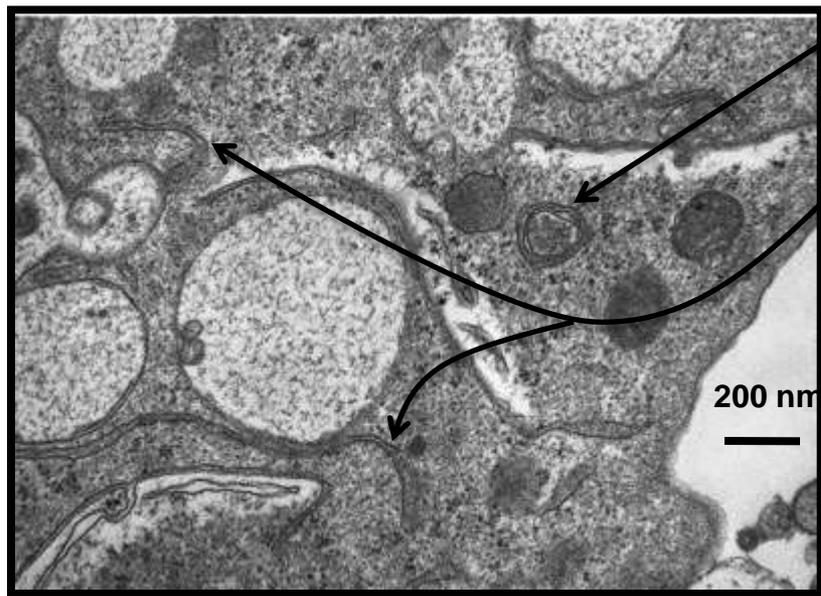
THP-1 (humain)

↓ *NCF1*, *NFKB*, *IL1B*

Absence d'inflammation,
de stress oxydant



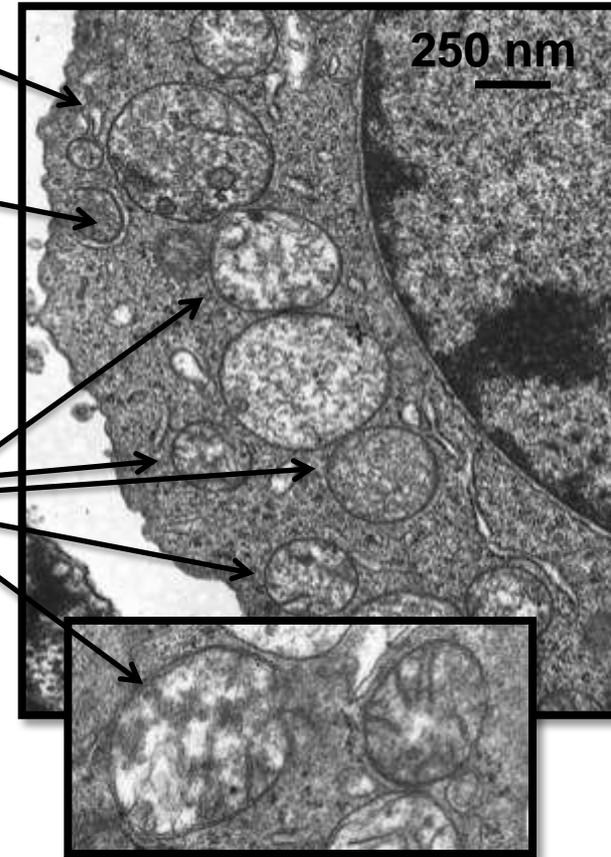
L'autophagie (modèle murin)



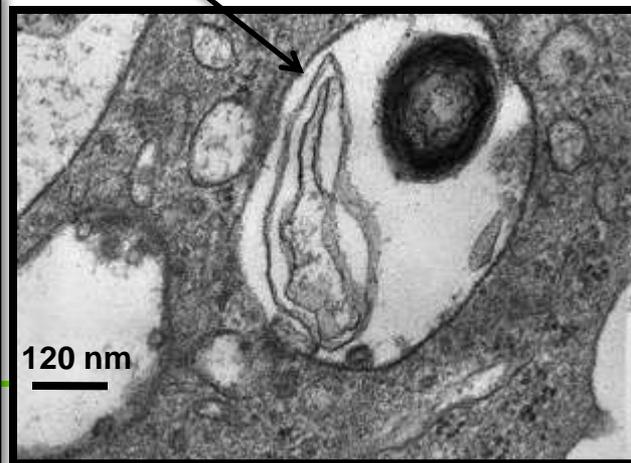
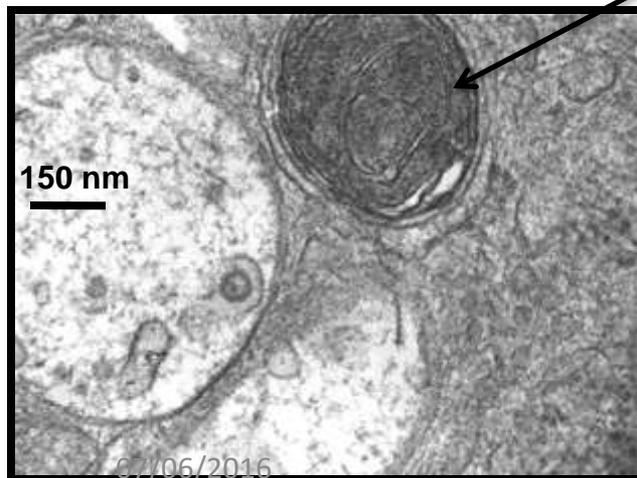
Autophagosome
(identique au cytosol, double mb)

Mb de séquestration
phagophore

Mitochondrie dilatée
(différents stades
devine des crêtes)



Autophagolysosome



NR8383 incubés avec
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP/RS-, 6h

Conclusion

NP d'Eudragit® RS / NR8383 : toxique⁽¹⁾

NP d'Eudragit® RS / THP-1 & HMEC : prolifération⁽²⁾

NR8383 (modèle murin)

Répression des gènes de l'apoptose

Activation de ceux de l'autophagie (mitophagie)

NP considérées comme un virus

Switch de l'apoptose vers l'autophagie ⁽³⁾

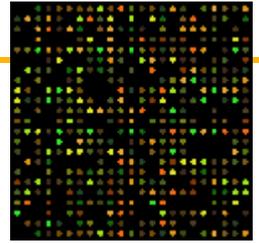
THP-1 (modèle humain)

Absence d'apoptose ou d'autophagie

Sous-expression de gènes de l'inflammation et de l'activité anti-oxydante

Favorisation de la prolifération ?

Les interactions cellule/NP : phénomènes complexes, dépendant du modèle cellulaire utilisé



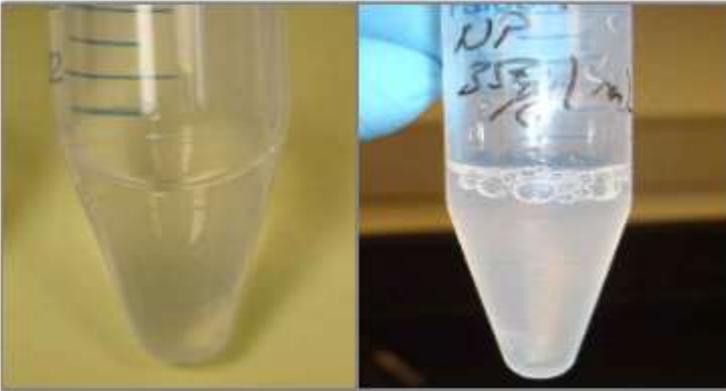
Nanoparticules chargées

- Analyse par transcriptomique de cellules exposées à:
 - GSNO 50 μ M et NP chargées en équivalent GSNO
 - activation de gènes de trois clusters
 - “Zinc and metal ion binding”,
 - “Mitochondrion”,
 - “Immune response and cell activation”

➡ Validation de la stratégie d’encapsulation

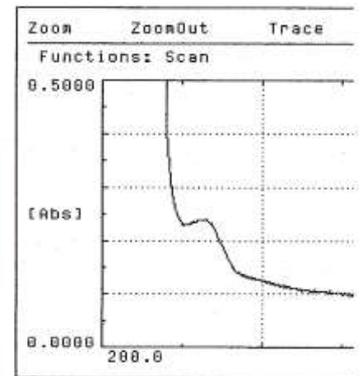
Projet II

Opalescence du sérum après ajout de NP d'ERS

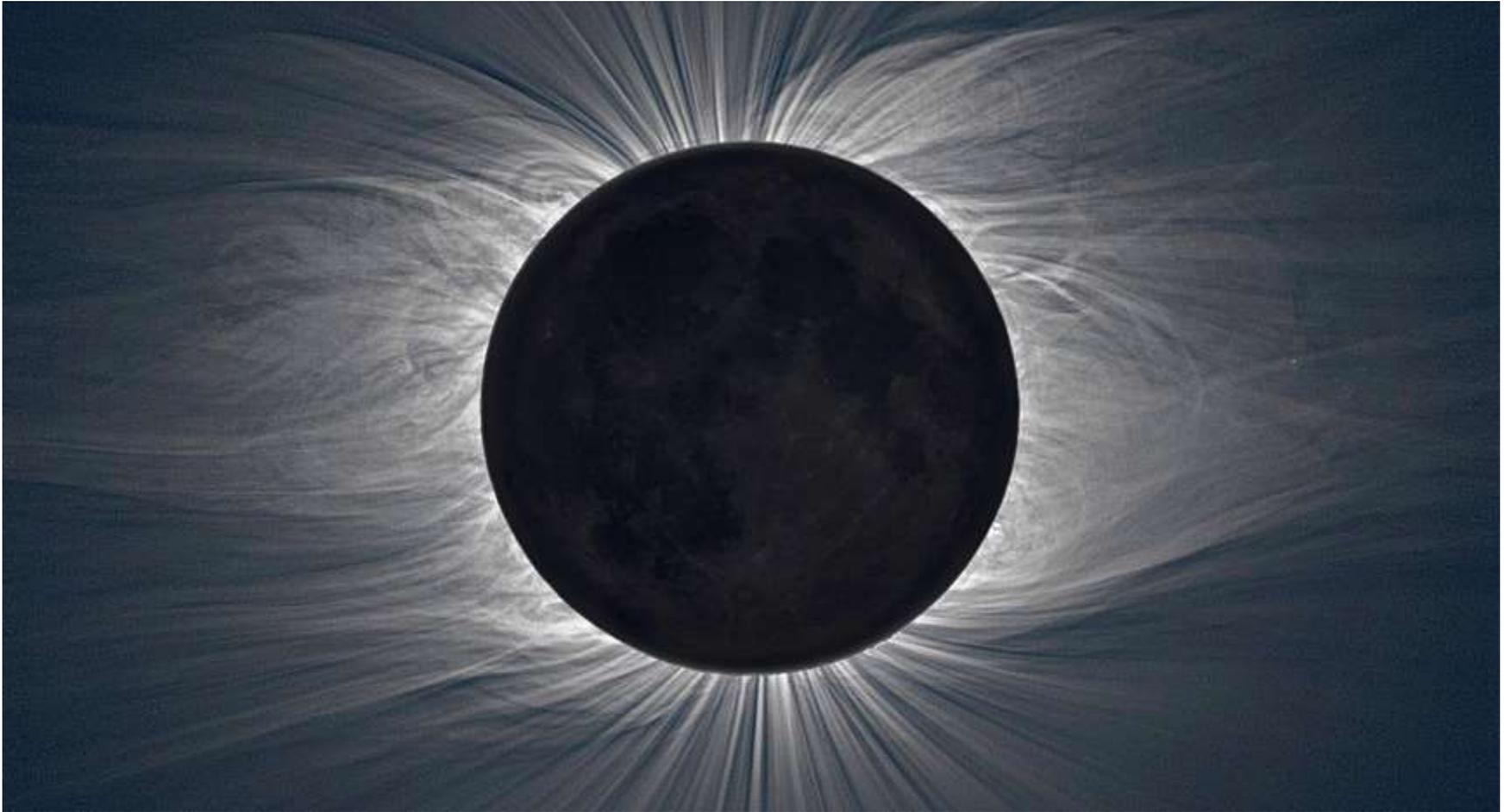


Agrégats :
NP ERS + protéines
Du sérum de veau foetal

Dissout par
Thiocyanate de guanidine



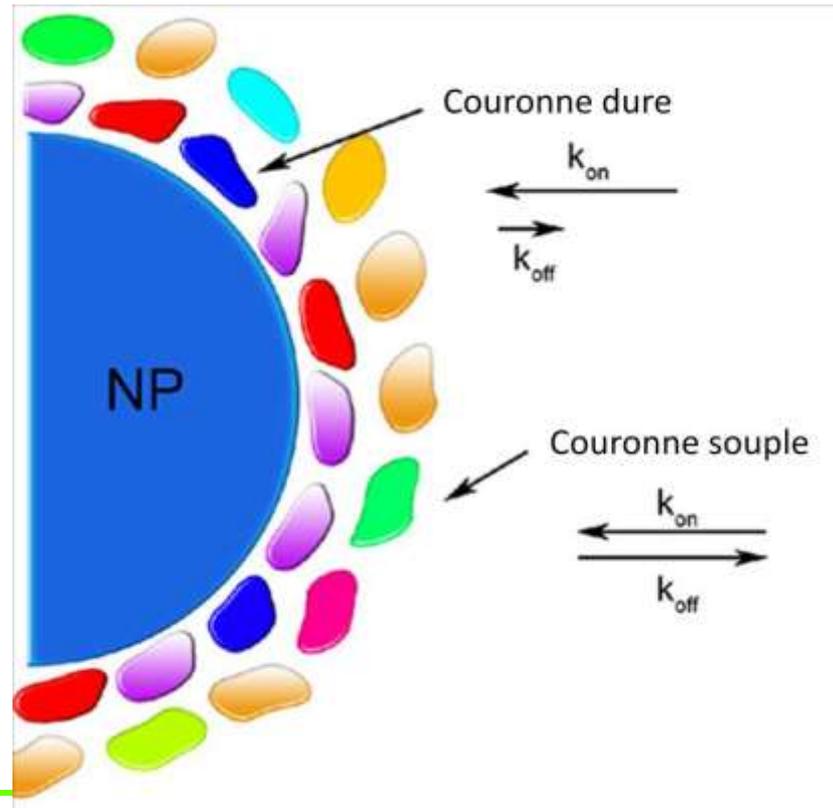
Corona protein



Corona protein

Effet « Vroman »

1. Fixation de protéines abondantes
2. Fixation de protéines de forte affinité



Tenzer et al., 2014

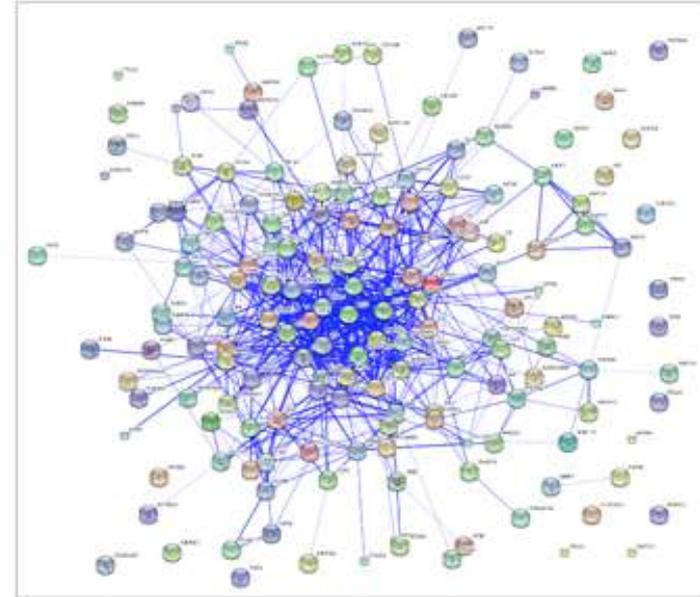
Coronome

Corona du protéome ou coronome

176 protéines non redondantes “collées” aux ERS

String database

Protein interpro



Central core: serpins, protéases, et facteurs de coagulation

Autour: **adhésion cellulaire**, **croissance** (EGF domains), **différentiation**

Meilleure disponibilité des protéines pour HMEC et THP-1

Coronomes

Comparaison *corona* de 3 études :

- NP Au (144)¹
- NP ERS (178)²
- NP SiO₂ (165)³
- NP polystyrène + et – (165)³

TABLE 1. Corona Distribution, Number, and Percentage of InterPro Domains

number of coronae ^a	number of InterPro	percentage (%)
1/5	389	76.1
2/5	55	10.9
3/5	15	2.9
4/5	14	2.7
5/5	38	7.4
total	511	100

^a Coronomes of silica, polymer, gold, or positive and negative polystyrene NP.

Rihn & Joubert, ACS Nano, 2015

Coronomes

TABLE 2. Example of 10 on 38 IP Domains (IP Number and IP Name) with Their Function As Accepted and Annotated by Gene Ontology^a

IP number	IP name	protein function (gene ontology)
IPR000010	proteinase inhibitor I25	cystatin
IPR000020	anaphylatoxin/fibulin	anaphylatoxin/fibulin
IPR000074	ApoA1_A4_E	apolipoprotein A/E
IPR000152	EGF-type_Asp/Asn_hydroxyl_site	EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation site
IPR000436	sushi_SCR_CCP	sushi/SCR/CCP domain
IPR002035	VWF_A	von Willebrand factor type A
IPR002395	kininogen	HMW kininogen
IPR009048	A-macroglobulin_rcpt-bd	Alpha-macroglobulin receptor-binding
IPR014760	serum_albumin_N	serum albumin N-terminal
IPR018486	hemopexin/matrixin_C	hemopexin conserved site

^a Coronomes shared by all NP: silica, polymer, gold, or positive and negative polystyrene.

Enzymes
Réponse immunitaire
Protéines plasmatiques

Conclusion II

Connaissance du coronome :

- Aide à déterminer des invariants dans les interactions NP / fluides biologiques
- Caractérisation toxicologique au même titre que taille ou potentiel ζ
- Devenir des NP
- Aide au diagnostic de protéines faiblement abondantes ou difficilement identifiables
- Développement de « lab on chip »
- Fonctionnalisation de NP ?

Questions ?



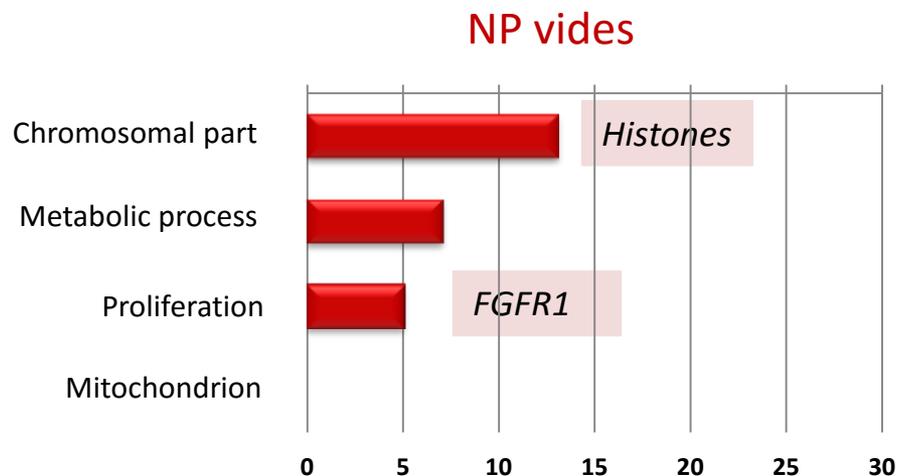
Liste de 14 NMs représentatifs (OCDE)

- Fullerènes (C60)
 - Nanotubes de carbone monofeuillets
 - Nanotubes de carbone multifeuillets
 - Nanoparticules d'argent
 - Nanoparticules de fer
 - Noir de carbone
 - Dioxyde de titane
 - Oxyde d'aluminium
 - Oxyde de cérium
 - Oxyde de zinc
 - Dioxyde de silicium
 - Polystyrène
 - Dendrimères
 - Nanoargiles
-

Autres travaux

- Démarche identique
 - Outils biologie cellulaire et moléculaire développés
- Evaluation
 - NP d'Or (citrate vs DHLA), Dr Boudier, thèse J Tournebize¹
 - Surfaces fonctionnalisées, Dr Boudier, thèse A Pallotta
 - Liposomes, Dr Diab²
 - NP argent synthèse « verte », Pr Oluwafemi³, Johannesburg, Af Sud / Inde
- Curcumine
 - Microparticules, Dr Diab⁴, UMR CNRS SRSMC
 - NP PLGA, Pr Ramassamy⁵, INRS-Institut Armand Frappier, Montréal

Transcriptomique



**Nombre de gènes
sur-exprimés par *cluster***

Confirme :

1. Augmentation activité métabolique
2. Augmentation croissance cellulaire

Internalisation

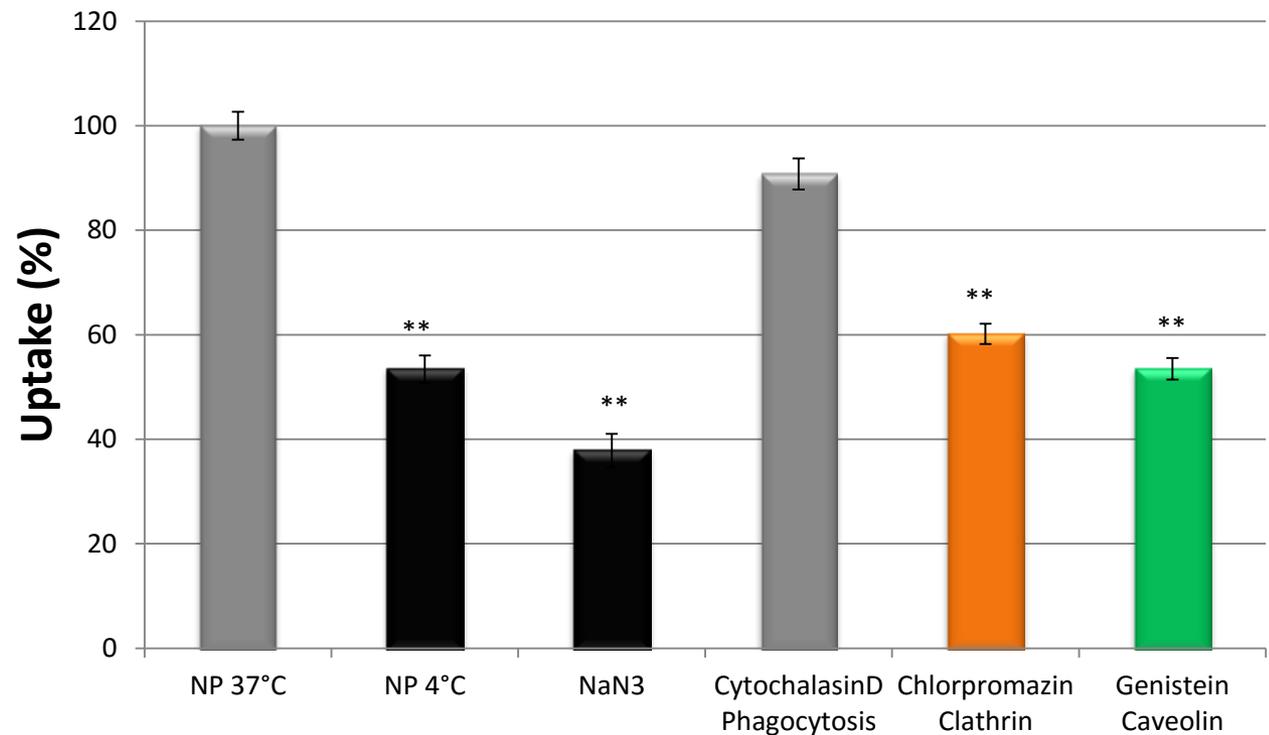
Mécanismes : (cytométrie en flux)

Énergie-dépendants
(4° C, NaN₃)

Voies :

Clathrine

Cavéoline



L'autophagie

Confirmation par **Microarray** et **immunofluorescence**

GO ID	Symbol		100 µg/mL
and GO Terms		Symbol	Fold change
GO:0000045			
Autophagic vacuole formation	<i>atg16l1</i>	up	2.3

LC3-II: Sur expression → **Autophagie**

