

Evaluation de la toxicité de NPs d'oxydes métalliques par un modèle de culture cellulaire 3D et une approche de toxicogénomique

Période : avril 2015 à août 2015

Isabelle PASSAGNE | isabelle.passagne@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux - Inserm 1034, Laboratoire de toxicologie - Bordeaux - France

Mots clés : **nanoparticules, toxicité, méthodologie, modèle cellulaire 3D, toxicogénomie**

Les nanoparticules (NPs) d'oxydes de métal se retrouvent dans de nombreux produits de consommation courante, comme les peintures, les emballages ou l'alimentation. Leur utilisation croissante suscite des interrogations en termes d'impact sur la santé. La méthodologie standard pour évaluer leur sécurité d'emploi est basée sur l'utilisation de modèles animaux. Cependant, leur coût et leur lourdeur ainsi que la Règle des 3R* (réduire, raffiner, remplacer) justifient le développement d'approches in vitro. Les modèles de culture cellulaire 2D présentent des inconvénients car elles induisent des modifications du fonctionnement cellulaire et un déficit d'interactions intercellulaires, ce qui conduit à une réponse différente de celle obtenue dans l'environnement physiologique, plus complexe. Le développement de modèles qui miment les conditions physiologiques et pouvant être applicables à un screening haut débit, s'avère d'une grande utilité. Ainsi, l'article 1 présente une étude sur un modèle cellulaire 3D de type sphéroïde. L'article 2 présente une approche à haut débit de toxicogénomique* comme un outil prometteur pour évaluer le potentiel toxique et étudier le mécanisme d'action des nanoparticules (NPs).

Culture cellulaire de type sphéroïdes pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules

Sambale F, Lavrentieva A, Stahl F, Blume C, Stiesch M, Kasper C, Bahnemann D, Scheper T. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *J Biotechnol* 2015; **205**:120-9.

Résumé

Cette étude est ciblée sur l'évaluation de la toxicité de NPs d'oxyde de zinc (ZnO-NP) et de dioxyde de titane (TiO₂-NP) par un modèle tridimensionnel (3D) de sphéroïdes* de cellules pulmonaires A549 ou de fibroblastes NIH-3T3. Dans un premier schéma d'exposition similaire à celui du modèle 2D, les cellules sont placées dans du milieu de culture afin de former des sphéroïdes avant d'être incubées avec les NPs. Dans le second schéma, les cellules sontensemencées directement en présence des NPs avant même la formation de sphéroïdes. La viabilité cellulaire est évaluée ensuite par deux tests : Celltiter-blue® cellular viability assay* et CellTiter-Glo® ATP assay*.

Une diminution de la viabilité cellulaire a été observée avec les ZnO-NP révélant leur toxicité. Le modèle 3D avec les cellules A549 s'est avéré plus sensible et ceci notamment quand les NPs étaient rajoutées en amont de la formation de sphéroïdes. Dans ces conditions d'exposition, les cellules A549 en culture cellulaire 3D formeraient des agrégats lâches ce qui peut expliquer la plus grande toxicité observée. Sur les cellules NIH-3T3, les modèles 2D et 3D (agrégats

compacts) ont conduit à des résultats similaires. Concernant les TiO₂-NP, aucune toxicité n'a été révélée en culture 2D contrairement au modèle 3D, notamment avec les cellules A549 et bien que l'effet toxique observé soit faible. L'article montre que l'interaction cellule-cellule est affectée, quel que soit le type cellulaire, lorsque les TiO₂-NP sont ajoutés avant la formation de sphéroïdes. Il y a alors formation de plusieurs petits sphéroïdes au lieu d'un seul. Enfin, une corrélation entre le diamètre des sphéroïdes et la concentration en NPs est observée.

Commentaire

Le choix des NPs testées est judicieux parce que leurs effets toxiques sur les A549 et NIH-3T3 ont été largement décrits dans la littérature, permettant ainsi une meilleure interprétation des résultats. Néanmoins, la partie caractérisation des NPs, en particulier pour TiO₂-NP reste faible dans cette étude, ce qui réduit la possibilité de comparaison avec d'autres études. Les deux tests de viabilité cellulaire utilisés sont bien transposables au modèle 3D. Néanmoins, cette étude montre la complexité d'utilisation de ce modèle. En effet, la densité des sphéroïdes peut jouer un rôle important dans la variabilité des résultats obtenus, comme montré par d'autres auteurs (1). De même, le temps de formation des sphéroïdes avant exposition aux NPs influence la réponse des cellules. Il aurait été important de mieux caractériser les cellules des modèles 3D, afin de s'assurer de l'absence de sélection de cellules résistantes.

Dans une étude précédente, l'exposition de cellules à des NPs de ZnO a mis en évidence que différents mécanismes de mort cellulaire interviendraient selon les modèles 2D et 3D utilisés (1). Dans l'étude analysée, le modèle 3D a montré un effet des TiO₂-NP, effet qui reste non toxique, mais ne permet pas de tirer des conclusions quant à la fiabilité des résultats obtenus avec le modèle 3D, l'étude étant réalisée sur deux types cellulaires uniquement.

Néanmoins, le modèle 3D reste un outil intéressant car la taille des sphéroïdes pourrait être utilisée comme un outil pour mesurer les effets cytotoxiques, comme avec le test clonogénique* (2). La taille de la colonie cellulaire permet la distinction entre les effets sur la viabilité cellulaire et la prolifération cellulaire. Le modèle 3D offre également la possibilité d'une évaluation *in vitro* de toxicité à long terme et les données obtenues semblent bien corrélées avec celles des tests sur les animaux (1,3).

Evaluation quantitative à haut débit des effets des nanoparticules de silice à faible dose sur des cellules pulmonaires

Pisani C, Gaillard JC, Nouvel V, Odorico M, Armengaud J, Prat O. High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: grasping complex toxicity with a great depth of field. *BMC Genomics* 2015;16:315.

Résumé

Les auteurs ont choisi d'étudier les effets toxiques induits par des NPs de silice (oxyde de silicium) sur des cellules pulmonaires A549, par une approche de toxicogénomique. Une analyse transcriptomique* par puces à ADN* a été réalisée pour différentes concentrations de NPs afin de déterminer la NOTEL («plus forte dose sans effet observé sur le transcriptome⁹»). La protéomique* est proposée comme approche complémentaire avec analyse du sécrétome* (protéines sécrétées par la cellule) par HPLC* couplée à la spectrométrie de masse*. Ceci permet d'identifier des biomarqueurs spécifiques du changement d'état moléculaire après exposition aux NPs. En effet, les protéines présentes dans le sécrétome contrôlent un grand nombre de processus biologiques.

Concernant la transcriptomique, une réponse dose-dépendante a été mise en évidence avec des modifications significatives de l'expression de gènes dans les cellules exposées. La NOTEL est de 1,0 µg NPs/cm² de tapis cellulaire. La LOTEL («plus faible dose présentant un effet transcriptionnel nocif observé») est de 1,5 µg/cm² avec 255 transcrits induits. Une corrélation a bien été établie entre le nombre de gènes modulés et le pourcentage de mort cellulaire observée. Des modifications sont observées au niveau de gènes de la coagulation, de l'activation de la prothrombine¹⁴, de la réponse antioxydante ou de la signalisation métabolique des xénobiotiques. A la dose de 1,5 µg/cm², les gènes modulés sont impliqués dans les processus d'exocytose* et d'endocytose* cellulaire (cascade de signalisation Rho, remodelage de l'actine, endocytose). En complément, l'analyse protéomique a mis en évidence les protéines correspondantes des transcrits dans le compartiment extracellulaire, avec augmentation des protéines de la signalisation métabolique des xénobiotiques

et d'enzymes de détoxification (Glutathion S-transférase, thiorédoxine réductase ...). Des protéines ayant un rôle dans le métabolisme énergétique sont également surexprimées, comme celles de la glycolyse (phosphoglycérate kinase 1, glucose-6-phosphate isomérase, pyruvate kinase ...).

Commentaire

La toxicité étant fortement influencée par les paramètres physicochimiques des NPs testées, cet article souffre d'un manque de caractérisation des NPs. Seuls la taille et l'état d'agglomération dans le milieu ont été étudiés. Par contre, un soin particulier a été apporté dans cette étude au choix des conditions d'exposition (temps, gamme de concentrations). Ces conditions ont été fixées après réalisation de différents tests de viabilité et d'impédance cellulaire, et correspondent à des concentrations induisant moins de 10% de mort cellulaire. Les auteurs ont mis en évidence que l'exposition aux NPs de silice conduit bien à une réponse cellulaire dose-dépendante (pénétration des NPs à faible dose, inflammation et stress oxydant à plus forte dose). La combinaison de deux technologies à haut débit a permis d'évaluer quantitativement les effets cellulaires et moléculaires induits. La transcriptomique permet d'observer des effets à de plus faibles doses comparativement aux tests de viabilité cellulaire, suggérant une grande sensibilité de la méthode. Le choix des temps d'analyse est un paramètre important. En effet, les temps précoces pourraient être plus informatifs des interactions des NPs-cellules que les temps à 24h et 48h, pour lesquels une réponse adaptative de la cellule ne peut être exclue. Les deux techniques utilisées ouvrent des pistes intéressantes en termes de mécanisme d'action, comme celle de la coagulation ou du métabolisme énergétique. Des modifications du taux plasmatiques de facteur de von Willebrand*, du fibrinogène* et des plaquettes circulantes sont observées dans une autre étude (4). Des modifications métaboliques confirment celles observées chez la souris (variation de l' α -glycérophosphate, α -ketoglutarate...)(5). Devant la multitude d'informations, il reste cependant difficile d'isoler des biomarqueurs spécifiques de toxicité comme annoncé.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les nanotechnologies sont un domaine scientifique en plein essor du fait des nombreuses applications innovantes que laissent entrevoir les nanomatériaux. Désormais, ceux-ci ne sont plus uniquement confinés dans les laboratoires de recherche mais sont intégrés dans de nombreux produits de la vie courante. Les connaissances passées, obtenues sur les effets des particules ultrafines issues de la pollution atmosphérique, font craindre des incidences sur la santé avec les NPs manufacturées. Certains nanomatériaux ont d'ailleurs été référencés (TiO₂, SiO₂), comme étant prioritaires pour l'évaluation de la toxicité par le « National Institute of Environmental Health Sciences » (NIEHS) américain et l'Organisation pour la coopération économique et le développement (OECD). Du fait des propriétés physico-chimiques particulières des NPs, se pose la question de la fiabilité des tests de toxicité classiquement utilisés. Des interférences ont déjà été observées avec certains réactifs. Dans l'axe « nanomatériaux » du plan PNSE 3 (Plan National Santé Environnement), il a notamment été défini comme priorité d'action « une recherche axée sur les méthodologies dont la métrologie et la traçabilité ainsi que leurs mécanismes d'actions ». En Nanotoxicologie, un des enjeux est actuellement de disposer de modèles *in vitro* permettant un dépistage fiable de la toxicité. En effet, les modèles *in vitro* standard ne sont pas représentatifs de la réalité. Pour exemple, les cellules de foie perdent certaines fonctions spécifiques et ne permettent pas d'étude métabolique. Or, l'étude en toxicogénomique montre bien que des modifications énergétiques sont une piste mécanistique. Les modèles de culture 3D pourraient donc combler le fossé entre les modèles *in vitro* et *in vivo* mais la validation d'un tel modèle reste complexe. Ces nouvelles méthodologies pourraient permettre un screening rapide et la validation d'indicateurs précoces d'effets afin d'aller vers une toxicologie plus prédictive.

GENERAL CONCLUSION

*Nanotechnology is an important scientific field because of multiple innovative applications of nanomaterials. Now, nanomaterials are not only confined to research laboratories but are integrated in many consumer products. Past knowledge obtained on the effects of ultrafine particles from atmospheric pollution, suggest health impacts with NPs manufactured. Some nanomaterials have also been referenced (TiO₂, SiO₂) as priorities for safety evaluation by the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) and the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). The availability of *in vitro* models for reliable detection of toxicity is an issue in Nanotoxicology. Indeed, *in vitro* standard models are not representative of reality. For example, liver cells lose specific functions and do not allow a metabolic study. However, the Toxicogenomic study shows that energy changes are mechanistic track. 3D culture models could therefore bridge the gap between *in vitro* and *in vivo* models, but the validation of such a model remains complex. These new methodologies could allow rapid screening and validation of early markers of effects in order to obtain a more predictive toxicology.*

Lexique

CellTiter-blue® cellular viability assay: Test de cytotoxicité basé sur la capacité métabolique des cellules vivantes à convertir un colorant (de la résazurine) en un produit fluorescent (résorufine)

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay: Test de cytotoxicité déterminant le nombre de cellules vivante sur la base de la quantification de l'ATP qui signe l'activité métabolique de la cellule

Endocytose: Processus permettant la pénétration de substances dans la cellule

Exocytose: Processus au cours duquel les substances contenues dans le cytoplasme d'une cellule sont rejetées vers l'extérieur

Facteur de von Willebrand: Protéine synthétisée notamment par les cellules constituant l'intérieur de la paroi des vaisseaux (endothélium vasculaire). Protéine nécessaire à l'agrégation des plaquettes avec un rôle dans hémostasie primaire.

Fibrinogène: Protéine de la cascade de la coagulation. Cette protéine donne de la fibrine, impliquée dans la formation de caillot sanguin.

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance, technique de séparation analytique de molécules.

Protéomique: Etude de l'ensemble des protéines codées par le génome qui peuvent être exprimées par la cellule.

Puces à ADN : La technologie des puces à ADN (microarrays) permet de mesurer la quantité des ADN complémentaires à l'aide de sondes après hybridation.

Règle des 3R : Concept visant à réduire l'expérimentation animale avec (Réduire) le nombre d'animaux, (Raffiner) la méthodologie utilisée, (Remplacer) les modèles animaux

Sécrétome : Le sécrétome représente l'ensemble des protéines sécrétées par une cellule.

Spectrométrie de masse : Technique permettant de détecter et d'identifier des molécules par leur masse.

Prothrombine : facteur de coagulation de l'hémostase normale.

Sphéroïdes : Modèle en 3D qui reconstitue le microenvironnement cellulaire, l'hétérogénéité cellulaire et les interactions cellulaires.

Tests clonogéniques : Test mesurant la capacité de chaque cellule à établir un nouveau clone de cellules après une exposition à un xénobiotique. La mesure de la taille de la colonie permet de discriminer un effet cytotoxique d'un effet cytostatique.

Toxicogénomique : Etude de la réponse d'un génome exposé à un xénobiotique technologies "omiques" telles que la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique

Transcriptome : Le transcriptome représente l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome

Transcriptomique : Etude basée sur la quantification de l'expression ARN messagers produits lors du processus de transcription d'un génome. Plusieurs techniques peuvent être utilisées comme les puces à ADN ou la PCR quantitative.

Publications de référence

- (1) Chia SL, Tay CY, Setyawati MI, et al. Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small* 2015;**11**(6):702-12.
- (2) Herzog E, Casey A, Lyng FM, et al. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. *Toxicol Lett* 2007;**174**(1-3):49-60
- (3) Lee J, Lilly GD, Doty RC, et al. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* 2009;**5**(10):1213-21.
- (4) Nemmar A, Albarwani S, Beegam S, et al. Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation. *Int J Nanomedicine* 2014;**9**:2779-89.
- (5) Lu X1, Tian Y, Zhao Q, et al. Integrated metabonomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice. *Nanotechnology* 2011;**22**(5):055101.

Revue de la littérature

Warheit DB, Donner EM. Risk Assessment Strategies for Nanoscale and Fine-sized Titanium Dioxide Particles: Recognizing Hazard and Exposure Issues. *Food Chem Toxicol* 2015;

Ahamed M, Akhtar M, Alhadlaq H, et al. Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. *Nanomedicine* 2015;**10**(15):2365-77.

Saptarshi SR, Duschl A Lopata AL. Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview. *Nanomedicine* 2015;**10**(13):2075-92.

Ding L, Liu Z, Aggrey MO, et al. Nanotoxicity: the toxicity research progress of metal and metal-containing nanoparticles. *Mini Rev Med Chem* 2015;**15**(7):529-42.

Autres publications identifiées

Liu R, Liu HH, Ji Z, et al. Evaluation of Toxicity Ranking for Metal Oxide Nanoparticles via an in vitro Dosimetry Model. *ACS Nano* 2015; 10.1021/acs.nano.5b04420.

Etude de toxicité essayant de déterminer la dose réelle délivrée et évaluant l'incidence de paramètres comme la sédimentation sur la réponse cellulaire. Le Calcul de la dose délivrée tient compte de la sédimentation. Dans le cas d'un calcul simplifié de la sédimentation, une mauvaise interprétation du classement de la toxicité est alors observée.

Ng AM, Guo MY, Leung YH, et al. Metal oxide nanoparticles with low toxicity. *J Photochem Photobiol B* 2015;**151**:17-24

Etude de toxicité réalisée sur des bactéries et des cellules algales. Une faible toxicité est observée avec SnO₂, In₂O₃, and Al₂O₃. Les auteurs indiquent que la toxicité faible pourrait être attribuée à l'interaction limitée entre les nanoparticules et les parois cellulaires des organismes testés.

Hanagata N, Morita H. Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles. *J Toxicol Sci* 2015;**40**(5):625-35.

Etude de toxicité de NPs de ZNO tenant compte des conditions de culture. Les NPs internalisés dans les cellules ont un effet cytotoxique supérieur aux ions Zn libérés, en ralentissant la prolifération cellulaire. La cytotoxicité dépend fortement de la concentration d'ions calcium.

Petters C, Thiel K, Dringen R. Lysosomal iron liberation is responsible for the vulnerability of brain microglial cells to iron oxide nanoparticles: comparison with neurons and astrocytes. *Nanotoxicology* 2015 ; **19**:1-11.

Etude de toxicité réalisée sur des cellules microgliales, des astrocytes et des neurones. Une plus grande toxicité est observée sur les cellules gliales. La résistance relative des astrocytes et des neurones contre la toxicité est une conséquence d'une lente mobilisation des ions fer.