

# Translocation des nanoparticules ou comment celles-ci peuvent affecter les organes après le passage pulmonaire ?

Période : avril 2014 à août 2014

Julien FATISSON\* et Michèle BOUCHARD\*\* | Julien.fatisson@gmail.com

\* École de technologie supérieure – Département de génie mécanique – Montréal – Canada

\*\* Université de Montréal – Département de santé environnementale et santé au travail – Montréal – Canada

Mots-clés : **absorption tissulaire, Alzheimer, biodistribution, cytotoxicité, nanoparticules, neurotoxicité, organes, translocation**

Depuis une quinzaine d'années, les nanoparticules (NPs) entrent dans la composition de différents produits de consommation ou matériaux industriels (1,2). Les travailleurs y sont exposés surtout par voie respiratoire alors que la population générale est exposée principalement par l'alimentation (3). De nombreuses études ont été consacrées à déterminer les concentrations de NPs respirables, inhalables et inhalées (4) et les caractéristiques influençant le dépôt pulmonaire (5). Cependant, un nombre restreint d'études visait plus précisément à évaluer la capacité des NPs à pénétrer dans les tissus (translocation). D'une part, la translocation des NPs des voies respiratoires à la circulation sanguine a été confirmée, d'autre part, il a été démontré que certaines NPs peuvent voyager le long de nerfs (comme le nerf olfactif) jusqu'au cerveau (6-8).

Nos connaissances restent parcellaires et demandent à être approfondies. Cette note est donc dédiée aux récentes avancées en termes de potentiel toxique des NPs sur des organes autres que les voies respiratoires (premier article) et de translocation (deuxième article). Ainsi, l'article 1 montre que des NPs de silice, considérées comme peu toxiques, peuvent s'avérer non seulement neurotoxiques mais aussi favorables au développement de maladies neurodégénératives. L'article 2 montre comment une expérimentation avec des nanotubes de carbone radiomarqués a permis de mettre en place une méthodologie d'évaluation de leur potentiel de transfert et pénétration dans différents organes du corps.

## Absorption cellulaire de nanoparticules de silice : neurotoxicité et pathologie type Alzheimer dans des cellules neuroblastomes humaines SK-N-Sh et de souris neuro2a

Yang X, He C, Li L, Chen H, Ma Q, Sui X, Tian S, Ying M, Zhang Q, Luo Y, Zhaung Z, Liu J. Uptake of silica nanoparticles: Neurotoxicity and Alzheimer-like pathology in human SK-N-SH and mouse neuro2a neuroblastoma cells. *Toxicol Lett* 2014;229:240-9.

### Résumé

Cette étude est consacrée à l'évaluation de la neurotoxicité *in vitro* de nano et microparticules de silice (SiNPs), de taille respective de 15 nm et 1-5 µm, sur des neuroblastomes humains et de souris et le potentiel de ces SiNPs à induire une neuropathologie de type Alzheimer. Les observations par MET<sup>(3)</sup> ont montré que les SiNPs étaient majoritairement localisées dans le cytoplasme des cellules et modifiaient la morphologie cellulaire en augmentant leur aspect sphérique et en diminuant les expansions dendritiques<sup>(4)</sup>. Les tests CCK-8<sup>(5)</sup> de viabilité cellulaire ont révélé la cytotoxicité des SiNPs lors d'incubations de 12, 24 ou 48 h à des concentrations allant de 2,5 à 60 µg/mL. De plus, ces tests ont montré que la viabilité cellulaire était plus faible en présence de particules nanométriques comparées à leurs équivalents micrométriques. La mort cellulaire programmée (apoptose) était également accrue, telle que quantifiée par double marquage radioactif Hoechst

33342/PI<sup>(6)</sup> ou par essai TUNEL<sup>(7)</sup>, et par observation en microscopie à fluorescence. L'augmentation de la production de ROS<sup>(8)</sup> a également été confirmée pour compléter ces observations. Chaque test a montré une augmentation de la toxicité des SiNPs avec l'augmentation des concentrations dans le milieu cellulaire. Le marquage par immunofluorescence et l'analyse par Western Blot<sup>(9)</sup> ont montré une régulation positive de l'APP<sup>(10)</sup> et négative de néprilysine<sup>(11)</sup>, ainsi que la croissance du dépôt d'amyloïdes, des biomarqueurs de désordres neurodégénératifs. Cette étude montre donc, pour la première fois, un rôle potentiel des NPs (ici la silice) dans le développement de maladies neurodégénératives.

### Commentaire

Les auteurs ont mis en évidence l'induction de stress oxydatif qui contribue à la toxicité cellulaire des SiNPs, comme rapporté auparavant pour d'autres particules (5, 8). Ce processus toxique a été aussi corrélé à une dérégulation de protéines précurseurs de neurodégénérescence. Les résultats suggèrent que ces biomarqueurs devraient être évalués plus systématiquement et que, bien que non spécifique, la mesure sérique de l'APP et néprilysine pourrait être effectuée pour le suivi de travailleurs à risque (9).

Cet article manque de caractérisation des NPs (telles que l'évolution de la taille et de l'agrégation en milieu cellulaire par

exemple (10)) et de mise en évidence des mécanismes conduisant à la cytotoxicité en fonction de certains paramètres tels que taille, forme ou composition cristalline. Or, la connaissance de ces mécanismes est nécessaire à l'établissement de normes et de réglementations efficaces en vue de protéger les travailleurs ou utilisateurs (11-12). Néanmoins, ce type d'études mérite notre attention et renforce le besoin urgent d'établir des règles mondiales relatives à la production et l'utilisation de NPs dans les produits de consommation.

### Translocation de nanotubes de carbone à des organes distants après exposition pulmonaire : aperçus de radiomarquage au <sup>14</sup>C et radioimagerie de tissus *in situ*

Czarny B, Georgin D, Berthon F, Plastow G, Pinault M, Patriarche G, Thuleau A, Mayne L'Hermite M, Taran F, Dive V. Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from *in Situ* <sup>14</sup>C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging. *ACS Nano* 2014;8(6):5715-24.

#### Résumé

Les auteurs se sont intéressés à la biodistribution de NTCMP<sup>(2)</sup> de diamètre de 40 nm et de longueur 3,9 µm en moyenne, synthétisés et marqués au <sup>14</sup>C dès la synthèse grâce à un précurseur radioactif. Des souris femelles ont été exposées aux NTCMP (aspiration de 20 µg en solution déposés dans l'oropharynx) puis sacrifiées 1 ou 7 jours, 1, 3, 6, 9 et 12 mois post-exposition. Les organes ont été prélevés et immédiatement congelés à -80 °C. Des expériences d'exposition directe par gavage et injection ont aussi été menées dans les mêmes conditions pour quelques temps donnés afin de valider ou non certaines hypothèses de mécanismes.

Les tissus d'organes prélevés (poumon, cerveau, cœur, rein, moelle osseuse, œsophage, estomac, petit et gros intestins, foie, rate) ont été soit solubilisés pour quantifier la radioactivité par scintillation liquide ou obtenus par microtomie, puis analysés par autoradiographie en superposition avec un microscope optique. Sang, fèces et urines ont été recueillis et radio-quantifiés chaque jour afin de valider ou non les hypothèses déduites des observations histologiques.

Les analyses par radio-imagerie ont révélé une diminution progressive (jour 1 à 90) d'environ 90 % de la radioactivité dans les poumons et une augmentation significative (jour 7 à 360) de cette dernière dans le foie et la rate (cibles préférentielles confirmées après injection) post-déposition dans l'oropharynx. Une augmentation relativement moins importante a été décelée dans la moelle osseuse et les reins. *A contrario*, les expériences de gavage réalisées en parallèle ont montré qu'il ne restait pas de radioactivité dans le foie ou la rate après quatre jours. La présence des NTCMP a été confirmée par MET<sup>(3)</sup> tandis que l'absence de radioactivité dans les urines et les fèces au bout d'un an infirme l'hypothèse de métabolites issus de la dégradation des NTCMP.

#### Commentaire

Par des méthodes classiques de mesure de radioactivité et des expériences connexes, les auteurs ont confirmé une translocation pulmonaire et l'accumulation des NTCMP à des sites distants. La comparaison de la cinétique multivoie à l'intérieur d'un même cadre expérimental apporte une dimension méthodologique qui permet d'inférer sur les mécanismes de translocation des NTCMP. Aussi, la comparaison de la cinétique après gavage par rapport à l'exposition pulmonaire a notamment soulevé l'hypothèse que la translocation des NTCMP à travers la barrière intestinale se trouve invalidée, confirmant ainsi celle de la translocation par la voie pulmonaire air-sang.

Grâce à une méthodologie rigoureuse, cette étude originale apporte de nouvelles connaissances intéressantes et ouvre de nouvelles voies pour l'exploration de la toxicité des CNTMP. L'approche développée repose sur le fait que les NTCMP sont distribués de manière uniforme dans les organes, qui sont constitués de différents types de tissus et de cellules. On peut donc se demander si les NTCMP ont une cible cellulaire préférentielle (épithélium, muqueuse, endothélium) et dans quelle mesure ils peuvent affecter certaines fonctions tissulaires. Cet aspect offre donc des possibilités d'optimisation de la méthodologie décrite, auquel il faut ajouter l'extension à d'autres types de NPs, comme les NTCSP<sup>(2)</sup> ou encore à des NPs plus sphériques, qui démontrent une toxicité spécifique envers différents tissus (12).

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

La mise en relation de ces deux articles permet de mettre en évidence les possibilités de translocation tissulaire à des sites distants du site d'entrée respiratoire mais aussi de toxicité neuronale. Le deuxième article confirme la nécessité de combiner diverses approches méthodologiques d'évaluation de la biodistribution temporelle de NPs (radiomarquage combiné à des techniques de radioimagerie) pour établir une gamme plus complète de pénétration des NTCMP et leur biopersistance dans les tissus. Ceci n'exclut en rien la nécessité de réaliser des études plus approfondies sur des cellules et organes autres que pulmonaires afin de connaître le spectre entier des effets cytotoxiques des NPs. D'ailleurs, le premier article montre que des SiNPs pourraient favoriser la neurodégénérescence cérébrale. Il reste à déterminer les mécanismes sous-jacents et l'impact des caractéristiques spécifiques des NPs (taille, chimie, forme, etc.). Ces articles soulèvent des questionnements intéressants quant aux choix des tests de toxicité nécessaires à l'évaluation des risques des NPs (et donc à l'établissement de normes et de règles) et montrent que la translocation des NPs doit être plus étudiée afin de mieux cerner les conditions d'exposition les plus sûres.

## GENERAL CONCLUSION

*These two articles taken together indicate the possibility that nanoparticles translocate to tissues distant from the site-of-entry following respiratory exposure and the potential for neuronal toxicity. The second article reinforces the need to combine various methodological approaches to assess time-dependent biodisposition of NPs (radiolabeling combined with radioimaging) to better establish the uptake range of multi-wall carbon nanotubes and their biopersistence in human tissues. This does not exclude the necessity for more in depth studies focusing on cells and organs other than the respiratory tract. In fact, the first article demonstrates that SiNPs, although often considered as non-toxic, can favour the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's. The underlying toxicity mechanism is yet to be determined, as well as the impact of NPs characteristics (size, shape, chemistry...). These articles raise interesting questions about the choice of toxicity tests needed for NPs risk assessment (and hence to set proper standards and regulations) and shows the need for more studies on NPs translocation to derive safest exposure conditions.*

## Lexique

- (1) NPs: Nanoparticules
- (2) NTCMP ou NTCSP: Nanotubes de carbones à multi-parois ou à simple paroi
- (3) MET: Microscopie électronique à transmission
- (4) Dendrites: Expansions, en forme de branche, des cellules neuronales, qui permettent de propager le potentiel d'action entre l'émetteur du signal électrochimique et la cellule réceptrice
- (5) Test CCK-8: Test de colorimétrie permettant la détermination de la prolifération cellulaire et donc de potentiel cytotoxique
- (6) PI: Iodure de propidium
- (7) TUNEL: Marquage par coupure de fin dUTP de transférase deoxynucleotidyle terminale. Test démontrant l'apoptose cellulaire
- (8) ROS: Espèces réactives de l'oxygène, à la base du processus de stress oxydatif
- (9) Western Blot: Technique analytique très répandue, basée sur la détection de protéines spécifiques dans un tissu grâce à un procédé d'électrophorèse faisant migrer les protéines selon leur charge, conformation ou masse moléculaire
- (10) APP: Protéine précurseur d'amyloïdes. Le dépôt de plaques d'amyloïdes est un des facteurs responsables du développement des maladies neurodégénératives.
- (11) Néprylsine: Métallo-endopeptidase membranaire, enzyme responsable de la dégradation d'amyloïdes.

## Publications de référence

- (1) **National Nanotechnology Initiative.** Nanotechnology Timeline. (<http://www.nano.gov/timeline>) Page consultée le 12 Septembre 2014.
- (2) **PEN (Project on Emerging Nanotechnologies).** Consumer product inventory. (<http://www.nanotechproject.org/cpi/>). Page consultée le 7 septembre 2014.
- (4) **USEPA.** (United States Environmental Protection Agency). Air Quality Criteria for Particulate Matter, Final Report, Oct 2004. Washington, DC, EPA 600/P-99/002aF-bF, 2004.
- (6) **Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al.** Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004; **16** (6-7):437-45.
- (9) **Sorensen KC1, Simonsen AH, Holmetoft UB, et al.** Neprilysin-like activity correlates with CSF-Tau and phospho-tau in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013;**37**(2):379-87.
- (10) **Balbus JM, Maynard AD, Colvin VL, et al.** Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles – Report from an Interdisciplinary Workshop. *Environ Health Perspec* 2007; **115**(11):1654-9.
- (11) **Maynard A, Aitken RJ, Butz T, et al.** Safe handling of nanotechnology. *Nature* 2006;**444**(7117):267.
- (12) **Seaton A, Tran L, Aitken RJ, et al.** Nanoparticles, human health hazard and regulation. *J Royal Soc Interf* 2009; rsif20090252.

## Revue de la littérature

- (3) **Li Y, Zhang Yi, Yan B.** Nanotoxicity Overview: Nano-Threat to Susceptible Populations. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:3671-97.
- (5) **Braakhuis HW, Park MVDZ, Gosens I, et al.** Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol* 2014;**11**(18):1-25.
- (7) **Win-Shwe T-T, Fujimaki H.** Nanoparticles and neurotoxicity. *Int J Mol Sci* 2011;**12**:6267-80.
- (8) **Cupaioli A, Zucca F, Boraschi D, et al.** Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? *Prog Neurobiol* 2014;**119-120C**:20-38.
- (12) **Firme III CP, Bandaru PR.** Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomed* 2010;**6** (2):245-56.

## Autres publications identifiées

**Bramini M, Ye D, Hallerbach A, et al.** Imaging Approach to Mechanistic Study of Nanoparticle Interactions with the Blood Brain Barrier. *ACS Nano* 2014;**8**(5):4304-12.  
*Cet article présente une nouvelle méthode d'imagerie pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans le passage des nanoparticules à travers la barrière hémato-encéphalique. Grâce à cette approche, qui pourrait être généralisée ultérieurement à plusieurs nanoparticules, les auteurs confirment la translocation de nanoparticules de polystyrène, utilisées comme modèle, au niveau du cerveau.*

**Ma JYC, Young S-H, Mercer RR, et al.** Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;**278**:135-47.

*L'étude histologique de rats exposés par instillation intratrachéale à des nanoparticules d'oxyde de cérium, a révélé que ces dernières induisent une phospholipidose et une fibrose pulmonaires, montrant ainsi les risques néfastes sur la santé que présentent ces nanoparticules pouvant être utilisées comme carburant diesel.*

**Sheng L, Wang L, Su M, et al.** Mechanism of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Induced Neurotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 2014;Epub.

*Les auteurs de ce travail de recherche montrent qu'une exposition sous-chronique à des nanoparticules d'oxyde de titane induit des dommages cérébraux à des poissons-zèbres. Cette étude présente donc une nouvelle méthode d'évaluation de la neurotoxicité de nanoparticules et surtout amène des questions légitimes sur l'utilisation de telles nanoparticules dans des applications environnementales et leur potentiel toxique.*

## Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

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