

Utilisation de modèles *in vitro* d'exposition chronique : application aux nanoparticules

Période : janvier 2012 à mars 2012

Béatrice L'AZOU et Isabelle PASSAGNE

Université Bordeaux Segalen – Pharmacochimie, Biologie Cellulaire – FRE CNRS 3396 – Bordeaux

Mots clés : Cadmium, Culture cellulaire, Cytotoxicité, *In vitro*, Long terme, Nanoparticules, Quantum-dots, Silice, Solubilité

À l'échelle atomique, la matière acquiert des propriétés innovantes liées aux lois de la physique quantique⁽¹⁾, les rendant très attrayantes dans de nombreux domaines. De nouvelles applications industrielles et médicales se développent donc rapidement pour voir apparaître aujourd'hui des nanomatériaux dans notre quotidien. En nano-médecine⁽²⁾, les nanoparticules⁽³⁾ (NPs) sont testées dans le diagnostic par imagerie ou comme dispositifs dans le traitement des tumeurs. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (dont la taille), certaines NPs peuvent traverser facilement les barrières épithéliales⁽⁴⁾ et se distribuer dans tout l'organisme *via* la circulation sanguine. Après avoir atteint leurs cibles, il est probable que ces NPs ne soient pas toutes dégradées ou éliminées de l'organisme et des phénomènes d'accumulation pourraient être observés. Leur persistance dans l'organisme, associée à leur dégradation ou la solubilité de certaines NPs métalliques, pourrait aboutir à la libération d'ions toxiques. Le développement de modèles *in vitro*, permettant d'évaluer la toxicité sur le long terme, semble essentiel pour ne pas se limiter aux données de toxicité aiguë et tester la toxicité « chronique » sans recourir d'une façon systématique à l'expérimentation animale longue et coûteuse (1-2).

Effets de l'exposition à long terme de Quantum-Dots constitués de tellurure de cadmium enrobés ou non de gélatine sur cellules différenciées PC12

Prasad BR, Mullins G, Nikolskaya N, Connolly D, Smith TJ, Gérard VA, Byrne SJ, Davies GL, Gun'Ko Y, Rochev Y. Effects of long-term exposure of gelatinated and non-gelatinated cadmium telluride quantum dots on differentiated PC12 Cells. *J. Nanobiotechnology* 2012; 10:4

Résumé

Parmi tous les nanomatériaux disponibles, les Quantum-Dots (QDs) représentent un outil, majeur dans le diagnostic, et prometteur pour le traitement des tumeurs par thérapie ciblée. Les QDs sont des cristaux de semi-conducteurs aux propriétés optiques incroyables uniques dont la longueur d'onde d'émission est directement liée à leur taille. Cependant, ces QDs sont à base de cadmium (Cd), métal toxique. Dans le cadre d'une future application médicale, pour prévenir la toxicité du Cd et garantir une meilleure stabilité des QDs, des procédés adéquats d'encapsulation du métal ou des traitements de surface sont réalisés (recouvrement du cœur de Tellurure de Cd (CdTe) par une enveloppe de CdSe⁽⁵⁾ et d'une coquille ZnS⁽⁶⁾ ou de silice). Mais, certains travaux de la littérature font référence à une dégradation de cet enrobage avec pour conséquence une libération d'ions Cd²⁺ toxiques à l'origine d'effets cytotoxiques (3-4). Dans cette étude, les auteurs comparent le comportement et l'effet des QDs en termes de cytotoxicité et d'apoptose sur des périodes d'exposition allant de 7, 12 et 17 jours, périodes pouvant être assimilées *in vitro* à des expositions chroniques. Les NPs

utilisées sont des QDs de CdTe de tailles différentes (2,5 et 4,5 nm) fonctionnalisées au TGA⁽⁷⁾ (acide thioglycolique), enrobées (QDs gel) ou non (QDs non-gel) de gélatine. Les études sont réalisées sur des cellules PC12⁽⁸⁾ différenciées ou présentant, par addition d'un facteur de croissance, le NGF⁽⁹⁾, les caractéristiques des cellules neuronales (production de neurites⁽¹⁰⁾, synthèse de neurotransmetteurs...). Dans ces études, les cellules PC12 sont ensemencées dans des plaques de culture 96-puits, une plaque par temps d'exposition choisi. Les cellules sont exposées aux différents QDs à une concentration finale de 10⁻⁹ M. Si la localisation intracellulaire est identique, les auteurs mettent en évidence une action cytoprotectrice de l'enrobage des QDs, après observation des cellules en microscopie confocale⁽¹¹⁾. En effet, les cellules, exposées aux QDs non-gel subissent des changements morphologiques contrairement aux cellules traitées par des QDs gel. Les auteurs confirment, sans ambiguïté, par le test MTT⁽¹²⁾, cette différence de toxicité liée à l'enrobage des QDs (les QDs gels étant moins cytotoxiques que les QDs non-gel). Les études étant réalisées sur plusieurs jours, les auteurs montrent que la toxicité est dépendante du temps, plus marquée à 16 jours. Les auteurs mettent aussi en avant une corrélation entre la taille des NPs et la cytotoxicité, les plus petites NPs étant les plus toxiques. Les mécanismes responsables de la toxicité cellulaire sont étudiés par un test plus global, l'apopto-glo⁽¹³⁾. L'augmentation très significative à 17 jours du signal caspase⁽¹⁴⁾ 3/7 indique que le mécanisme de toxicité est spécifique de l'apoptose⁽¹⁵⁾. Cette étude confirme donc la nécessité d'utiliser des QDs, recouverts ou enrobés afin d'éviter tous effets cytotoxiques induits après un ou plusieurs jours de contact.

Commentaire

L'étude de Prasad *et al.* présente l'originalité de comparer différents QDs sur de longues périodes d'exposition (17 jours) alors que la majorité des études de la littérature les décrivent sur 24, 48 ou parfois 72 h. L'enrobage apparaît protecteur vis-à-vis des effets cytotoxiques induits par les QDs, empêchant la libération d'ions Cd²⁺ toxiques et la survenue d'apoptose. Ainsi, cette étude montre que des QDs (les plus grands de 4,5 nm de diamètre, enrobés de gélatine) peuvent séjourner plusieurs jours dans les cellules cibles sans entraîner de modifications structurales et fonctionnelles et peuvent donc être considérés comme biocompatibles et utilisables comme outils de diagnostic.

Étude sur le devenir à long terme de nanoparticules de silice sur fibroblastes de peau humaines

Quignard S, Mosser G, Boissière M, Coradin T. Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblastes. *Biomaterials* 2012; 33: 4431-4442

Résumé

La connaissance des paramètres physicochimiques des nanoparticules (NPs) permet de mieux comprendre leur comportement dans les milieux biologiques et leur mécanisme d'internalisation dans les cellules. L'utilisation de modèles *in vitro* permet de réaliser ces études dans des conditions contrôlées et d'établir des hypothèses sur les mécanismes impliqués. L'internalisation des NPs de silice (SiO₂) et leur localisation intracellulaire sont, par exemple, très largement dépendantes de leur taille, de leur charge ou de leurs propriétés de surface (les plus petites étant par exemple celles qui pénètrent le plus rapidement) (5-6). La solubilité est aussi un facteur important. La dissolution peut être lente, ce qui nécessite de disposer de modèles d'étude sur le long terme.

Pour cette raison, les auteurs proposent d'étudier l'effet de NPs de SiO₂ fluorescentes sur une période de 14 jours selon une cinétique de 2, 24, 48, 72 h se prolongeant jusqu'à 11 et 14 jours. Les auteurs étudient 3 tailles de NPs (10, 40 et 200 nm) et à taille équivalente (10 nm), 2 charges opposées de NPs de SiO₂ colloïdale⁽¹⁶⁾. Des cellules de fibroblastes⁽¹⁷⁾ humains sont ensemencées dans des boîtes 24-puits puis mises en contact avec différentes concentrations de NPs de SiO₂. Un seul remplacement du milieu d'exposition est réalisé après 7 jours. Au cours des 2 semaines d'exposition, la quantité intracellulaire des NPs est déterminée, par fluorescence, en fonction de leur taille et de leur charge. La toxicité cellulaire est suivie grâce aux tests utilisant le bleu d'alar⁽¹⁸⁾ et le bleu de trypan⁽¹⁹⁾. La génotoxicité²⁰ est évaluée par le test des comètes⁽²¹⁾. Si toutes les NPs sont internalisées rapidement, les auteurs montrent clairement que les particules les plus petites (10 nm) induisent la plus forte cytotoxicité. Après internalisation des plus grandes NPs de SiO₂ n'entraînant aucune toxicité cellulaire, les auteurs suivent leur comportement pendant 14 jours et constatent une diminution de leur taille (réduction de 175 nm initialement calculées à 80 nm) démontrant sans ambiguïté leur dissolution. Ainsi, en tenant

compte de la dissolution des NPs, les auteurs fixent à 40 nm, la taille des NPs de SiO₂ pour laquelle aucun effet toxique n'est observé. Pour des tailles inférieures (10 nm), la toxicité est liée à la charge des particules. La toxicité la plus importante est induite par les particules chargées négativement, les seules présentant une activité génotoxique. Cette génotoxicité pourrait avoir pour origine un mécanisme d'action direct suite à une interaction avec l'ADN ou indirectement lié à un stress oxydant (7). Les phénomènes de dissolution intracellulaire doivent donc être pris en compte pour mieux cerner l'impact des NPs dans les cellules.

Commentaire

Cette étude fournit des renseignements très importants sur le devenir des NPs de SiO₂ dans les cellules de fibroblastes, notamment en termes de solubilité. Il serait alors possible d'administrer des substances médicamenteuses véhiculées par les NPs et destinées à être libérées ensuite par dissolution contrôlée de celle-ci. Mais, une dissolution constatée sur du long terme s'accompagne aussi d'une libération de formes solubles de SiO₂ pouvant être plus réactives et plus toxiques pour les cellules. Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires pour assurer un meilleur contrôle du devenir des NPs dans l'organisme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les performances techniques des nanostructures ou nanoparticules comme les QDs et les SiO₂ sont donc incontestablement prometteuses mais leur toxicité est imparfaitement connue et peut en limiter leur utilisation. L'instabilité chimique, entraînant une libération dans les cellules d'ions toxiques, est un important facteur responsable de la toxicité des nanomatériaux. Ainsi, il est indispensable de prendre en compte le temps nécessaire à leur dissolution. En conclusion, ces deux articles montrent l'importance de disposer de modèles *in vitro* pour des études, dans des conditions contrôlées, d'exposition (faibles concentrations, temps long) sur le long terme.

Lexique

- (1) Quantique : la physique quantique (physique des quanta) décrit le comportement de particules dans l'infiniment petit
- (2) Nano-médecine : application médicale de la nanotechnologie comme par exemple, l'utilisation de médicaments sous forme de nanoparticules.
- (3) Nanoparticules (NPs) : objets à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre (10-9 m)
- (4) Épithéliales : Type de cellules étroitement juxtaposées qui forment les épithéliums, les tissus.
- (5) CdSe : séléniure de cadmium.
- (6) ZnS : sulfure de zinc.

- (7) TGA: acide thio glycolique.
- (8) PC12: lignée cellulaire, provenant d'un phéochromocytome de rat utilisée comme modèle cellulaire pour étudier la différenciation des neurones. Un phéochromocytome est une tumeur de la glande médullo-surrénale.
- (9) NGF: facteur neurotrophique (Nerve Growth Factor): les cellules PC12, cultivées en présence du NGF cessent de se diviser, forment des neurites et deviennent stimulables par voie électrique.
- (10) Neurites: prolongements du corps cellulaire d'un neurone. Il peut s'agir d'un axone ou d'une dendrite.
- (11) Confocal: microscope confocal optique à balayage en lumière réfléchi ou à fluorescence qui permet de réaliser des images à faible profondeur de champ c'est-à-dire fabriqué des coupes optiques.
- (12) MTT: test classiquement utilisé pour évaluer la cytotoxicité et la prolifération cellulaire. Ce test est basé sur le clivage des sels de tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. L'intensité de la coloration du tétrazolium est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.
- (13) APOTOX Glo: essai automatisé pour un accès simultané à la viabilité des cellules, la cytotoxicité et l'apoptose.
- (14) Caspases: enzymes à cystéine (aspartic-acid-specific cystein proteases) capables de cliver d'autres protéines à des niveaux spécifiques. Elles jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose.
- (15) Apoptose: processus par lequel des cellules déclenchent leur mort en réponse à un signal. Cette mort cellulaire est dite programmée.
- (16) Colloïdal: Dispersion homogène de particules dans un liquide.
- (17) Fibroblastes: cellules du tissu conjonctif.
- (18) Alamar Blue: test qui mesure l'ATP par fluorescence.
- (19) Bleu de Trypan: colorant d'exclusion qui ne pénètre que dans les cellules mortes. Il est utilisé pour mesurer la mortalité des cellules.
- (20) Génotoxicité: propriété de certains toxiques à produire des mutations affectant le patrimoine génétique des organismes exposés.
- (21) Test des comètes: test permettant de détecter des lésions primaires de l'ADN c'est-à-dire des cassures simple et double brin par électrophorèse.

Publications de référence

- (1) **Clothier RH, Beed M, Samson R, et al.** An *In vitro* approach to the evaluation of repeat exposure in the prediction of toxicity. *Toxicol In Vitro* 1997; 11: 679-682.
- (2) **Prieto P.** Barriers, nephrotoxicology and chronic testing *in vitro*. *ATLA* 2002; 30 (2): 101-105.
- (3) **Chen N, He Y, Su Y, et al.** The cytotoxicity of cadmium-based quantumdots. *Biomaterials* 2012; 33: 1238-1244.
- (4) **Cho, SJ, Maysinger D, Jain M, et al.** Long-term to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir* 2007; 23: 1974-1980.

- (5) **He Q, Zhang Z, Gao Y, et al.** Intracellular localization and cytotoxicity of spherical mesoporous silica nano- and microparticles. *Small* 2009; 5: 2722-2729.
- (6) **Zhang Y, Hu L, Yu D, et al.** Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 2010; 31: 8465-8474.
- (7) **Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, et al.** Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small* 2010; 6 (17): 1908-917.

Revue de la littérature

- VanSummeren A, Renes J, VanDelft JHM, et al.** Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drugs-induced hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 373-385.
- Stark, WJ.** Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie Int* 2011; 50, 1242-1258.
- Rzagalinski BA, Strobl JS.** Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 280-288.

Autres publications identifiées

- Mueller D, Müller-Vieira U, Biernel KM, et al.** Biotransformation of diclofenac and effects on the metabolome of primary human hepatocytes upon repeated dose exposure. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 716-724.
- Dans cette étude, les auteurs soulignent la nécessité de développer des méthodes alternatives pour étudier les effets induits sur de longues périodes. Ils valident un protocole d'exposition répétée d'un médicament: le diclofenac. Les cellules sont utilisées pendant 3 semaines et les auteurs étudient la viabilité cellulaire et la capacité de métabolisation. L'originalité est que les auteurs exposent les cellules 9 fois à des doses proches de la réalité (concentration sanguine nécessaire à l'effet thérapeutique), administrées toutes les 48 heures.*
- Sang X, Zheng L, Sun Q, et al.** The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part A* 2012; 100A: 849-902.
- Les auteurs confirment qu'une substance, considérée comme non toxique de façon aiguë, peut le devenir sur le long terme après administration répétée. Cette étude est réalisée in vivo pendant 90 jours, où un oxyde de titane (TiO₂) est administré tous les jours pendant 90 jours en intra-gastrique.*
- Latire T, LePabis C, Mottin E, et al.** Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicol* 2012; 109: 213-221.
- Dans cet article, des mollusques marins sont exposés pendant 10 jours à des concentrations susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement. Ils démontrent, que même si les biomarqueurs étudiés ne sont pas ou peu modifiés avec de faibles concentrations de cadmium, des augmentations dans l'expression de l'activité phénol-oxydase et de la production de ROS sont observées après 10 jours d'exposition.*

Brun E, Carrière M, Mabondzo A. *In vitro* evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long term exposure to nanoparticles. *Biomaterials* 2012; 33: 886-896. Dans cet article, le protocole d'exposition choisit fait référence à des temps courts (4 heures), aigües (24 heures) et chroniques (5 jours). Chez ce dernier, le milieu est changé tous les jours. Des différences significatives de l'expression des gènes en lien avec l'inflammation ont été observées.

Geraets L, Oomen AG, Schroeter J, et al. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-days study. *Toxicol Sci* 2012; 127 (2): 463-473. Dans cette étude, réalisée *in vivo*, les auteurs confirment l'intérêt d'utiliser des administrations répétées en lien avec l'accumulation de NPs d'oxyde de cérium CeO₂. Les animaux sont exposés 6 heures par jour pendant 28 jours.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Accumulation, Culture cell, Long term, Repeated exposure.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt;
- avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt.