

Direction de l'Évaluation des Médicaments Et des
produits Biologiques
Département de toxicologie
Chef de département : D. Masset
Secrétaire scientifique : A. Sanh

**RECOMMANDATIONS RELATIVES A L'ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE DES MEDICAMENTS
SOUS FORME NANOPARTICULAIRE**

Version 2 du 4 octobre 2011

Document préparé par le Groupe de Travail « Innovation non Clinique »

➤ **Coordinateur de la rédaction**

○ J.-R. CLAUDE

➤ **Président**

○ J.-R. CLAUDE

➤ **Membres**

○ L. DOMENJOUR

○ E. FATTAL

○ J. GUILLEMAIN

○ A. GUILLOUZO

○ S. LE CROM

○ A. LE PAPE

○ S. LERONDEL

○ P. LESCUYER

○ B. MAILLÈRE

○ F. MOREL

○ M. PALLARDY

○ C. PINEAU

○ T. RABILLOUD

○ R. RAHMANI

➤ **Experts invités**

○ D. MARZIN

○ P. NESSLANY

➤ **Représentants de l'Afssaps invités**

○ D. ABDON

○ D. SAUVAIRE

Recommandations relatives à l'évaluation toxicologique des Médicaments sous forme nanoparticulaire.

Seconde édition (Version 1 disponible sur demande)

A. INTRODUCTION

Les nanoparticules sont définies comme des particules d'une taille comprise entre 1 et 100 nanomètres. Leurs applications industrielles générales sont considérables et bien qu'il n'existe à l'heure actuelle que peu de spécialités pharmaceutiques proposées sous forme nanoparticulaire, on peut prévoir un développement spectaculaire de ces produits dans les années à venir. À court et moyen terme, l'utilisation majeure des médicaments nanoparticulaires (MNP) est la vectorisation des principes actifs. Elle correspond du reste aux quelques produits déjà commercialisés.

On distingue à l'heure actuelle trois types de vecteurs :

- Les vecteurs de première génération : nanosphères et nanocapsules (les plus connues et les plus accessibles),
- Les vecteurs de seconde génération : nanoparticules recouvertes de polymères hydrophiles tels que le polyéthylène glycol (PEG), nanoparticules « peggylées »
- Les vecteurs de troisième génération, en cours de développement, associant un noyau biodégradable et une enveloppe de polymère (PEG) à un ligand de reconnaissance membranaire.

Il s'agit très généralement de systèmes colloïdaux où l'on peut distinguer trois classes :

- 1) les nanoparticules biodégradables,
- 2) les nanoparticules solubles,
- 3) les nanoparticules non ou lentement solubles.

La biodégradabilité ou la solubilité est une propriété importante conditionnant l'élimination des nanoparticules introduites dans l'organisme. Il faut aussi prendre en compte d'autres paramètres que les paramètres conventionnels (masse, masse par unité de volume) pour rapporter leurs effets à leur exposition : par exemple la taille relative des particules, leur surface active (surface d'échange totale, externe et le cas échéant interne), leur nombre par unité de volume, etc. Ils conditionnent largement la capture, la distribution, l'élimination des MNP. Par ailleurs, il faut absolument tenir compte de la formation d'agglomérats de nanoparticules, formant à leur tour des agrégats dont les caractéristiques et les risques potentiels vont être très différents de ceux des nanoparticules initiales. Ces agglomérats et agrégats se forment également lors de la conservation dans un milieu liquide. Dans un milieu biologique (sang, plasma) cette formation peut être facilitée, mais le phénomène inverse a également été signalé, à savoir la régénération des nanoparticules initiales. Ceci signifie qu'en pratique le comportement de la forme nanoparticulaire doit être connue, en particulier en ce qui concerne ses changements de structure et ses modifications de propriétés dans les excipients ou dans les milieux de culture utilisés lors des essais (notamment en présence et en l'absence de sérum, de protéines spécifiques, etc.)

Concernant la toxicité des MNP, si l'on ne saurait s'affranchir de la toxicité du principe actif vectorisé, il est évident que la structure dans laquelle il se trouve risque de la modifier fortement. En ce sens, il sera préférable souvent de considérer le MNP comme une entité autonome qu'il conviendra d'évaluer comme un principe actif « total » en grande partie nouveau. Par ailleurs, la forme nanoparticulaire peut engendrer des risques spécifiques (formation d'agglomérats), véhiculer par adsorption des impuretés, générer

par dégradation ou solubilisation des matériaux qui les constituent des produits toxiques, franchir des barrières physiologiques (hémato-encéphalique, fœto-placentaire, membranes cellulaires et nucléaires, etc.). On mesure ainsi l'ampleur de la tâche que constitue l'évaluation toxicologique des MNP sachant de plus que d'une part ce domaine n'est que très peu documenté, et d'autre part qu'il n'existe pas de matériel de référence pour évaluer les nanoparticules. Dans ces conditions, il est évident que, pour une meilleure efficacité (notamment pour le criblage) et pour des raisons éthiques (utilisation extensive et injustifiée d'animaux de laboratoire), l'emploi de méthodes *in vitro* validées doit être fortement encouragé. Elles doivent permettre d'évaluer la génotoxicité, la cytotoxicité, la formation de radicaux libres, la biopersistance, la capacité phagocytaire, etc. de façon pertinente.

On n'omettra pas de souligner que si la vectorisation de principes actifs est probablement l'utilisation potentielle majeure des nanoparticules en médecine, d'autres utilisations du plus haut intérêt sont à prendre en considération : l'ingénierie tissulaire et le diagnostic par exemple. On rappellera aussi que les formulations nanoparticulaires sont largement utilisées dans le domaine de la cosmétologie (écrans solaires). Elles font l'objet de controverse dans certains pays. Enfin, on ne manquera pas aussi de manifester un certain étonnement devant une certaine richesse en publications scientifiques relatives aux risques professionnels et environnementaux des nanotechnologies et nanoparticules, par rapport à la pauvreté en documents relatifs aux MNP.

B. OBJET

Les recommandations présentées dans ce texte de positionnement (« position paper ») reflètent l'opinion des Experts du Groupe de Réflexion sur les Nouvelles Orientations en Matière d'Évaluation Non-clinique de la Sécurité des Produits de Santé de l'Afssaps. Elles sont donc ouvertes à la réflexion et à la discussion, sachant que certaines propositions sont avant tout pragmatiques, parfois même empiriques. Compte-tenu du caractère potentiellement extensif du domaine des MNP, le Groupe a choisi de limiter ses investigations à trois secteurs déjà développés ou en cours de développement :

- L'utilisation de MNP en imagerie médicale (IRM et échographie),
- La vectorisation des principes actifs (anticancéreux, antibiotiques, antifongiques, etc.), par introduction de MNP dans l'organisme,
- L'utilisation de MNP par des voies locales (peau, poumon, œil, etc.) dans le but d'obtenir une exposition systémique ou un effet local.

Ayant trait à l'évaluation toxicologique des MNP, les recommandations seront formulées selon l'ordre habituel dans les lignes directrices. Le Groupe insiste fortement sur le fait que, compte tenu de la grande variété de structure, de propriétés physico-chimiques et biologiques, d'utilisation thérapeutique, etc., une évaluation au cas par cas du programme d'étude le plus pertinent pour un MNP considéré sera toujours indispensable.

C. RECOMMANDATIONS

Comme précédemment indiqué, des données scientifiques générales et/ou réglementaires en rapport avec l'évaluation toxicologique des MNP font actuellement défaut. On pourra néanmoins se référer à un document de la Commission Européenne (Health and Consumer Protection) préparé par le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks) intitulé "Opinion on the Appropriateness of the Risk Assessment Methodology in Accordance with the « Technical Guidance Documents for New and Existing Substances for Assessing the Risks of Nanomaterials » et approuvé par consultation publique le 29 mars 2007. Sans traiter expressément des MNP, il renferme nombre de considérations qui leur sont applicables. On soulignera également que l'approche toxicologique « conventionnelle » proposée par les lignes directrices actuelles pour les médicaments en général (ICH, FDA, EMEA) a été acceptée jusqu'à présent pour les MNP enregistrés ou en cours d'évaluation, par les Autorités de Santé. Il n'en reste pas moins que différentes opinions se sont manifestées pour estimer que les méthodes d'évaluation expérimentales existantes n'évaluaient pas de manière adéquate les propriétés des produits sous forme de nanoparticules. Les critiques les plus souvent exprimées concernent notamment les études pharmaco- et toxicocinétiques auxquelles il est reproché de ne pas prendre en compte de façon réaliste les particularités liées à la structure nanoparticulaire. La pertinence des tests *in vitro* est également débattue dans la mesure où la vitesse de sédimentation et la capacité de diffusion des nanoparticules doit modifier les conditions d'exposition (dose-durée) des modèles utilisés (tests de génotoxicité par exemple). Enfin, l'absence de données sur les effets à long terme est souvent soulignée.

En conséquence, on peut être amené à préconiser, comme le font certains groupes consommateurs aux USA, le développement d'une réglementation totalement nouvelle, basée sur des tests « adaptés » d'évaluation de la sécurité, pour les produits nanoparticulaires, incluant les MNP. Cette proposition maximaliste est totalement idéaliste et scientifiquement injustifiée selon la très grande majorité de la communauté scientifique. Combien d'années de mise au point et de validation seraient-elles nécessaires pour arriver à ce résultat ? Par ailleurs les données scientifiques existantes ne paraissent pas justifier une telle révision.

Certains industriels consultés et la plupart des Experts estiment du reste que l'évaluation toxicologique des MNP ne devrait pas s'écarter trop sensiblement de l'évaluation « conventionnelle », à certaines adaptations près (caractère caricatural des études par administration répétée pour des MNP utilisés en administration unique chez l'homme, dans le cas de l'imagerie médicale). Le plan suivi pour l'élaboration de ces recommandations suit, en ce sens, cette vue des choses, c'est-à-dire adapter lorsque nécessaire la stratégie d'évaluation de la sécurité, sans remettre en cause les principes fondamentaux.

1. ÉTUDES PHARMACOCINÉTIQUES

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) des nanoparticules et de leurs produits de dégradation ou de solubilisation est indispensable et préalable aux études de sécurité. Les propriétés pharmacocinétiques des nanoparticules sont très différentes de celles des molécules conventionnelles mais s'étudient néanmoins de façon similaire. Essentiellement quatre facteurs déterminent la pharmacocinétique des nanoparticules : la voie d'administration, la taille de la particule, la nature des polymères d'enrobage et l'espèce animale. Les méthodes d'étude de la biodistribution devront d'une part porter sur le matériau constituant les MNPs et d'autre part sur le principe actif qui leur est associé. Pour ce dernier, on utilisera des méthodes analytiques conventionnelles. Pour les nanoparticules il faudra utiliser une méthode de marquage et s'assurer que le marqueur utilisé n'est pas susceptible de modifier les propriétés physicochimiques des nanoparticules, et donc leur biodistribution. Il faudra

aussi garantir que ce marqueur n'est pas libéré « prématurément » des nanoparticules au risque d'entraîner une confusion entre le suivi du marqueur libéré et le suivi de celui restant lié aux nanoparticules. Une façon de procéder pour ces études pourrait être de réaliser un double marquage et de vérifier que les deux marqueurs restent toujours associés tout au long du suivi de la biodistribution. Les méthodes de marquage sont classiques : marquage fluorescent ou radioactif. Les techniques d'imagerie scintigraphique, de TEP ou d'imagerie en fluorescence ne donnent pas de résultats quantitatifs mais sont néanmoins adaptés à l'étude de la biodistribution des MNPs administrés par voie parentérale et pulmonaire, voire entérale ainsi qu'à la détermination des sites de séquestration et des phénomènes de translocation. Des radioisotopes pour la TEP ayant une demi-vie relativement longue tels que ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12,7 \text{ h}$) et ^{89}Zr ($T_{1/2} = 78,4 \text{ h}$) sont particulièrement adaptés pour étudier les étapes tardives de la biodistribution et de la translocation, sur une durée pouvant s'étendre de 36 h à 9 jours lorsqu'un marquage stable *in vivo* peut être obtenu via un constituant fonctionnalisé des MNPs.

L'administration des MNPs est réalisée fréquemment par voie parentérale (IV, parfois SC ou IM), mais aussi par des voies locales spécifiques (poumon, peau, œil). Par voie parentérale, ils vont être reconnus par le système réticulo-endothélial et phagocytés par les macrophages (foie, rate, ganglions lymphatiques, moelle osseuse, poumons, etc.). Cette propriété variera en fonction des propriétés de surface des MNPs et de la plus ou moins grande aptitude à subir les phénomènes d'opsonisation qui varient énormément en fonction de l'espèce animale. De ce fait, le choix de ou des espèces pouvant être prédictives pour l'Homme est spécialement difficile : par exemple, le Chien semble peu approprié. L'utilisation de deux espèces animales (rongeur et non rongeur) peut ainsi s'avérer inadaptée.

Dans l'état actuel des connaissances, si l'on met à part le cas des MNPs utilisés en imagerie médicale, peu de choses sont connues sur leur métabolisme et leur excrétion. Dans le cas des polymères, il sera important de déterminer la nature des produits de dégradation ainsi que le mécanisme et la cinétique de leur élimination. Cette détermination est très importante dans la mesure où certains effets toxiques peuvent être liés à ces métabolites. Il paraît également possible que le devenir dans l'organisme de certaines nanoparticules (quantum dots) soit différent en fonction de la dose administrée : élimination urinaire pour les faibles doses, transfert dans le foie, excrétion biliaire et élimination par les selles aux doses moyennes (utilisées chez l'Homme ?) et enfin stockage hépatique dans les cellules de Kupfer (formation d'agglomérats et d'agrégats ?) pour les fortes doses.

Il est donc recommandé d'aborder les indispensables études pharmacocinétiques des MNP selon une réflexion scientifique menée au cas par cas, en s'inspirant le cas échéant

des études conduites sur les MNP déjà développés, en palliant leurs éventuelles insuffisances.

Il sera préférable de rapporter les effets observés à l'unité de surface, plutôt qu'à l'unité de masse comme il est habituel, car plus une particule est petite, plus la proportion d'atomes exposés à l'environnement est importante.

2. ÉTUDES DE PHARMACOLOGIE DE SÉCURITÉ

La réalisation d'études adoptant des protocoles issus de l'évaluation pharmacologique (c'est-à-dire de l'efficacité) pour l'évaluation de la sécurité non clinique est largement pratiquée depuis les années 1990. Ces études ont l'avantage d'être la plupart du temps réalisées à dose unique ou à doses croissantes administrées dans des délais courts (« escalating doses »), d'être plus flexibles que les études toxicologiques et surtout de s'appliquer à des organes étudiés avec insuffisamment de finesse (cœur) dans ces études toxicologiques. C'est le cas du système nerveux central, du poumon, du cœur, mais aussi le cas échéant du rein (aspects fonctionnels), de la coagulation sanguine, etc.

Il n'y a aucune raison valable pour que les MNP soient dispensés de cette approche, compte tenu de leur impact (voir plus loin) sur le système cardiovasculaire, le poumon, le rein et le système nerveux central. Dans l'état actuel des connaissances, l'utilisation de la batterie de tests préconisée par les guidelines ICH S7A et S7B paraît acceptable. L'évaluation du risque de prolongation de l'intervalle QT paraît s'imposer, mais il reste à confirmer que le test préliminaire *in vitro* sur les effets sur le courant hERG (I_{kr}) exprimé par les cellules embryonnaires de rein humain HEK-293 est pertinent et applicable aux formes nanoparticulaires.

3. ÉTUDES TOXICOLOGIQUES

3.1 TOXICITÉ *IN VITRO*

Pour les raisons précédemment évoquées (rapidité – éthique), en raison également de l'absence de données *in silico*, il est fortement recommandé de mettre au point et de valider des méthodes *in vitro* permettant dès le stade des pré-requis d'obtenir des informations sur la cytotoxicité, la capacité phagocytaire et l'activation des macrophages, l'activation de la voie du complément, la biopersistance, la génération d'espèces radicalaires toxiques, la tolérance locale cutanée, pulmonaire et oculaire (si ces voies sont utilisées) etc. Des tests pharmacologiques spécifiques concernant l'action sur la cellule nerveuse et la fibre myocardique notamment pourraient être envisagés.

3.2 TOXICITÉ PAR ADMINISTRATION UNIQUE

L'évaluation de la toxicité par administration unique apporte beaucoup d'informations sur les effets indésirables des MNP également administrés à dose unique chez l'Homme (imagerie). On recommandera de concevoir ces études non pas comme des études de toxicité aiguë dont le « end point » est la mort, mais comme des études complètes de toxicité incluant l'évaluation de paramètres biologiques, hématologiques et anatomopathologiques comme dans les études par administrations répétées (« extended single dose study »). Ces études peuvent également s'avérer utiles pour comparer dans des délais brefs des principes actifs sous forme nanoparticulaire et conventionnelle, destinés à être administrés de façon répétée à l'Homme (médicaments anticancéreux). Il en sera de même pour les utilisations locales. Lorsque l'on souhaite évaluer la toxicité aiguë des structures nanoparticulaires, des événements imprévus peuvent parfois être observés, par exemple : diminution de la toxicité lorsque la dose administrée est

augmentée, augmentation de la toxicité quand la taille des particules diminue. Le rôle de la formation des agglomérats et agrégats et l'intervention du système réticulo-endothélial sont probablement en rapport avec ces phénomènes.

3.3 TOXICITÉ PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE

Son évaluation ne peut obéir à des schémas d'étude standard en fonction des différences ayant trait à la structure et à la physico-chimie des particules, aux espèces animales utilisées, aux indications et aux conditions d'administration en thérapeutique, etc. Il sera donc recommandé d'une part de proposer des protocoles au cas par cas, adaptés aux caractéristiques ci-dessus évoquées, se rapprochant le plus possible des conditions d'exposition humaines ; on bannira les protocoles caricaturaux conduisant à des expositions massives des animaux, et en conséquence à des effets indésirables inexploitable. D'autre part on recommandera de s'attacher à l'investigation d'organes ou de systèmes cibles potentiels, en rapport avec le franchissement par les MNP de barrières physiologiques. Parmi les cibles potentielles on relèvera plus particulièrement :

- Le foie et les organes du système réticulo-endothélial (capture),
- Le rein (p. ex : possibilité de développement de lithiase),
- Le système nerveux central : divers mécanismes ont été retenus, et notamment le passage de la barrière hémato-encéphalique, pour évaluer le risque de dégénérescence neuronale. L'hypothèse de l'exposition du cerveau à certains toxiques, suite à un phénomène de translocation, induisant la libération de médiateurs conduisant à des réactions inflammatoires, a été suggérée dans le développement de maladies neurodégénératives.
- Les organes reproducteurs (atteinte potentielle de la fertilité),
- Le système cardio-vasculaire (p. ex : formation d'agrégats),
- Le développement de réactions inflammatoires, qui paraissent représenter un risque majeur pour l'appareil respiratoire, en relation avec la formation d'agglomérats et d'agrégats, en raison de ses conséquences à long terme : cancer (dommages à l'ADN) et fibrose (rôle des cytokines). Par ailleurs, l'inflammation pulmonaire joue un rôle majeur dans les phénomènes de translocation conduisant à l'exposition d'autres organes cibles, notamment le cerveau. Le risque d'induction de macrophages intravasculaires pulmonaires est important car ils vont phagocyter les MNP ou leurs microagrégats après administration par voie intraveineuse. Des perturbations majeures de l'hémodynamique pulmonaire seront alors possibles. Les techniques d'imagerie scintigraphique et ultrasonore sont bien adaptées à l'étude *in vivo* de ces phénomènes, de même que les modèles de rongeurs transgéniques bioluminescents conditionnels pour des études mécanistiques.

Il est évident que l'évaluation de l'exposition systémique lors des études animales, afin de dégager des marges de sécurité par rapport aux expositions humaines reste à explorer.

3.4 TOXICITÉS PARTICULIÈRES

Certaines formes de toxicité peuvent se manifester selon les caractéristiques du MNP ou selon la voie d'administration et il sera hautement recommandé d'y porter la plus grande attention.

3.4.1 IMMUNOTOXICITÉ

La réponse immunitaire à une substance étrangère introduite dans l'organisme peut être globalement divisée en deux compartiments : la réponse adaptative spécifique à l'antigène introduit et la réponse immunitaire innée non spécifique de l'antigène. La structure et les propriétés des MNP suggèrent que ces produits sont capables de modifier ces deux types de réponse. La reconnaissance des MNP par des récepteurs de type « scavenger » situés sur les macrophages et les polynucléaires neutrophiles peut induire la libération de cytokines à l'origine d'une réponse inflammatoire pulmonaire par inhalation. Les MNP ont aussi été associées à la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant être responsables de réponses inflammatoires non-spécifiques. Par ailleurs, la matière sous forme particulaire notamment fine est connue pour posséder des propriétés adjuvantes qui peuvent conduire à une exacerbation ou à une modification du type de réponse immunitaire à un antigène donné (réponse Th₁ versus réponse Th₂). Dans ce cas, il est possible que ce type de réponse conduise à des réactions d'hypersensibilité ou d'allergie. Enfin, il est aussi possible que la captation des MNP ou leur reconnaissance par les cellules dendritiques humaines conduise à une immunosuppression, de même qu'il est possible que les MNP soient capables de modifier les antigènes du soi induisant des manifestations autoimmunes.

En fait, dans ce domaine sensible, l'effet délétère qui est le seul bien identifié est le syndrome CARPA pour C Activation Related Pseudo Allergy, observé chez l'homme lors de l'administration de colloïdes. Il est caractérisé par de la fièvre, des céphalées, une baisse de la pression artérielle pouvant parfois conduire à une issue fatale, et ne peut être actuellement prédit par les tests d'allergie conventionnels. Il semble que tous les NMPs qui ont été jusqu'à présent administrés, soient susceptibles d'induire ce syndrome chez certains patients. Le mécanisme de cet effet est en rapport avec la production des fractions C3a et C5a du complément, induisant une libération massive de cytokines. Présentement, la détection du potentiel de développement d'un syndrome CARPA est directement réalisée par un test d'activation du complément sur le sérum ou le sang des patients. La mise au point des tests prédictifs est en cours. Il faut préciser que la prévention d'un tel risque nécessite des moyens lourds et coûteux (prétraitement, environnement hospitalier, etc.), dont il serait prioritaire de s'affranchir par tous les moyens de prévention possible.

En conséquence, il est donc recommandé de procéder à une évaluation du potentiel immunotoxique des MNP en particulier pour les médicaments administrés par inhalation. Cette évaluation doit faire appel à des méthodes adaptées mais validées. Dans le cas de la détection d'un potentiel immunosuppresseur, la mise en œuvre de la méthodologie développée dans la ligne directrice ICHS8s'applique. Cette méthodologie est basée sur une « weight of evidence approach » prenant en compte les résultats obtenus dans les études de toxicologie par administration répétée au niveau des organes lymphoïdes et des paramètres sanguins, les relations structure-activité en relation avec un effet immunotoxique, l'accumulation éventuelle du produit dans les organes cibles du système immunitaire et la population à traiter. En fonction de l'analyse de ces résultats, un deuxième niveau d'évaluation peut être mis en œuvre basé sur des tests fonctionnels comme la réponse à un antigène T-dépendants. Dans le cas des MNP, la mise en œuvre d'un test fonctionnel mesurant les effets des MNP sur la réponse spécifique à un antigène est fortement recommandée du fait de leur accumulation dans les macrophages ou les cellules dendritiques. L'accumulation des MNP dans les organes lymphoïdes qui peut être

mise en évidence dans les études de biodistribution doit aussi être considérée comme un signal d'alerte.

Concernant les manifestations d'hypersensibilité et dans l'état actuel des choses, c'est la détermination de la sensibilisation dermique par le test du LLNA (local lymph node assay) chez la souris qui a été le plus utilisé pour les produits nanoparticulaires (guideline OCDE 429), par exemple pour les différentes formes de l'oxyde de titane en cosmétologie. Néanmoins, les résultats doivent être interprétés de manière critique en particulier dans le cas des NMP destinés à la voie pulmonaire. Dans les cas des MNP fixées sur une protéine ou un ADN, une attention particulière doit être portée sur la modification de l'immunogénicité des produits associés aux MNP. Le développement de modèles cellulaires sur cellules humaines, dans des conditions définies et après caractérisation physico-chimique du produit, en particulier pour les effets sur les macrophages, les polynucléaires et sur les cellules dendritiques, est vivement à encourager en particulier pour étudier les effets des MNP sur la production de cytokines et de médiateurs du système immunitaire. Sera encouragé également l'évaluation de modalités récentes d'imagerie TEP par des dérivés de la 2'déoxy-cytidine marqués au ¹⁸F pour l'évaluation du système immunitaire et des organes lymphoïdes.

3.4.2 RISQUES LIES A LA FORMATION D'AGGLOMÉRATS

C'est un risque classique, identifié dès l'utilisation des premiers MNP (liposomes). La formation d'agglomérats peut affecter divers territoires dans l'organisme, notamment au niveau des plus petits vaisseaux (microcirculation périphériques, vaisseaux cérébraux, etc.) en provoquant des phénomènes emboliques. Ce potentiel devra être évalué par des techniques appropriées, notamment histologiques.

3.4.3 EFFETS LOCAUX

Les systèmes nanoparticulaires sont susceptibles par des mécanismes directs ou médiés par des voies de signalisation de développer des phénomènes d'irritation et d'inflammation sévères. Ceci devra être recherché pour toutes les voies d'administration, et singulièrement pour les voies locales : peau, œil, et surtout poumon, comme précédemment indiqué. Concernant l'évaluation du potentiel irritant sur la peau et sur l'œil après administration unique chez le lapin, il semble que les guidelines OCDE 404 et 405 puissent être appliqués. Dans le cas des effets locaux sur le poumon, la technique de choix consiste en l'administration intratrachéale chez le rat du produit à étudier, suivie d'un lavage bronchoalvéolaire (évaluation des biomarqueurs de l'inflammation sur le liquide de lavage), d'une évaluation de la prolifération cellulaire et d'un examen histologique. Une telle étude peut être associée à une évaluation de la réversibilité (d'une à quatre semaines par exemple) des phénomènes observés.

Concernant l'administration de MNP par voie IV, l'évaluation du potentiel hémolytique sera effectuée.

3.5 TOXICITÉ SUR LA REPRODUCTION

Rien n'est actuellement publié sur des effets potentiels sur la reproduction, la fertilité et la tératogenité des nanoparticules qui devraient néanmoins être évalués. Par exemple, le passage de la barrière foeto-placentaire rend indispensable l'évaluation de l'embryo-foetotoxicité et du potentiel tératogène. Les protocoles décrits dans les lignes directrices seront donc mis en œuvre mais il est recommandé de les adapter le cas échéant au cas des MNP. Les produits d'imagerie médicale ont montré une maternotoxicité et des effets tératogènes (sans doute dus à l'excès de fer).

3.6 GÉNOTOXICITÉ

3.6.1 MECANISME D'ACTION POTENTIEL

Si la capacité des nanoparticules à traverser les membranes cellulaires est reconnue, les connaissances sont beaucoup plus incertaines en ce qui concerne leurs possibilités d'atteindre le noyau au moment opportun du cycle cellulaire pour interagir directement avec l'ADN. Ceci pourrait notamment se produire au cours de la division cellulaire lorsque l'enveloppe nucléaire disparaît. Ainsi, des effets génotoxiques primaires directs et indirects mais également des effets génotoxiques secondaires seraient susceptibles de survenir :

a) Effets primaires directs : on peut concevoir que :

- Les nanoparticules pénètrent dans le noyau et interagissent directement avec l'ADN
- Les nanoparticules produisent des radicaux libres induisant des lésions de l'ADN
- Les nanoparticules perturbent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose (potentiel aneugène). En effet, du fait de leur gamme de taille nanométrique, il est communément admis que les nanoparticules sont capables d'interagir et éventuellement d'interférer avec des constituants cellulaires de dimension comparable tels que les nucléosomes, les microtubules, les filaments d'actine et les centrosomes. Ainsi, l'interférence avec ces structures peut mener à un dysfonctionnement de la division cellulaire et perturber le trafic cellulaire.

b) Effets primaires indirects : les nanoparticules pourraient entraîner :

- Une déplétion en antioxydants, augmentant soit directement le niveau de lésions oxydatives endogènes de l'ADN soit celui des lésions oxydatives de l'ADN en rapport avec les perturbations de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à l'interruption de la synthèse d'ATP
- Une inhibition de la réparation de l'ADN

c) Effets secondaires

Ces effets seraient principalement liés à l'inflammation, via des composés oxydants provenant notamment de l'endocytose et/ou phagocytose des nanoparticules. En effet, les nanoparticules peuvent entraîner un stress oxydant et des réponses inflammatoires qui peuvent également induire potentiellement des lésions de l'ADN. Les espèces radicalaires formées (en particulier le radical °OH) peuvent également réagir avec les

acides gras polyinsaturés initiant ainsi une peroxydation lipidique. Il en résulte la formation d'aldéhydes capables de produire des adduits à l'ADN.

3.6.2 METHODES D'EVALUATION

3.6.2.1 Généralités

Dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité on insistera de nouveau sur la nécessité de bien connaître la structure et les propriétés de la forme nanoparticulaire dans les excipients et dans les milieux de culture utilisés dans les tests, car son comportement va se trouver modifié. Ces informations peuvent également être nécessaires pour corréliser certains résultats *in vitro* entre eux et extrapoler des résultats obtenus *in vitro* à ceux observés *in vivo*. Si un nanomédicament est destiné à transporter une substance donnée (molécule médicamenteuse, gène...), et si le vecteur et la forme assemblée présentent des propriétés physico-chimiques différentes, les deux formes doivent faire l'objet d'une évaluation du potentiel mutagène sauf si l'on peut démontrer qu'au cours de l'exposition les deux formes seront évaluées.

Il n'existe aujourd'hui aucune raison d'exclure formellement pour les nanomédicaments la batterie de base préconisée pour les médicaments traditionnels. Cependant, compte tenu des connaissances concernant les principaux mécanismes impliqués dans les effets génotoxiques de certaines nanoparticules, certains modèles de cette batterie, comme les tests sur bactéries, apparaissent comme ayant un poids plus faible que d'autres types de tests.

Dans le cas des tests *in vitro*, le type cellulaire utilisé devrait être, à chaque fois que cela est possible, représentatif de l'organe cible *in vivo* en termes de toxicité et/ou d'organe le plus exposé (organes primo-exposés et/ou organes exposés après translocation) qui sera défini en fonction de l'état des connaissances sur la voie d'exposition, les niveaux d'absorption et le niveau de translocation (études de pharmac/toxicocinétique).

L'utilisation de modèles spécifiques tels que des modèles de peaux humaines reconstituées, de cellules intestinales, de cellules pulmonaires ou de cocultures (par exemple cellules pulmonaires + polynucléaires neutrophiles...) peuvent dans certains cas être envisagés afin de disposer de modèles plus proches des conditions humaines d'exposition.

En cas d'utilisation d'une lignée primaire ou d'une lignée continue de cellules de mammifères, un certain nombre d'informations concernant l'expression phénotypique de celle-ci doit être documenté, en particulier son statut p53 et sa capacité à prendre en charge les formes réactives de l'oxygène (SOD, GSH/GSR, GST, GPX...). Par ailleurs les flux intra- et extra-cellulaires des structures nanoparticulaires étant fonction de la capacité d'endocytose et d'exocytose de la cellule, ces capacités doivent être documentées pour toutes les lignées cellulaires mises en œuvre.

3.6.2.2. Tests *in vitro*

Comme pour un médicament traditionnel, il est nécessaire d'avoir recours à une batterie de tests mesurant différents événements génétiques permettant de couvrir le spectre de génotoxicité le plus large possible afin de garantir la sécurité d'un médicament sous forme nanoparticulaire. A l'heure actuelle, il n'existe aucun consensus quant aux méthodologies requises pour mener au mieux cette caractérisation. Cette recommandation a pour but d'analyser de façon synthétique la situation et de proposer une approche révisable.

3.6.2.2.1 Tests de mutations géniques

Concernant les tests de mutations géniques, les essais sur bactéries ne permettent pas d'assurer qu'il existe une exposition de l'ADN bactérien du fait de l'absence de démonstration à ce jour de la capacité de pénétration des parois et des membranes bactériennes. Par ailleurs, certains des mécanismes d'action génotoxiques des nanoparticules sont dus à une interaction avec les mitochondries alors que ce type de mécanisme ne peut pas être démontré sur bactéries. Ces modèles peuvent toutefois être utiles pour mettre en évidence des effets mutagènes provenant d'impuretés, de produits de relargage et/ou de dégradation. Pour les tests de mutations géniques sur cellules de mammifères, les cellules L5178Y, CHO et V79 habituellement utilisées pour l'étude de ce type d'effet sont toutes déficientes en expression phénotypique de la protéine p53 et sont pour certaines déficientes en expression de certaines enzymes de détoxification des formes radicalaires. Ces déficiences risquent de rendre difficile l'interprétation des résultats obtenus sur ces modèles cellulaires. D'une façon générale, l'origine non humaine de ces types cellulaires pourrait également favoriser des résultats non spécifiques et non extrapolables à des lignées humaines. Ces systèmes d'essai *in vitro* sur cellules de mammifères font régulièrement l'objet de questionnements quant au nombre élevé de résultats positifs (par rapport à la cancérogenèse chez les rongeurs) et leur pertinence est ainsi discutée y compris dans le cadre de l'évaluation de molécules parfaitement définies. Ainsi, il ne semble pas exister à ce jour de modèle validé susceptible de mettre en évidence l'induction de mutations géniques sur cellules de mammifères par des nanoparticules.

3.6.2.2.2 Tests de mutations chromosomiques

Concernant les tests de mutations chromosomiques, il a été démontré que certaines nanoparticules sont capables de présenter à la fois des effets clastogènes et aneugènes. Le test *in vitro* du micronoyau apparaît comme étant bien adapté pour mettre en évidence ces deux types d'effets. Pour les raisons abordées précédemment, on privilégiera pour ce test, l'utilisation de cellules humaines en culture primaire comme par exemple les lymphocytes humains. Lorsque cela est justifié (voie d'exposition, organe exposé,...), des cellules humaines spécifiques d'un autre organe peuvent être utilisées. Certains protocoles utilisent la cytochalasine B pour permettre d'identifier les cellules en division. La cytochalasine B agit en inhibant la polymérisation de l'actine qui est impliquée dans certaines étapes de l'endocytose. Dans ces conditions, l'utilisation de la cytochalasine B doit se faire dans des conditions ne perturbant pas l'endocytose et/ou l'exocytose propres des nanoparticules par exemple quelques heures après le début du traitement ou pendant la phase de reculture après le traitement.

3.6.2.2.3 Tests d'altération primaire de l'ADN

Dans la mesure où aucun test de mutation génique n'apparaît comme étant recommandable, un test *in vitro* d'altération primaire de l'ADN peut être une source d'information utile pour une prise de décision d'évaluation du risque génotoxique, en particulier pour la décision de la conduite de tests *in vivo*. Pour la mise en évidence *in vitro* de lésions primaires de l'ADN, le test des comètes apparaît comme étant bien adapté à condition de bien estimer les niveaux de cytotoxicité en mettant en œuvre une estimation pertinente (en particulier en s'affranchissant des événements d'apoptose et de nécrose). Par exemple, il peut s'avérer utile d'évaluer la cytotoxicité après une période correspondant à au moins un cycle de division cellulaire afin de s'assurer que les effets éventuels génotoxiques ne surviennent pas à des niveaux de concentrations létales ce qui présente peu d'intérêt en termes d'évaluation des risques.

Par ailleurs, une partie importante des effets génotoxiques des nanoparticules étant susceptible d'être en rapport avec la production de formes activées de l'oxygène, il apparaît nécessaire de compléter le protocole traditionnel en utilisant des enzymes permettant de mettre en évidence les lésions oxydatives de l'ADN comme par exemple en traitant les cellules par la protéine fpg ou la protéine hOGG1.

Dans tous les cas, le choix des doses doit être réalisé en prenant soin de ne pas entraîner des effets non représentatifs d'une exposition humaine réaliste. Le stress oxydant qui joue un rôle-clé dans les effets génotoxiques induits par les nanoparticules étant en partie relié aux propriétés de surface, il apparaît préférable, en particulier pour les cellules cultivées en monocouches, d'exprimer le niveau de doses étudiées par unité de surface (eg : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) plutôt qu'en concentration massique.

Des informations sur l'induction d'une réponse inflammatoire ($\text{TNF}\alpha$, IL6 ...) induite par les nanoparticules en particulier pour le choix des doses et pour discuter les résultats peuvent s'avérer être utiles afin de pouvoir extrapoler des niveaux de doses étudiées au niveau d'exposition chez l'Homme et démontrer la spécificité de l'éventuel effet génotoxique.

3.6.2.3. Tests *in vivo*

Lorsque des tests *in vivo* doivent être mis en œuvre, on devra utiliser des voies et des conditions d'exposition reflétant les conditions cliniques en termes de niveaux d'exposition, de rythmes d'administration et de cytotoxicité, mais également de niveau d'induction de phénomènes inflammatoires. En particulier le recrutement de cellules impliquées dans l'inflammation telles que les macrophages et les polynucléaires neutrophiles qui peuvent par la production de formes radicalaires ou par interférence avec les mécanismes de réparation, avoir leurs effets propres devra être rigoureusement pris en compte.

En fonction du type d'application thérapeutique (en particulier la voie d'administration), des données de pharmac/toxicocinétique et des résultats obtenus dans les tests *in vitro*, le test du micronucleus *in vivo* et/ou le test des comètes *in vivo* sur un (ou des) organe(s) correctement exposé(s) sont recommandés et seront réalisés chez le rongeur.

Il est préférable, à chaque fois que cela est pratiquement et scientifiquement pertinent de réaliser ces tests soit sur les mêmes animaux soit sur les animaux des études de toxicité réitérée à court terme.

3.6.3. STRATEGIE D'ETUDE DU POTENTIEL GENOTOXIQUE

La batterie de base pour la détermination du potentiel génotoxique d'un MNP doit comporter au moins un test *in vitro* du micronucleus, un test *in vitro* des comètes sur cellules en culture et un test *in vivo*.

a) Si les tests du micronucleus et des comètes *in vitro* sont négatifs, le test du micronucleus *in vivo* sur l'organe le plus pertinent principalement en termes d'exposition (par exemple la moelle osseuse, le colon, les lymphocytes circulants...) doit être réalisé afin de mettre en évidence d'éventuels effets secondaires sur l'ADN ne survenant qu'*in vivo*.

b) Si le test des comètes *in vitro* est positif, un test *in vivo* des comètes doit également être réalisé sur l'organe cible et/ou l'organe le plus exposé sauf si l'on peut clairement démontrer qu'il s'agit d'effets primaires indirects sur l'ADN qui ne surviennent pas *in vivo* dans les conditions thérapeutiques.

c) Si le test du micronucleus *in vitro* est positif ou si les 2 tests *in vitro* sont positifs, un test *in vivo* du micronucleus sur l'organe le plus pertinent et un test *in vivo* des comètes sur l'organe cible et/ou l'organe le plus exposé doivent être réalisés. Dans ce cas. Il est fortement recommandé de combiner les 2 tests chez les mêmes animaux.

Pour la prise de décision finale relative au potentiel génotoxique d'un MNP, le poids de l'évidence sera établi en s'appuyant sur le mode d'action aux doses ayant démontré un effet génotoxique. On prendra alors en compte de façon globale toutes les données complémentaires disponibles et pertinentes ayant servi à démontrer ce mode d'action.

3.7 POTENTIEL CANCÉROGÈNE

L'évaluation du potentiel cancérigène expérimental des MNP est actuellement un débat ouvert :

- D'une part, il n'est pas contestable qu'en raison de leur structure, des dommages potentiels qu'ils peuvent causer à l'ADN, des processus inflammatoires qu'ils développent et leur bioaccumulation, les MNP sont susceptibles d'induire des processus tumoraux, notamment au niveau pulmonaire.
- D'autre part, les protocoles préconisés par les lignes directrices sont lourds, longs, mal adaptés à l'exposition à des nanoparticules (métrologie, contrôle d'exposition, etc.). De plus, les utilisations actuelles (administration unique en imagerie médicale, vectorisation de médicaments anticancéreux) ne se prêtent pas à des études de cancérogenèse.

En conséquence, l'évaluation du potentiel cancérigène d'un MNP ne sera justifiée qu'après une réflexion approfondie sur le danger potentiel et l'évaluation du risque, afin de ne pas tirer des conclusions hâtives et inadéquates. Dans l'état actuel des connaissances et malgré les difficultés que l'on rencontrera de façon inévitable, il apparaît que les protocoles conventionnels d'études de deux ans sur rongeurs sont acceptables par les Agences en charge de l'évaluation des médicaments. La démonstration de la constance des caractéristiques du produit administré sera

certainement exigée, notamment pour les études par inhalation. L'évaluation de l'exposition ne paraît pouvoir concerner que le principe actif vectorisé, éventuellement comparée avec celle obtenue avec le principe actif non vectorisé lorsque cela est réalisable. Il est recommandé de réfléchir à des adaptations des protocoles actuels : par exemple études plus courtes, études avec un nombre limité d'administration, utilisation de souris transgéniques, etc. Il est aussi évident que, dans ce contexte, une évaluation particulièrement pertinente du potentiel génotoxique sera d'une aide précieuse dans l'évaluation du risque.

D CONCLUSION

Les recommandations émises dans ce document sont basées sur le concept suivant : l'évaluation de la sécurité des MNP, en raison de considérations scientifiques et pratiques telles que la nécessité d'être immédiatement opérationnelles, ne doit pas s'écarter de la stratégie conventionnelle de l'évaluation de la sécurité des médicaments. Elle doit néanmoins adapter ses méthodes lorsque nécessaire et exprimer leurs résultats en fonction des particularités de la structure nanoparticulaire.

Néanmoins, une vision à beaucoup plus long terme ne saurait être exclue et il sera recommandé également de suivre la conclusion du document « Nanotechnology - A Report of the US FDA Nanotechnology Task Force » du 25 juillet 2007, qui propose sur le long terme les objectifs suivants à la FDA :

- Évaluer le caractère adéquat des méthodes d'évaluation de la sécurité, de l'efficacité et de la qualité des produits sous forme nanoparticulaire,
- Promouvoir et participer au développement de nouvelles méthodes de caractérisation et de nouveaux standards pour les produits sous forme nanoparticulaire,
- Promouvoir et participer au développement de modèles permettant d'évaluer le comportement et le devenir *in vitro* et *in vivo* des produits sous forme nanoparticulaire.

Cet objectif ambitieux pourrait être confié au sein de l'Afssaps à une « Task Force » associant des scientifiques académiques, des membres de l'autorité réglementaire et de façon incontournable des industriels familiers du terrain.

N.B. : Ce document n'est pas destiné à formuler des recommandations pour l'évaluation de la toxicité environnementale.