

Nanomatériaux dans les médicaments et les dispositifs médicaux

SYNTHESE

CONTEXTE

L'article 60 de la loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 de modernisation de notre système de santé prévoit que, dans un délai de 18 mois après promulgation de la loi, le Gouvernement remet au Parlement un rapport sur les nanomatériaux dans les médicaments et les dispositifs médicaux.

Ainsi, par note en date du 18 mars 2016, la Direction Générale de la Santé a saisi l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) afin d'établir un état des lieux des nanomatériaux utilisés dans les produits de santé en précisant leurs mécanismes d'action et d'évaluer les enjeux en termes de santé publique (bénéfices et risques) et d'évaluation sanitaire (efficacité et sécurité) de ces formes.

UTILISATION

D'une manière générale on peut définir le terme nanomédecine comme étant l'application médicale des nanotechnologies aussi bien dans l'utilisation de nanoparticules comme agent thérapeutique mais aussi dans l'imagerie médicale (scintigraphie, Imagerie par résonance magnétique (IRM), tomographie par émission de positons (TEP) etc.), le diagnostic, la théranostique (diagnostic combiné avec effet thérapeutique) et la constitution de dispositifs médicaux. Différentes plateformes de nano-objets ont été recensées telles que les polymères-principe actif conjugués, les liposomes, les dendrimères, les micelles, les nanocristaux, les SLN-NLC (particules solides lipidiques), les nanotubes de carbone, les nanosilices, les nanogels, les particules métalliques etc.

Actuellement, les trois quarts de toutes les activités de recherche portent sur la distribution ciblée et la libération précise d'agents pharmaceutiques sur un emplacement souhaité dans le corps humain, cellules spécifiques et certains organes. Ces travaux permettent d'ouvrir des possibilités infinies dans le traitement de pathologies telles que le cancer¹, les maladies du système nerveux central ou encore le virus du sida.

Un autre aspect prometteur de la nanomédecine est la plus grande biodisponibilité des produits pharmaceutiques formulés à l'échelle nanométrique. Le corps peut alors absorber le composé plus rapidement, plus facilement et peut donc l'utiliser plus efficacement. L'avantage de ces systèmes de distribution ciblée est d'éviter les mécanismes de défense du corps, améliorant ainsi l'administration et l'efficacité d'un médicament.

¹ 70% des produits nanoparticulaires sont utilisés pour l'oncologie durant les essais cliniques de phase 1.

Cependant, il est possible de noter que l'exposition de la population aux nanoparticules, si elle demeure méconnue, n'est pas si récente. Des preuves ont ainsi démontré qu'une formulation d'oxyde de fer nanoparticulaire pour administration intraveineuse, utilisée depuis les années 1960, a été classée par erreur comme une solution d'oxyde de fer.

Officiellement, le premier nanomédicament approuvé par la FDA était le Doxil® (1995), une formulation liposomale PEGylée chargée de doxorubicine pour le traitement du cancer. Vingt ans après son approbation, ce médicament continue d'être largement utilisé et constitue le modèle des «nanodrugs» injectables et des systèmes de « drug-delivery » de médicaments. En Europe, la première nanomédecine approuvée était Ambisome® (1990), un produit basé sur des liposomes chargés d'Amphotéricine B pour traiter les infections fongiques systémiques.

Concernant les dispositifs médicaux, il existe une extrême diversité de formes de dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux. Le recensement exhaustif de ces dispositifs avec les outils actuels de surveillance du marché des autorités de contrôle reste difficile. La réglementation actuelle permet de classer les dispositifs médicaux en fonction de leur interaction avec le corps humain :

- ✓ les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux en contact avec une surface. Il s'agit notamment de dispositifs en contact avec la peau, les muqueuses. A titre d'exemple on trouve sur le marché des pansements incorporant des nanoparticules d'argent utilisées comme agent antibactérien pour en augmenter l'efficacité.
- ✓ les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux en contact avec la circulation sanguine, les tissus, l'os ou la dentine, mais communiquant avec l'extérieur. Dans cette catégorie, on retrouve par exemple des dispositifs utilisés en dentisterie. La forme nanoparticulaire permet d'améliorer les propriétés mécaniques et l'adhésion des composites.
- ✓ les nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux implantables (os, tissu, sang) et les nanomatériaux utilisés dans le traitement des cancers par injection de nanoparticules dans la tumeur comme support d'une radiothérapie ciblée.

Au sein de cette classification, on peut distinguer d'une part les dispositifs médicaux nanostructurés et les dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux ou des nanoparticules.

EVALUATION DES RISQUES

Pour mettre un nouveau médicament ou un dispositif médical sur le marché, l'évaluation du risque repose sur les résultats d'études non-cliniques (études sur des modèles cellulaires et chez l'animal), des essais cliniques (études chez l'Homme). Après sa mise sur le marché, l'évaluation du risque liée à son utilisation repose sur l'analyse de signalements de pharmacovigilance et de matériovigilance ou d'études

pharmaco-épidémiologiques S'agissant du médicament l'ensemble du programme de surveillance est décrit dans un document de risque de gestion des risques.

Les performances des produits manufacturés sous forme nano proviennent essentiellement de leur spécificité de taille et de leur interaction avec le milieu environnant. Une méthodologie spécifique sera d'autant plus nécessaire pour évaluer les paramètres physico-chimiques ayant non seulement un impact sur leur efficacité et aussi sur leur toxicité potentielle.

La norme ISO/TR 1304-2012 « Nanotechnologies—Directives relatives à la caractérisation physico-chimique des nano-objets soumis aux essais toxicologiques » et selon le SCENIHR (2015) « Guidance on the dermination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices », définit les paramètres à considérer. Pour les dispositifs médicaux, le risque potentiel est principalement associé à la libération de nanoparticules conjuguée à la durée de l'exposition. Elle peut être due :

- ✓ Au mode d'action recherché (par exemple libération de médicament sous forme nanoparticulaire),
- ✓ À l'usure mécanique ou chimique engendrée par le processus de dégradation, de frottement du dispositif avec les tissus,
- ✓ À la libération de nanomatériaux de dispositifs médicaux ne contenant pas à la base de matériaux sous forme nanoparticulaire.

Il existe également des risques spécifiques liés à l'échelle nanométrique des nanomatériaux. Plusieurs études rapportées dans la littérature scientifique ont montré que le degré de toxicité dépendait de la taille des particules et des caractéristiques spécifiques de l'objet. Un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certaines nanoparticules sont impliquées dans la toxicité de systèmes biologiques, causant une cytotoxicité, une réponse allergique ou une inflammation. En outre, les nanoparticules ont tendance à produire des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des radicaux libres, ce qui entraîne un stress oxydatif, des événements inflammatoires, des atteintes au niveau de l'ADN, et fibroses. Il est par exemple possible d'évoquer l'effet de type fibres d'amiante², suspecté pour les nanotubes de carbone après inhalation, ceci étant lié à la forme de la nanoparticule.

Les nano-objets peuvent aussi agir avec les composants du sang. La norme ISO 10993-4 concernant les dispositifs médicaux établit une liste des points à examiner pour évaluer les interactions des dispositifs médicaux qui concernent la thrombose, la coagulation, l'activation plaquettaire etc. Si les nano-objets sont conçus pour interagir spécifiquement avec les cellules et les facteurs de coagulation, leur effet permettra le

² Effet de type fibre d'amiante se caractérise par un mécanisme de phagocytose incomplet. Les macrophages ne pouvant pas dégrader les fibres qui sont plus grande que leur taille, il en résulte des anomalies mitotiques (segmentation des chromosomes) à l'origine d'une multinucléation des macrophages provoquant une fibrose

traitement de certains troubles de la coagulation. Si, en revanche, ils induisent des altérations indésirables dans le fonctionnement de ces cellules et protéines, ils peuvent alors causer des toxicités graves.

Enfin, les nano-objets sont soupçonnés de stimuler davantage le système immunitaire, conduisant à un syndrome appelé « hypersensibilité avec atteinte de plusieurs organes ». Il est possible de citer des symptômes d'hypertension, hypotension, tachycardie, mais aussi de détresse respiratoire, d'anxiété, de panique, confusion, douleurs dorsales etc. L'hypersensibilité est une réponse anormale et excessive vis-à-vis d'une substance étrangère. Il existe également des réactions pseudo-allergiques (allergies non-IgE dépendantes) associées à une activation du système du complément (« C activation-related pseudoallergy » ou « CARPA » en anglais). Dans certains cas extrêmes, le dérèglement du système immunitaire engendré par le syndrome CARPA peut aboutir à la survenue du décès.

UNE REGLEMENTATION A FAIRE EVOLUER

Un nombre important de nanomédicaments a été approuvé par les agences européenne et française du médicament et produits de santé au cours des dernières décennies, sur la base de la réglementation et des recommandations en vigueur. L'évolution des connaissances scientifiques sur les risques liés aux nanotechnologies doit conduire les législateurs et les autorités compétentes à faire évoluer cet encadrement. Des protocoles spécifiques doivent permettre la caractérisation du développement préclinique de ces produits pour une meilleure maîtrise de leur impact potentiel en pratique clinique. Bien que des réflexions soient en cours dans différents forums réglementaires internationaux, il n'existe pas aujourd'hui de réglementation propre aux nano-objets médicaux aux Etats-Unis (Food and Drug Administration (FDA)), au niveau européen (European Medicines Agency (EMA)) ou français. Pour aller plus loin, en 2011, le Comité scientifique pour les médicaments à usage humain (CHMP Committee for Medicinal Products for Human use) de l'Agence Européenne du Médicament a chargé un groupe d'experts Européen de travailler sur des documents de réflexion dans le domaine de la réglementation des nanomédecines au niveau de l'Union européenne.

S'agissant de la définition qualitative d'un nano-objet ou nano-matériau il existe au niveau européen, une recommandation de 2011 publiée au journal officiel de l'Union Européenne³ qui définit un nanomatériau comme :

- ✓ un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé,
- ✓ contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat,
- ✓ dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

³ <http://data.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj>

Néanmoins se limiter au seuil des 100 nm pour considérer une particule comme étant nanométrique peut ne pas permettre de s'assurer d'une bonne traçabilité des produits existants et encadrer leur sécurité. La FDA indique par exemple que « Les matériaux ou les produits finis peuvent également présenter des propriétés attribuables à une ou plusieurs dimensions en dehors de l'échelle nanométrique d'environ 1 nm à 100 nm qui sont pertinentes pour les évaluations de la sécurité, de l'efficacité, du rendement, de la qualité, de l'impact sur la santé publique ou du statut réglementaire des produits ».

Concernant l'évaluation scientifique et réglementaire de ces nanoparticules, selon l'EMA, l'approche actuelle de ses Comités scientifiques reste adéquate pour en faire l'évaluation.

L'attention des autorités européennes et américaines s'est portée plus particulièrement sur l'harmonisation de la méthodologie, indispensable pour définir les exigences de qualité. En 2015, le Forum international sur la réglementation pharmaceutique (IPRF) a créé un groupe international d'experts en nanomédecine, soutenu par de nombreuses autorités régionales au niveau international.

Au niveau français, l'ANSM participe à différents groupes de travail concernant les nanoparticules. Elle a été pionnière dans l'élaboration de la méthodologie à appliquer pour évaluer en pré-clinique la sécurité des médicaments nanoparticulaires.

Pour ce qui concerne les dispositifs médicaux, leur mise sur le marché dans les Etats membres de l'Union européenne est régie par la directive européenne 93/42/CEE. Celle-ci ne définit pas le terme « nanomatériaux » et ne comporte pas d'exigence spécifique sur ce sujet. Elle sera remplacée par le règlement (UE) 2017/745 applicable à partir de 2020. Ce dernier prend en compte la notion de nanomatériaux. Il y est défini comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégats ou d'agglomérats, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Il précise certaines exigences générales en matière de sécurité et de performance spécifiques aux nanomatériaux au point 10.6. En outre, il propose de nouvelles règles particulières relatives à la classification des dispositifs médicaux, qui relèvent :

- ✓ de la classe III s'ils présentent un potentiel d'exposition interne moyen ou élevé;
- ✓ de la classe IIb s'ils présentent un faible potentiel d'exposition interne;
- ✓ de la classe IIa s'ils présentent un potentiel d'exposition interne négligeable.

Enfin, le SCENIHR a établi en 2015 un document guide concernant notamment l'évaluation du risque des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux.

RECOMMANDATIONS :

Les recommandations de l'ANSM partent du postulat que l'évaluation de la sécurité des nanomédicaments ne diffère pas structurellement de la stratégie conventionnelle d'évaluation de la sécurité des médicaments.

Elle doit néanmoins adapter sa stratégie développement non-clinique aux propriétés idoines des structures nanoparticulaires.

L'enjeu prioritaire apparaît être la définition de lignes directrices communes aux autorités et aux demandeurs pour assurer la sécurité des produits pouvant devenir des «génériques». On parlera alors de produit nanosimilaire. Aussi, la FDA et l'EMA reconnaissent que les nanosimilaires nécessitent des évaluations au cas par cas, en raison de la complexité du produit et de la sécurité des nanomédicaments « copie » d'un princeps qui peut être différente des médicaments génériques traditionnels.

S'agissant des dispositifs médicaux, le manque de recul ne permet pas de juger pleinement d'un bénéfice accru de l'apport des nanomatériaux au regard des risques potentiels. Aussi, à la lumière des connaissances actuelles, une approche au cas par cas est nécessaire pour l'évaluation de leurs risques. Le SCENIHR a proposé en 2015 un document guide concernant une démarche d'évaluation du risque des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, mais qui se révèle peu exploitable et mériterait des explications complémentaires sur son articulation avec la norme ISO 10993-1. Il existe donc un fort besoin de normalisation internationale des méthodes d'évaluation concrètes du risque potentiel des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux. S'agissant de la nomenclature internationale des dispositifs médicaux GMDN (Global Medical Device Nomenclature), aucun dispositif médical sous forme nanoparticulaire ou comportant des nanomatériaux n'est identifié. L'ANSM considère qu'il est nécessaire d'y apporter des précisions en y ajoutant chaque type de dispositif médical avec des nanomatériaux.

Au niveau national, un dispositif de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire (R-NANO) est entré en vigueur depuis le 1^{er} janvier 2013. Ce dispositif permet de déclarer les substances à l'état nanoparticulaire, produites, importées, distribuées ou formulées, et ce, conformément aux articles L.523-1 à L.523-5 du Code de l'environnement. Les modalités de déclaration dans la base R-Nano devraient évoluer permettant d'identifier beaucoup plus précisément les médicaments et dispositifs médicaux. Il serait par conséquent souhaitable:

- ✓ de demander au déclarant de différencier, substance et produit fini,
- ✓ de ne pas limiter la taille maximale à 100 nm,
- ✓ d'inclure les codes correspondant aux codes utilisés pour une substance dans les essais cliniques.

Enfin, le règlement (UE) n° 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux adopté le 05 avril 2017 prévoit un étiquetage qualitatif et quantitatif des composants principaux. Plusieurs dispositions, à l'annexe I du présent règlement, visent notamment à diminuer les risques liés à la présence de certaines substances ou particules lors de la conception ou la fabrication des dispositifs médicaux. En outre, des conditions particulières d'étiquetage sont également prévues (annexe I. 10.4.1). En complément, l'ANSM recommande à la commission européenne de les compléter afin de pouvoir identifier sur l'étiquetage, les nanomatériaux utilisés dans tous les types de dispositifs médicaux, en lien avec les orientations du comité scientifique auquel elle a donné mandat.

SOMMAIRE

SYNTHESE	2
1 Contexte	11
2 Les nanotechnologies au service de l'innovation	11
2.1 Le médicament	11
2.1.1 Nanoparticules et médicament	12
2.1.2 Secteurs d'utilisation, produits en développement et sur le marché	39
2.2 Les dispositifs médicaux	60
2.2.1 Identification de dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux	60
2.2.2 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs au contact avec une surface	62
2.2.3 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs communiquant avec l'extérieur	70
2.2.4 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs implantables	72
3 De nouveaux risques sont-ils à prendre en compte ?	96
3.1 Le médicament	96
3.1.1 Evaluation du risque d'un médicament	97
3.1.2 Exemples d'interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques	101
3.2 Les dispositifs médicaux	111
4 Une réglementation à construire	114
4.1 Le médicament	114
4.2 Les dispositifs médicaux	137
4.2.1 Au niveau européen	137
4.2.2 Au niveau national	168
4.2.3 Conclusion sur les pistes d'amélioration	179
5 Bibliographie	182

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Exemples de substances actives associées à des polymères</i>	19
<i>Tableau 2 : Exemples de médicaments composés de nanocristaux ayant eu une AMM aux USA (certains ont une AMM en France et en Europe)</i>	25
<i>Tableau 3 : Exemples de lipides communément utilisés dans les formulations de SLN et NLC</i>	28
<i>Tableau 4 : Exemples de tensioactifs communément utilisés dans les formulations de SLN et NLC</i>	29
<i>Tableau 5 : Utilisation des nanotubes de carbone comme vecteur de substance active</i>	32
<i>Tableau 6 : Nanoparticules magnétiques utilisées comme vecteurs</i>	34
<i>Tableau 7 : Exemples d'agents de contraste utilisés en IRM et tomographie</i>	50
<i>Tableau 8 : Liste non-exhaustive de nanomédicaments ayant eu une AMM</i>	55
<i>Tableau 9 : Déclaration du SNITEM concernant les nanomatériaux utilisés de façon volontaires dans la conception de dispositifs médicaux.</i>	60
<i>Tableau 10: Exemples de dispositifs médicaux avec des nanomatériaux déclarés à l'ANSM (extraction de la liste des communications des DM IIa, IIb, III, DMIA d'Avril 2017, publiée sur le site de l'ANSM)</i>	62
<i>Tableau 11: Classification de l'exposition humaine potentielle au nano-argent, selon le SCENIHR 2014</i>	66
<i>Tableau 12: Exemples de dispositifs médicaux cardiovasculaires coatés avec des nanoparticules</i>	86
<i>Tableau 13: Avantages des dispositifs médicaux implantables cardiovasculaires coatés avec des nanoparticules et nanostructurés</i>	89
<i>Tableau 14: Stents recouverts de nanoparticules à élution de gènes</i>	90
<i>Tableau 15 : Liste non-exhaustive de différents produits commercialisés ayant conduit à des réactions d'hypersensibilité après perfusion.</i>	107
<i>Tableau 16: Paramètres pour la caractérisation et l'identification des nanomatériaux pour une utilisation prévue dans les dispositifs médicaux (selon le SCENIHR 2015)</i>	142
<i>Tableau 17: Exemples de méthodes pour la détermination de la taille (d'après le SCENHIR 2015)</i>	145
<i>Tableau 18: Une estimation de l'exposition potentielle externe et interne comme point de départ pour une évaluation des risques pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, selon le SCENIHR (2015)</i>	147
<i>Tableau 19: Cadre pour des tests spécifiques de toxicité des nanomatériaux en fonction de la libération potentielle, selon le SCENIHR (2015)</i>	155
<i>Tableau 20: Cadre pour l'évaluation des risques des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux, selon le SCENIHR (2015)</i>	167

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Echelles de taille des nanovecteurs</i>	13
<i>Figure 2 : Les différentes générations de nanovecteurs</i>	15
<i>Figure 3 : Différentes nanoparticules utilisées</i>	19
<i>Figure 4 : Différentes stratégies de synthèse de dendrimères</i>	22
<i>Figure 5 : Comparaison entre micelles, liposomes, nanoémulsions et nanoparticules lipidiques solides.</i>	28
<i>Figure 6 : Répartition de l'utilisation de nanomédicaments selon les gammes thérapeutiques et la phase clinique</i>	40
<i>Figure 7 : Nanosystème et théranostique</i>	53
<i>Figure 8 : Interactions indésirables possibles entre une nanoparticule et le système de coagulation</i>	102
<i>Figure 9: Evaluation du risque des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux invasifs, selon le SCENIHR (2015)</i>	140
<i>Figure 10: Proposition d'évaluation du risque des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux suite à la lecture critique de l'avis du SCENIHR (2015) par l'ANSM</i>	180

1 Contexte

L'essor des nanotechnologies constitue un enjeu majeur d'innovation dans le domaine de la santé. De nombreux médicaments et dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux ont été mis sur le marché ces dernières années. Ces nouvelles applications innovantes reposent sur les propriétés particulières des matériaux ou substances sous forme nano, souvent différentes de celles de ces mêmes matériaux ou substances sous forme nano. Cependant, ces propriétés particulières peuvent présenter des risques nouveaux.

Une meilleure connaissance de l'utilisation des nanomatériaux dans les produits de santé s'avère nécessaire autant pour identifier leurs bénéfices en termes de santé qu'à des fins d'évaluation des risques sanitaires.

L'article 60 de la loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 de modernisation de notre système de santé prévoit que, dans un délai de 18 mois après promulgation de la loi, le Gouvernement remet au Parlement un rapport sur les nanomatériaux dans les médicaments et les dispositifs médicaux.

Ainsi, par note en date du 18 mars 2016, la Direction Générale de la Santé a saisi l'Ansm afin d'établir un état des lieux des nanomatériaux dans les produits de santé en précisant leurs mécanismes d'action et d'évaluer les enjeux en terme santé publique (bénéfices et risques) et d'évaluation sanitaire (efficacité et sécurité) de ces formes

2 Les nanotechnologies au service de l'innovation

2.1 Le médicament

Au cours des trois dernières décennies, la croissance des nanotechnologies a ouvert de nouvelles perspectives dans les sciences médicales, en particulier dans le domaine de la « drug delivery » (méthode ou procédé d'administration d'un composé pharmaceutique pour obtenir un effet thérapeutique chez l'Homme ou les animaux) de médicaments. La biotechnologie a également produit de nombreux médicaments plus sélectifs et efficaces, mais bon nombre de ces médicaments rencontrent des difficultés à atteindre leurs cibles biologiques. Les nanoparticules peuvent être utilisées pour l'administration de médicaments spécifiques sur un site sélectionné. Dans cette stratégie, la dose de médicaments utilisée et les effets secondaires (pouvant être associés) se trouvent ainsi diminués de manière significative car l'agent actif est libéré exclusivement dans la région à traiter. Les nanomédicaments utilisés pour la « drug delivery » d'une substance active (SA), sont constitués de nanostructures qui peuvent alors améliorer la biodisponibilité de la SA. Historiquement, l'application thérapeutique la plus ancienne est le traitement du cancer.

Les principaux enjeux de développement des médicaments sous forme nano objet sont :

- ✓ de mieux diagnostiquer, par le développement de médicament de diagnostic plus efficace. Les médicaments de contraste nanoparticulaire permettant d'augmenter la résolution des images médicales (IRM, échographie, ...). Passer à l'échelle nanométrique permet d'entrer dans la cellule et donc d'identifier des cibles non atteignables jusqu'à présent. Ainsi dans les tissus tumoraux, il est possible d'obtenir une meilleure discrimination entre cellules saines et tumorales. En augmentant les seuils de sensibilité et de spécificité on permet ainsi un diagnostic plus fiable et plus précoce de la maladie pour une prise en charge plus rapide et efficace. Cette augmentation de la discrimination liée aux nanomédicaments permet de mieux délimiter les zones à traiter par exemple lors d'acte chirurgical. Il existe déjà sur le marché quelques médicaments de diagnostic sous forme nanoparticulaire (Endorem®, Feridex®, Resovist®).
- ✓ de mieux traiter, en augmentant l'efficacité des substances actives en les enveloppant dans des nano-objets. Cela permet d'apporter, d'une manière spécifique, la SA dans les tissus à traiter en évitant ainsi les effets indésirables de la substance active sur le reste de l'organisme : c'est le principe de la vectorisation. Cette vectorisation permet, du fait de la taille nanométrique, de passer les barrières physiologiques en intégrant, à la surface extérieure des nanocapsules, des ligands capables d'être reconnus spécifiquement par les cellules à traiter. On diminue ainsi fortement les doses nécessaires à l'efficacité, et par conséquent réduit la toxicité associée au principe actif.

2.1.1 Nanoparticules et médicament

2.1.1.1 Pourquoi vectoriser ?

Les qualités requises pour un nanovecteur sont les suivantes :

- ✓ Se diriger vers une cible précise ;
- ✓ Protéger le « traitement » lors du trajet ;
- ✓ Libération contrôlée et activation de la « réponse » de la substance active.

Les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des médicaments peuvent être améliorées par une conception appropriée des systèmes d'administration de médicaments, en utilisant des nanoparticules (*cf. Figure 1*).

Les systèmes nanoparticulaires sont de différents types mais les plus majoritairement utilisés sont :

- des liposomes, petites particules sphériques constituées d'une double couche de lipides (glycérophospholipides) servant d'enveloppe à différentes substances médicamenteuses. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, celles-ci peuvent être solubilisées soit dans la phase aqueuse interne des liposomes, soit dans les bicouches lipidiques. Ces sphères peuvent traverser les membranes des cellules et transporter les principes actifs jusqu'au cœur de celles-ci ;

- des micelles et des nanoémulsions, autres types de vésicules ;
- des nanoparticules, dans lesquelles le principe actif se trouve solubilisé, encapsulé ou adsorbé au sein de la matrice : organiques (typiquement polymériques : microcapsules, microsphères), inorganiques ou hybrides.

La force des systèmes de vectorisation ou de « drug delivery » est leur capacité à modifier la pharmacocinétique et la biodistribution du médicament. Ainsi, les nanoparticules sont conçues pour éviter les mécanismes de défense du corps (système immunitaire) ce qui peut être utilisé pour améliorer l'administration de médicaments. Il est possible grâce aux nanoparticules de procéder à une libération contrôlée du principe actif et l'activation de la réponse pharmacologique associée peut se faire par des stimuli internes ou externes. Pouvoir maîtriser le déclenchement de la réponse est un moyen d'utiliser un médicament de façon plus efficace.

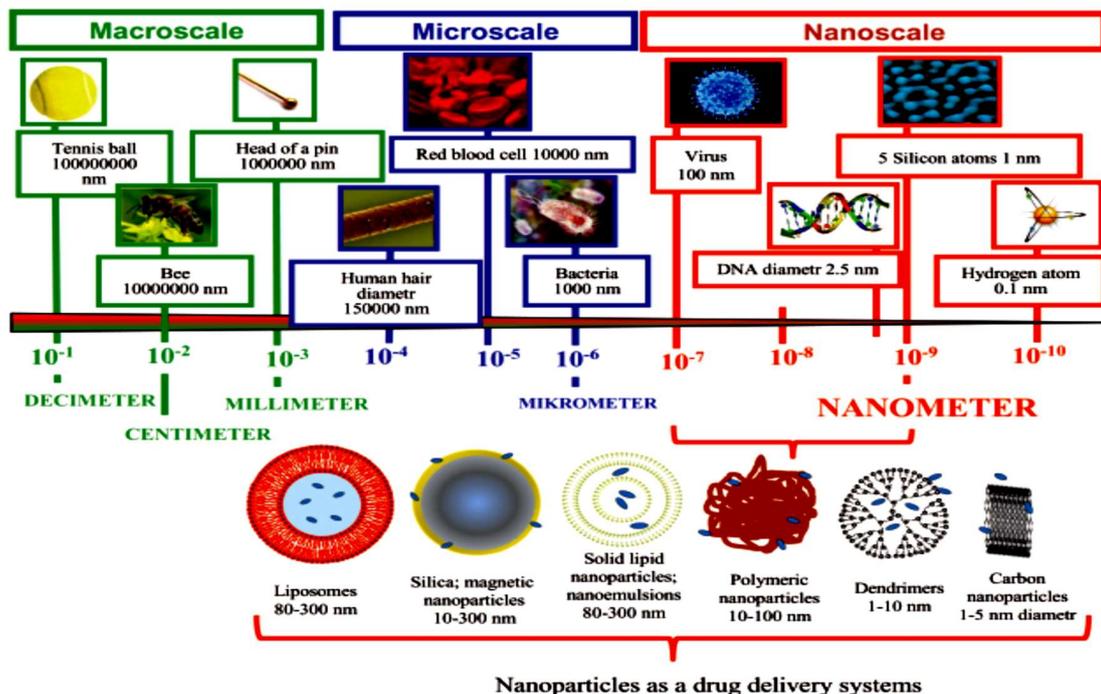


Figure 1 : Echelles de taille des nanovecteurs

Historiquement Il existe plusieurs générations de vecteurs

La **première génération** de nanoparticules correspond à l'encapsulation de principes actifs au sein de colloïdes stables en milieu aqueux, l'intérêt principal étant de ralentir leur élimination (notamment par voie rénale) et de prolonger leurs effets. Cependant, même si la faible taille des particules permet de ralentir l'élimination, elle n'est pas suffisante pour permettre une longue circulation dans le compartiment sanguin. En effet, celles-ci sont considérées comme des éléments étrangers par les défenses immunitaires (plus particulièrement par le système réticulo-endothélial / RES en anglais) puis sont rapidement prises en charge par les macrophages. Lorsque les nanovecteurs de première génération sont injectés dans la circulation générale, des protéines plasmatiques, comme les opsonines, viennent s'adsorber. Ces dernières portent une « signature moléculaire » de l'organisme qui les désigne alors comme du non-soi. Les macrophages, générés au niveau du foie (cellules de Kupffer), sont équipés de récepteurs, et reconnaissent ainsi les opsonines. Il existe donc une autre voie d'élimination potentielle aux nanovecteurs, en plus des mécanismes de détoxification de l'organisme communs aux substances. D'où la nécessité d'ajouter une couche de protection sur la structure du nano-objet.

Afin d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$) et de pouvoir atteindre la zone ciblée d'intérêt plus profonde, la surface des nanoparticules a été modifiée pour obtenir des nanoparticules dites « furtives ». On parle alors de nanoparticules de **seconde génération**. Les agents de furtivité, généralement des polymères, créent ainsi une « fine chevelure protectrice » permettant de repousser les opsonines et d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire (Moghimi et al. 2001 / Moghimi et al. 2003). Le terme d'opsonine désigne, en immunologie, toute substance qui se lie à des antigènes et induit leur phagocytose par des macrophages ou des leucocytes neutrophiles. Les opsonines désignent donc les anticorps et certains fragments du complément qui se lient aux antigènes de surface d'une bactérie pendant l'activation du complément, et favorisent la liaison des récepteurs des macrophages à la surface cellulaire. La vitesse à laquelle les particules seront phagocytées varie avec la nature du vecteur : les particules les plus hydrophiles et de charge neutre seront moins phagocytées. Les vecteurs de taille inférieure à 20 nm ne seront pas détectés par les macrophages.

Une des méthodes les plus couramment utilisées afin de ralentir l'opsonisation est l'enrobage par adsorption ou greffage de groupements capables de bloquer les interactions électrostatiques ou hydrophobiques qui aident les opsonines à se lier à la surface du vecteur. Ces groupes sont en général composés de longues chaînes de polymères hydrophiles et de tensioactifs non ioniques. Parmi les exemples de polymères ayant déjà été testés, les plus efficaces semblent être les composés à base de poly (oxyde d'éthylène) (POE ou PEG). Les particules ainsi obtenues permettent une libération lente du principe actif dans le sang et une accumulation passive dans les tissus par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), obtenu grâce au greffage de polyéthylèneglycol (PEG) à la surface de nanovecteurs. En effet, l'administration intraveineuse d'anticancéreux classiques comme la doxorubicine se caractérise généralement par leur disparition extrêmement rapide de la circulation sanguine en raison de la métabolisation du principe actif

et/ou de sa capture et élimination par le foie et les reins principalement. Cela explique la faible activité de nombreux anticancéreux et nécessite l'administration de doses élevées, responsables d'importants effets secondaires. L'augmentation du temps de résidence (demi-vie ou $t_{1/2}$) dans la circulation sanguine permet de tirer profit de deux particularités anatomiques trouvées dans de nombreuses tumeurs: un endothélium vasculaire plus perméable, autorisant une meilleure diffusion du médicament dans la tumeur, et un drainage lymphatique affaibli, limitant son élimination. Malheureusement, l'utilisation du PEG se heurte à des problèmes immunologiques (production d'anticorps, activation du complément) et de tolérance («hand and foot syndrom»). De plus, lors de la seconde administration du nanomédicament ainsi «PEGylé», l'effet de «furtivité» dans la circulation générale est perdu, de sorte qu'il est compliqué de réaliser des traitements chimiothérapeutiques répétés.

Afin de pouvoir cibler un tissu donné, la surface des nanoparticules a été fonctionnalisée avec des ligands capables de reconnaître des marqueurs présents sur certaines cellules. Les nanoparticules sont alors attirées par une seule sorte de marqueur en fonction du ligand greffé. Les ligands pouvant être greffés sur les nanoparticules sont aussi différents que des anticorps (Tada *et al.* 2007 / Yang *et coll.*, 2008), des peptides (Cai *et al.* 2006), des oligonucléotides (Farokhzad *et al.* 2006)... Ces nanoparticules «furtives et ciblantes» sont dites de **troisième génération**. Cette avancée technologique est représentée ci-dessous.

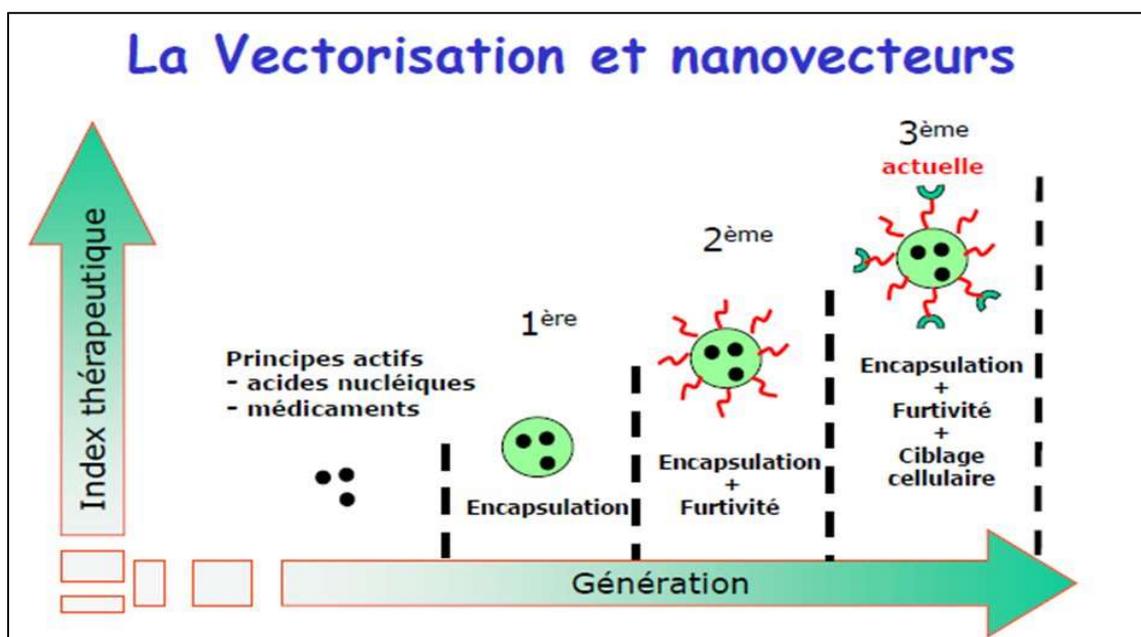


Figure 2 : Les différentes générations de nanovecteurs

2.1.1.2 Maitriser la pharmacocinétique, un enjeu pour l'efficacité

La compréhension des phénomènes d'absorption, de distribution, du métabolisme et d'excrétion (ADME) des nanoparticules et de leurs produits de dégradation ou de solubilisation est indispensable.

Comme le système sanguin irrigue l'ensemble des organes et tissus de l'organisme, ainsi la voie sanguine semble la plus adaptée pour atteindre l'ensemble des tissus et cellules ciblées. Il existe différentes voies pour atteindre le système sanguin : la voie entérale, la voie percutanée, la voie pulmonaire et les voies parentérales (sous-cutanée, intramusculaire et intra-veineuse). L'administration intra-veineuse (i.v) permet de s'affranchir des problèmes d'absorption liés aux autres voies d'administration et permet ainsi de maîtriser la quantité administrée.

L'absorption correspond à l'ensemble des phénomènes intervenant dans le transfert du principe actif depuis son site d'administration jusqu'à la circulation sanguine. Cette étape du devenir du médicament chez l'Homme est essentielle à étudier car elle peut être à l'origine d'une variabilité importante de la réponse aux médicaments notamment par le biais d'interactions médicamenteuses significatives. Le choix de la voie d'administration dépend de l'objectif thérapeutique (rapidité d'effet, limitation des effets systémiques), des possibilités d'administration, des propriétés physico-chimiques et de la taille des molécules (résistance à l'acidité gastrique et aux enzymes digestives, facilité à passer les barrières capillaires ou digestives ...) et des processus d'élimination de ces médicaments (biotransformation intestinale, hépatique).

On distingue classiquement, dans les mécanismes d'absorption, les deux étapes suivantes :

- ✓ une étape de libération ou dissolution ;
- ✓ une étape de résorption.

Ces deux étapes sont aussi importantes l'une que l'autre dans la mesure où elles vont pouvoir être un facteur limitant de la vitesse et de la quantité de médicament qui atteindra la circulation systémique après administration. La biodisponibilité (F) d'un médicament est la fraction de la dose administrée ou du principe actif libéré par la forme pharmaceutique qui parvient sous forme inchangée dans la circulation sanguine systémique. Lorsque l'administration se fait par voie i.v, on dit que la biodisponibilité est de 100%.

Pour toutes les autres voies d'administration, la biodisponibilité peut être incomplète en raison des phénomènes suivants:

- ✓ absorption (incluant les caractéristiques physico-chimiques des médicaments, la physiopathologie: condition circulatoire sanguine au site d'administration, vitesse de transit intestinal, composition du milieu intestinal (enzymes, pH,...) ;
- ✓ un effet de premier passage (intestinal, hépatique ou pulmonaire...).

La distribution consiste en la répartition du médicament de la circulation sanguine vers différents compartiments de l'organisme. Les organes ayant un flux sanguin élevé (cerveau, foie, cœur, intestins, poumons, rate, reins, etc.) seront exposés à des concentrations plus élevées en nanoparticules.

La distribution des nanoparticules peut être modifiée par l'altération des vaisseaux, ainsi par exemple l'augmentation de perméabilité des vaisseaux tumoraux permet un ciblage passif de ces tissus par effet

EPR. La distribution peut également être influencée par des paramètres propres comme leur taille ou leur fonctionnalisation de surface. Ainsi, les nanoparticules de petite taille, comprise entre 1 et 20 nm, présentent un temps de circulation plus long dans le sang et une extravasation lente vers les espaces interstitiels. Ceci peut altérer le volume de distribution des particules lors d'une administration intraveineuse. Les injections locales nécessitent, quant à elles, des nanoparticules de taille légèrement supérieure, de l'ordre de 30 à 100 nm. Cette taille est suffisante pour éviter la fuite dans les capillaires, mais suffisamment petite pour empêcher l'élimination par le RES (Moghimi *et al.* 2003).

Les nanoparticules, administrées par voie i.v, sont confrontées à différentes barrières biologiques, la première étant la barrière sanguine et la captation par RES. Ce système participe à une réponse immunitaire non spécifique, par reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme. Au cours de la première étape appelée opsonisation, les nanoparticules vont être recouvertes *via* des interactions non spécifiques par des opsonines (Vonarbourg *et al.* 2006). Ces molécules sont des protéines plasmatiques, telles que les protéines du Complément (Protéines C3 et C4), des immunoglobulines (IgG et IgM), la fibronectine, l'albumine et des apolipoprotéines. Ce sont principalement les protéines du Complément qui rendent les nanoparticules plus visibles pour les macrophages, notamment ceux qui résident dans le foie (cellules de Kupffer), la rate ou la moelle osseuse, et permettre leur phagocytose. L'opsonisation est un processus conduisant à une accumulation des nanoparticules dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques, en vue d'une élimination ultérieure. Il n'existe pas de règle générale pour contourner l'opsonisation des nanoparticules (Owens *et Peppas*, 2006). Cependant les molécules hydrophiles semblent être opsonisées moins rapidement que les molécules hydrophobes. Ce phénomène est également plus rapide pour les molécules chargées ou les nanoparticules de taille supérieure à 200 nm. La modification de la surface des nanoparticules sera donc un paramètre majeur pour augmenter leur temps de circulation et ainsi obtenir des nanoparticules furtives, qui seront moins reconnues par le RES.

La diffusion ou distribution tissulaire est le processus de répartition du médicament dans l'ensemble des tissus et organes. La diffusion tissulaire présente les mêmes mécanismes que la diffusion au niveau sanguin.

Les facteurs limitant de la diffusion tissulaire sont :

- ✓ la fixation aux protéines tissulaires qui déterminera la forme libre
- ✓ les caractéristiques physico-chimiques de la molécule : masse molaire, lipophilie (coefficient de partage), pKa de la molécule (qui conditionne son état d'ionisation ou non ionisation) et donc de sa capacité à franchir les membranes vasculaires et cellulaires
- ✓ l'irrigation des organes et le débit sanguin

Les médicaments se distribuent généralement largement dans l'organisme ; pas seulement au site d'action mais aussi dans les autres cellules et tissus. Il en résulte une perte de la dose effective de la SA qui a été

administrée mais aussi l'apparition potentielle d'effets secondaires sur les cellules et tissus sains. Les nanomédicaments permettent de mieux cibler des cellules particulières. Avec une dose moindre et une spécificité accrue, il est possible d'utiliser de plus petites doses de médicament et de réduire significativement les effets secondaires en interagissant que peu avec les cellules saines de l'organisme.

La métabolisation est la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs métabolite(s) actif(s) ou inactif(s). De nombreux organes peuvent réaliser ces transformations (rein, poumon, foie, estomac).

L'élimination du médicament peut être définie par le processus d'élimination du médicament lui-même et / ou de ses métabolites de l'organisme, qui peut être réalisée par la sueur, la bile ou l'urine. L'élimination des nanoparticules est également conditionnée par la perméabilité vasculaire qui est variable selon que l'endothélium soit continu (sans pore), fenêtré (pores entre 50 et 70 nm) ou sinusoïde (pores de 0,1 à 0,3 µm). L'élimination des nanoparticules sera donc plutôt hépatique ou plutôt rénale selon leur taille. Une étude portant sur des nanoparticules d'or montre que les petites particules chargées positivement sont à la fois moins captées par le foie et éliminées plus rapidement par voie rénale, que des particules plus grosses ou chargées négativement voire neutres (Balogh *et al.* 2007).

La clairance et l'opsonisation seront donc fortement liées aux différentes caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, telles leur taille, leur géométrie, leur charge et les groupements présents à leur surface. La modification de la surface des nanoparticules permet de contrôler leur distribution et de limiter leur élimination. Ainsi, l'ajout de PEG (molécules hydrophiles) à la surface des nanoparticules augmente leur temps de circulation dans le sang (Torchilin *et al.* 1995).

2.1.1.3 Les nanosystèmes communément utilisés

Comme indiqué dans la *Figure 3*, il existe différents systèmes nanoparticulaires utilisés.

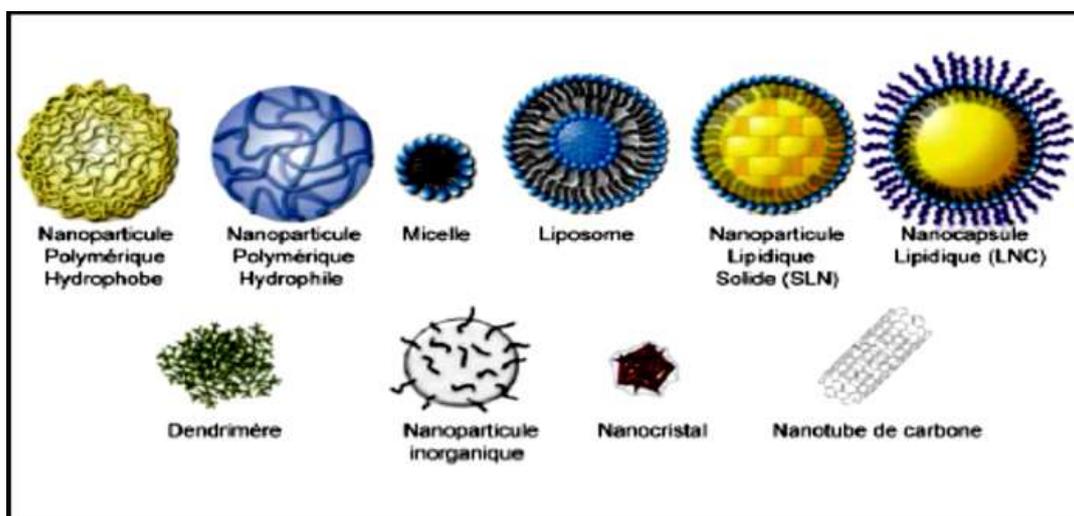


Figure 3 : Différentes nanoparticules utilisées

(D'après Faraji et Wipf 2009)

2.1.1.3.1 Polymère-principe actif conjugués

Ringsdorf fut, dans les années 1970, le premier à proposer l'utilisation d'un polymère hydrosoluble en tant que vecteur de médicament. Il suggéra que le polymère idéal pour la vectorisation devait être hydrophile pour assurer une bonne solubilité in vivo et devait contenir des groupes fonctionnels permettant le greffage covalent de médicaments. Il a également proposé l'ajout d'un bras espaceur (linker) biodégradable situé entre le polymère et le médicament pour permettre le clivage enzymatique ou hydrolytique. Ce type de vecteur ne s'adresse qu'à des composés dont une protection n'est pas utile par la voie d'administration choisie. En d'autres termes, il n'est pas concevable d'utiliser cette forme de vecteur pour le transport de substances fragiles telles que les peptides, les protéines ou les oligonucléotides qui se dégraderaient avant d'arriver sur le site d'action. Toutefois, cette technique présente de nombreux avantages comme une très nette augmentation du temps de rétention des médicaments dans l'organisme, une diminution de la toxicité et une meilleure spécificité de l'action du principe actif (Vasir et al. 2005).

Le Tableau 1 recense quelques exemples de substances actives associées à des polymères

Tableau 1 : Exemples de substances actives associées à des polymères

Substance active	Indication thérapeutique	Nanovecteur
Rifampicine	Anti-infectieux	Gélatine
Capécitabine	Cancer chimiothérapie (cancer colorectal et sein)	Chitosan-poly(ethylene-oxide-g-acrylamide)
Doxorubicine	Agent antinéoplasique	PEGylé-PLGA-
5-Fluorouracile	anticancéreux	Chitosan-g-poly(N-vinyl caprolactam)
Lamivudine	Anti-HIV	Chitosan-poly (acide lactique)
Cyclosporine A	immunosuppresseur	Glyceryl monooleate / poloxamère 407

2.1.1.3.2 Les liposomes

Les liposomes sont considérés comme étant à la base de l'industrie de « Drug Delivery ». Depuis, les liposomes ont été très largement étudiés en tant que vecteurs pharmaceutiques. Ces systèmes sont des vésicules artificielles formées par des membranes lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux. Les liposomes sont des systèmes vésiculaires, biocompatibles et biodégradables composés d'une (liposomes unilamellaires) ou de plusieurs (liposomes multilamellaires) bicouches de phospholipides organisées en phase lamellaire et délimitant un ou plusieurs compartiment(s) aqueux.

Obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, le plus souvent des phospholipides, les liposomes ainsi formés sont généralement biocompatibles. Il est aussi possible de les développer à partir de polymères synthétiques. Ces objets présentent l'avantage de permettre l'encapsulation aussi bien d'espèces hydrophiles (au sein du cœur aqueux) que de molécules hydrophobes (au niveau de la bicouche) et leur taille peut aller de quelques nanomètres à plusieurs microns. Cette caractéristique, associée à la composition lipidique, est cruciale pour déterminer leur comportement in vivo. En général, on peut dire que la stabilité et le temps de circulation des liposomes augmentent avec la diminution de taille. Les liposomes à caractéristique de «circulation longue» (t1/2 plus long) peuvent être obtenus par l'inclusion de certains lipides et de certains polymères dans leur composition. Les liposomes de « longue durée » (t1/2 long) et de petite taille jouent un rôle important dans la distribution de liposomes à certains tissus, à savoir les sites d'infection, d'inflammation et de tumeurs solides.

Comme avec toute particule étrangère entrant dans le corps, les liposomes rencontrent des systèmes de défense multiples visant à la reconnaissance, la neutralisation et l'élimination des substances envahissantes. Ces défenses incluent le RES, l'opsonisation et l'immunogénicité (Willis et Forssen, 1998).

Le RES est le principal site d'accumulation des liposomes après leur administration systémique (Poste G et al. 1976 / Senior J.H, 1987). Les principaux organes associés au RES comprennent le foie, la rate, les reins, les poumons, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (Senior JH, 1987). La capacité du RES à séquestrer les liposomes de la circulation est attribuée à des fenestrations dans leur microvasculature. Les diamètres des pores de ces capillaires peuvent varier de 100 à 800 nm, ce qui est suffisamment important pour l'extravasation et l'élimination subséquente de la plupart des liposomes chargés de substance active (taille de 50-1000 nm) (Sapra et Allen, 2003). Les liposomes seront éliminés dans les RES par les macrophages résidents par des interactions directes avec les cellules phagocytaires (Chrai et al. 2002). Les cellules des RES font également partie du système immunitaire inné, ce qui a soulevé la question de savoir si la saturation des macrophages par les liposomes conduit ou non à une immunosuppression et augmente le risque d'infection. Un dépôt excessif de liposomes dans les macrophages peut altérer leur capacité phagocytaire ou moduler d'autres fonctions cellulaires. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a pas eu de signal d'immunodépression cliniquement significative suite à l'administration de doses thérapeutiques (non cytotoxiques) de liposomes (Szebeni et Barenholz, 2009 / Szebeni et Moghimi, 2009).

L'opsonisation des liposomes par les protéines sériques dépend d'une variété de facteurs, y compris la taille, la charge de surface et la stabilité (Cullis et al. 1998/ Ishida et al. 2001a). Les interactions entre liposomes-protéines sériques diminuent avec la taille des liposomes (800 à 200 nm de diamètre), car les liposomes de petites dimensions ne peuvent pas supporter l'activité des opsonines (Chrai et al. 2002). Cet effet de la taille des liposomes sur la reconnaissance par les molécules du Complément peut également affecter l'absorption au niveau du foie (Chrai et al. 2002). Généralement, les liposomes de grandes tailles,

non modifiés seront éliminés plus rapidement que les petits liposomes, neutres ou chargés positivement (Oku et Namba, 1994/ Laverman et al. 1999/ Ulrich A.S 2002).

Dans le cadre de leur utilisation en oncologie, les liposomes qui ont échappé au RES et à l'opsonisation seront soumis à l'effet EPR (Sawant et Torchilin, 2012/ Nehoff et al. 2014). L'effet EPR se réfère à la perméabilité accrue du système vasculaire qui irrigue les tissus pathologiques (par exemple, des tumeurs et des états impliquant une inflammation). Au niveau de ces sites, les dérégulations de l'angiogenèse et / ou l'augmentation de l'expression et de l'activation des facteurs de perméabilité vasculaire prédominant (Nehoff et al. 2014), ce qui conduit à des fenestrations pouvant aller de 300 à 4700 nm. Cela permet aux liposomes de s'accumuler par ciblage passif (Hashizume et al. 2000). Il est important de noter que tous les types de systèmes de libération liposomaux sont soumis à l'effet EPR, les liposomes PEGylés présentant un avantage en raison de la diminution de la clairance RES et de leur temps de circulation prolongé (Sawant et Torchilin, 2012). Cela signifie qu'une plus grande proportion d'entre eux pourra atteindre théoriquement la cible.

Toutefois, il a été montré que différents facteurs peuvent altérer la structure des liposomes dans la circulation. Les modifications chimiques réalisées pour améliorer leur efficacité en tant que véhicules d'administration (agent de vectorisation) de médicaments peuvent conduire à une production d'anticorps dirigés contre leurs divers composants et / ou la substance active encapsulée. Ainsi, l'injection répétée de liposomes PEGylés a été associée à la perte de leurs propriétés « circulantes longues » induisant une clairance sanguine plus rapide que souhaitée (Dams et al. 2000/ Ishida et al. 2003 / Ishida et al. 2006). Ce phénomène est une préoccupation majeure pour l'application clinique de formulations PEGylées qui nécessitent des régimes posologiques multiples. Le mécanisme exact sous-jacent au phénomène n'est pas clair mais il semble être connecté à la dose de lipides, la densité surfacique de PEG et l'intervalle entre les injections initiales et consécutives (Ishida et Kiwada, 2008).

2.1.1.3.3 Les dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules « hyperbranchées » présentant une architecture tridimensionnelle contrôlée. Ces macromolécules sont constituées de monomères (possédant au moins 3 sites réactifs) associés selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Deux types de méthodes de synthèse peuvent être employés pour obtenir des dendrimères : la synthèse divergente et la synthèse convergente. La synthèse divergente s'effectue du cœur vers la périphérie en greffant un nombre de plus en plus grand de petites molécules sur la surface multifonctionnalisée du dendrimère. La synthèse convergente consiste à construire le dendrimère de la périphérie vers le cœur à l'aide de fragments dendritiques appelés dendrons qui sont rattachés lors d'une étape finale à un cœur plurifonctionnel.

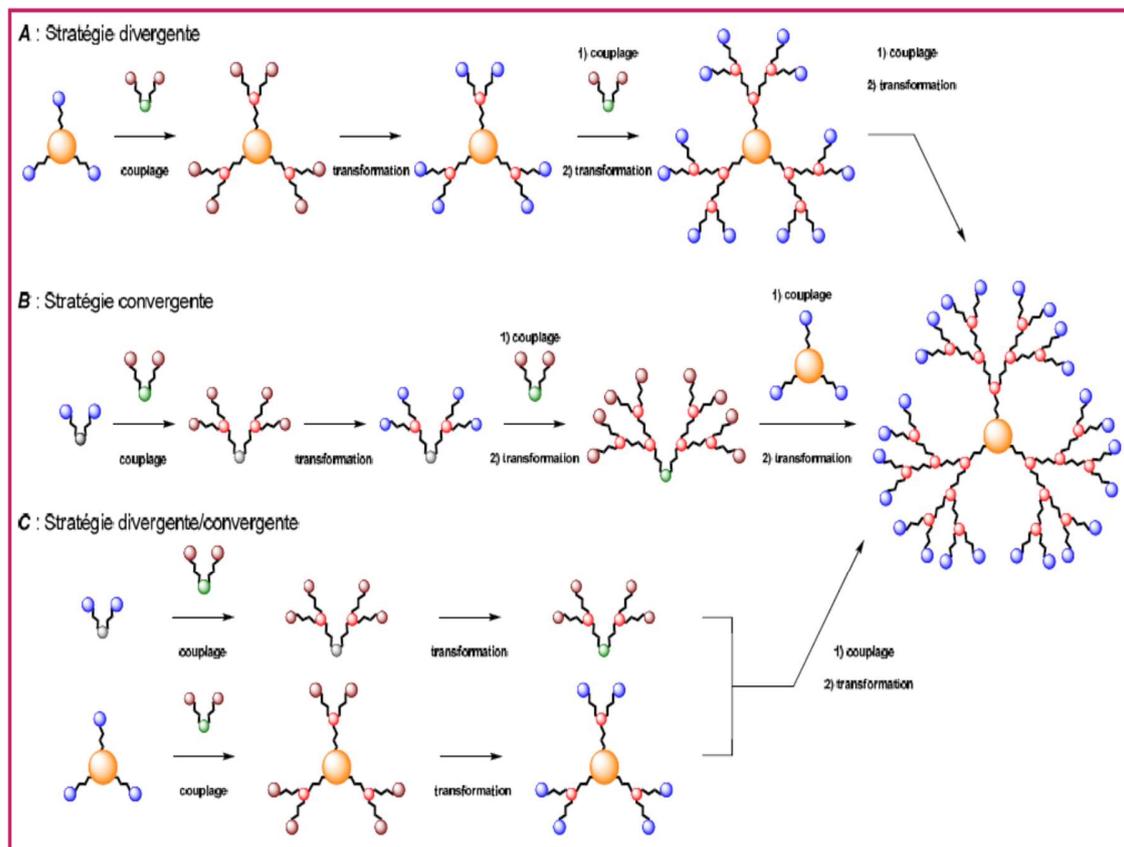


Figure 4 : Différentes stratégies de synthèse de dendrimères

D'après Pierre Moreno et al. / L'actualité chimique - janvier 2014 - n° 381

Les groupements terminaux présents en surface des dendrimères sont fonctionnalisables et peuvent donc être adaptés pour des applications spécifiques. Ainsi, des agents thérapeutiques ou de diagnostics sont usuellement fixés à la surface des dendrimères par modification chimique (Tomalia, D. A.; Fréchet 2002). Bien que leur faible taille permette d'envisager des actions à de nombreux niveaux, elle représente aussi le risque de perdre le contrôle des sites atteints et d'augmenter des effets non désirés. Enfin de manière générale, ces systèmes sont limités par une faible capacité d'encapsulation.

2.1.1.3.4 Les micelles

Les micelles ont été extrêmement étudiées pour la vectorisation de nombreux principes actifs. Les interactions hydrophobes sont la force motrice prédominante dans l'assemblage des composés amphiphiles dans le milieu aqueux lorsque leurs concentrations dépassent la concentration micellaire critique (CMC). La CMC correspondant à la concentration en tensioactifs en dessous de laquelle il n'y a pas d'auto-assemblage possible des tensioactifs sous forme de micelles.

La plupart des systèmes d'administration micellaires nanométriques sont constitués de polymères amphiphiles qui sont constitués de PEG et d'un bloc hydrophobe de faible masse moléculaire. La partie hydrophile des molécules amphiphiles est dirigée vers l'eau et la partie hydrophobe vers l'intérieur formant le cœur de la particule.

Les principaux avantages des micelles sont leur temps de circulation prolongé dans le sang grâce à leur petite taille et leur capacité à solubiliser et encapsuler des principes actifs hydrophobes. Bien que très utilisés, ces systèmes sont souvent limités par leur stabilité et leur faible capacité d'encapsulation (Kim *et al.* 2009).

Selon leur composition il est possible de subdiviser les micelles en différentes classes :

✓ Micelles phospholipidiques

Contrairement aux phospholipides typiques tels que la phosphatidylcholine, les phospholipides conjugués au PEG tels que le 1, 2-Distearoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-Poly (éthylène glycol) (DSPE-PEG) sont solubles dans l'eau et s'auto-assemblent sous forme de micelles nanométriques au lieu de bicouches. Un grand nombre de substances médicamenteuses peuvent être solubilisées et stabilisées au sein de structures phospholipidiques (micelles phospholipidiques PEGylés) : paclitaxel (Onyuskel *et al.* 1999), diazepam (Ashok *et al.* 2004), camptothécine (Koo *et al.* 2005)...

✓ Micelles pluroniques / poloxamères.

Les poloxamères sont des copolymères non-ioniques à trois blocs, possédant typiquement un bloc central « hydrophobe » de polypropylène glycol (aussi appelé poly (oxyde de propylène)) et deux blocs externes hydrophiles de polyéthylène glycol. Ces copolymères de type poly (oxyde d'éthylène-b-oxyde de propylène-b-oxyde d'éthylène) ont pour formule générale $H(OCH_2CH_2)_x(OCH(CH_3)CH_2)_y(OCH_2CH_2)_xOH$ ou pour simplifier $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$ on peut aussi les nommer PEO_x-PPO_y-PEO_x. Un certain nombre d'études ont été publiées sur l'application des micelles de type pluronique (typiquement 20 à 100 nm) en thérapeutique ou en imagerie médicale (Kwon GS 2003 / Torchilin VP. 2002 / Kabanov AV *et al.* 2002).

✓ Micelles de poly (amino-acides)

Les micelles à base de poly (L- acide aminé) ont été étudiées pour leur potentiel de libération pH-dépendant aux sites tumoraux. La plupart des tumeurs solides ont des valeurs de pH inférieures à 7,2 (Lee *et al.*; 2003) en raison du taux plus élevé de glycolyse aérobie et anaérobie dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Les micelles de poly (L-histidine) (polyHis) ont été étudiées comme vecteurs de médicaments anticancéreux sensibles au pH. Ces micelles ont aussi été étudiées pour la vectorisation d'oligonucléotides antisens (Kakizawa *et al.* 2001).

✓ Micelles polyesters

Les micelles de polyester sont constituées de polymères tels que PEG-poly (acide lactique) (PLA), PEG-poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et PEG-poly (caprolactone) qui sont biocompatibles et biodégradables. Les interactions avec l'entité polymérique et la substance active ont une influence sur la capacité à encapsuler la substance active et sur la libération de celle-ci. Ces structures ont été étudiées pour la vectorisation de substances médicamenteuses telles que paclitaxel (Kim SC et al. 2001), doxorubicine (Shuai et al. 2004)...

2.1.1.3.5 Nanocristaux

Les nanocristaux de médicaments sont des nanoparticules avec un caractère cristallin. Contrairement aux autres nanostructures, les nanocristaux sont composés exclusivement de SA. En effet, il n'y a pas de matériau « support » comme dans les nanoparticules polymères. La dispersion des nanocristaux dans des milieux liquides conduit à des "nanosuspensions" (contrairement aux microsuspensions ou macrosuspensions). En général, les particules dispersées doivent être stabilisées, par exemple par l'utilisation de tensioactifs ou des stabilisants polymères. Les milieux de dispersion peuvent être de l'eau, des solutions aqueuses ou des milieux non aqueux.

Il existe diverses méthodes de production de nanocristaux avec une forme et une taille souhaitées. Essentiellement, trois principes peuvent être utilisés: le broyage « milling method », les méthodes de précipitation et les méthodes d'homogénéisation, ainsi qu'une combinaison de celles-ci. Les méthodes industriellement pertinentes sont les technologies « top down », c'est-à-dire, à partir d'une poudre de médicament de grande taille pour être réduite en taille jusqu'à atteindre l'échelle nanométrique. Les technologies ascendantes « bottom up » consistent à construire les nano-objets atome par atome, pour construire des molécules que l'on peut ensuite ajouter dans un système plus grand. L'assemblage fait de manière précise permet de maîtriser totalement la structure. Les techniques « bottom up » sont actuellement moins utilisées dans la production de produits commerciaux. Les raisons peuvent inclure la nécessité d'éliminer du solvant, la difficulté à contrôler le procédé et le fait que beaucoup de médicaments soient à la fois peu solubles non seulement dans les milieux aqueux, mais aussi dans les solvants organiques.

L'efficacité d'utilisation des nanocristaux a été étudiée après administration par voie orale, oculaire, pulmonaire, parentérale et dermique, toutes ces voies montrant leur haute applicabilité thérapeutique (Pawar et al. 2014). Jusqu'à présent, la voie orale est la voie privilégiée et est considérée comme la voie la plus sûre et la plus appropriée pour l'administration de médicaments sous forme de nanocristaux. Les nanocristaux offrent des solutions aux problèmes liés à la solubilité, tels qu'une biodisponibilité faible / variable, un début d'action retardé, une variation de la biodisponibilité résultant de l'état d'alimentation / rapide et une utilisation d'une dose orale importante. Les nanocristaux facilitent un taux de dissolution accru, une solubilité de saturation plus élevée (principes de Noyes-Whitney et Ostwald-Freundlich) et une « bioadhésion » plus élevée au niveau de la paroi intestinale, améliorant ainsi de façon impressionnante la biodisponibilité de médicaments peu solubles administrés par voie orale.

L'administration par voie i.v de composés faiblement solubles, à l'aide de co-solvants, de tensioactifs, de liposomes ou de cyclodextrines, est souvent associée à de grands volumes d'injection ou à des effets secondaires toxiques. Les nanocristaux ne nécessitent pas de vecteurs ainsi, ils augmentent la capacité de « charge » en substance active par rapport aux autres systèmes d'application parentérale. En utilisant les nanocristaux en suspension, il est alors possible de réduire le volume d'administration.

L'administration d'un médicament ophtalmique est une tâche difficile en raison de l'environnement pharmacocinétique critique et des barrières physiologiques de l'œil qui entravent la « drug-delivery » des médicaments (Geroski *et Edelhauser* 2000/ Duvvuri *et al.* 2003/ Koevary S.B 2003). De nombreuses contraintes anatomiques et physiologiques empêchent une perméation oculaire plus profonde. Ainsi, moins de 5% des doses appliquées par voie topique atteignent les tissus intraoculaires (Urtti *et al.* 1990 / Keister *et al.* 1991, Kaur *et Kanwar*, 2002). La technologie des nanocristaux joue un rôle avancé dans l'administration de médicaments ophtalmiques en résolvant les problèmes de dispersibilité de médicaments peu solubles tels que le budésonide, la dexaméthasone, l'hydrocortisone, la prednisolone (Kassem *et al.* 2007) et la fluorométholone (Gupta *et al.* 2010).

Pouvoir libérer au niveau des voies respiratoires des médicaments peu solubles, comme les corticostéroïdes tels que le budésonide ou le dipropionate de bécloéthasone, est très important pour le traitement local et systémique des maladies pulmonaires. Ces médicaments pourraient être inhalés sous forme de nanocristaux en suspension. La capacité des nanocristaux à pouvoir se fixer à la surface de la muqueuse offre un temps de séjour prolongé bénéfique au site d'absorption et augmente ainsi l'absorption du médicament (Jacobs *et Müller*, 2002). Un dépôt de particules indésirables dans la bouche et le pharynx, et donc les effets secondaires (pouvant être associés) locaux et systémiques peuvent être évités avec l'utilisation de nanocristaux. Par ailleurs, le dépôt au niveau pulmonaire peut être contrôlé via la distribution de taille des nanocristaux générés.

Le succès de l'administration par voie cutanée dépend de la perméation des médicaments à travers le *stratum corneum* (Mathur *et al.* 2010). En raison de leur petite taille, on s'attend à ce que les nanocristaux « s'emboîtent » étroitement pour former une couche occlusive qui hydrate la peau, augmentant la pénétration et la perméation des médicaments. De plus, le mode d'action par voie cutanée des nanocristaux s'explique par la solubilité accrue en saturation, conduisant alors à un gradient de concentration, ce qui favorise ensuite la pénétration dans la peau (Müller *et al.* 2011). Cet effet peut être encore renforcé par l'utilisation de polymères chargés positivement comme stabilisants pour les nanocristaux. La charge opposée peut conduire à une affinité accrue des nanocristaux sur le *stratum corneum* chargé négativement.

Le

Tableau 2 présente un exemple de médicaments à l'état de nanocristaux ayant obtenu une AMM par la FDA.

Tableau 2 : Exemples de médicaments composés de nanocristaux ayant eu une AMM aux USA (certains ont une AMM en France et en Europe)

Produit/Compagnie	SA	Indication	Date d'AMM
Gris-Peg®/ Novartis	griseofulvine	antifongique	1982
Cesamet®/Lilly	nabilone	antiémétique	2005
Verelan PM®/ Schwarz Pharma	Chlorhydrate de vérapamil	Anti-arythmique	1998
Rapamune® / Wyeth	sirolimus	immunosuppresseur	2000
Ritalin LA® / Novartis	Chlorhydrate de méthyl-phenidate	Anti-psychotique	2002
Tricor® / Abbott	fénofibrate	Hyper- cholestérolémie	2004
Invega Sustenna® / Johnson & Johnson	Palmitate palipéridone	Anti-dépresseur	2009

D' après Junghanns and Müller, 2008 (Junghanns, J.U.A.H. Müller, R.H. 2008. Nanocrystal Technology, Drug Delivery and Clinical Applications. Int. J. Nanomedicine, 3, 3, 295-310.). / Méthodes de fabrication WBM= wett ball milling (broyage) / HPH= high-pressure homogenization

2.1.1.3.6 Nanoparticules solides lipidiques (Solid lipid nanoparticles SLN) et nanostructures lipidiques de transport (Nanostructured Lipid Carrier NLC)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) introduites en 1991 représentent un système de support alternatif aux supports colloïdaux traditionnels, tels que les émulsions, les liposomes et les micro- et nanoparticules polymères. Les nanostructures lipidiques de transport (NLC) ont été introduites comme la prochaine génération des SLN à la fin des années 1990 pour dominer les difficultés possibles des SLN. Les NLC améliorent la stabilité, le chargement de capacité et empêchent l'expulsion du médicament pendant le stockage. Les NLC sont des SLN modifiés dans lesquels la phase lipidique contient à la fois des lipides solides (lipides) et liquides (huileux) à température ambiante. En effet, les NLC sont des générations modifiées de SLN qui présentent un mélange de phase solide et liquide (huile) formant une matrice sans forme, ce qui améliore la stabilité et le chargement de la capacité.

Une nanoparticule lipidique solide est typiquement sphérique avec un diamètre moyen compris entre 10 et 1000 nanomètres. Les nanoparticules lipidiques solides possèdent une matrice de noyau lipidique solide qui peut solubiliser les molécules lipophiles. Le noyau lipidique (cf. Tableau 3) est stabilisé par des tensioactifs (émulsifiants). Le terme lipide est ici utilisé dans un sens plus large et comprend les triglycérides (par exemple la tristéarine), les diglycérides (par exemple le bahénate de glycérol), les monoglycérides (par exemple le monostéarate de glycérol), les acides gras (par exemple l'acide stéarique), les stéroïdes (par exemple le cholestérol) et les cires Palmitate de cétyle). Toutes les classes d'émulsifiants (par rapport à la charge et au poids moléculaire) ont été utilisées pour stabiliser la dispersion lipidique. Il a été montré que recourir à une combinaison d'émulsifiants pouvait empêcher l'agglomération des particules plus efficacement.

A leur découverte, on pensait que les SLN pouvaient grâce à leur structure particulière (cf. *Figure 5*), offrir certains des avantages des nanoparticules polymères, des émulsions grasses et des liposomes ainsi que la possibilité de résoudre avec succès les problèmes liés à la stabilité physique et chimique du médicament, à l'administration et à l'absorption du médicament.

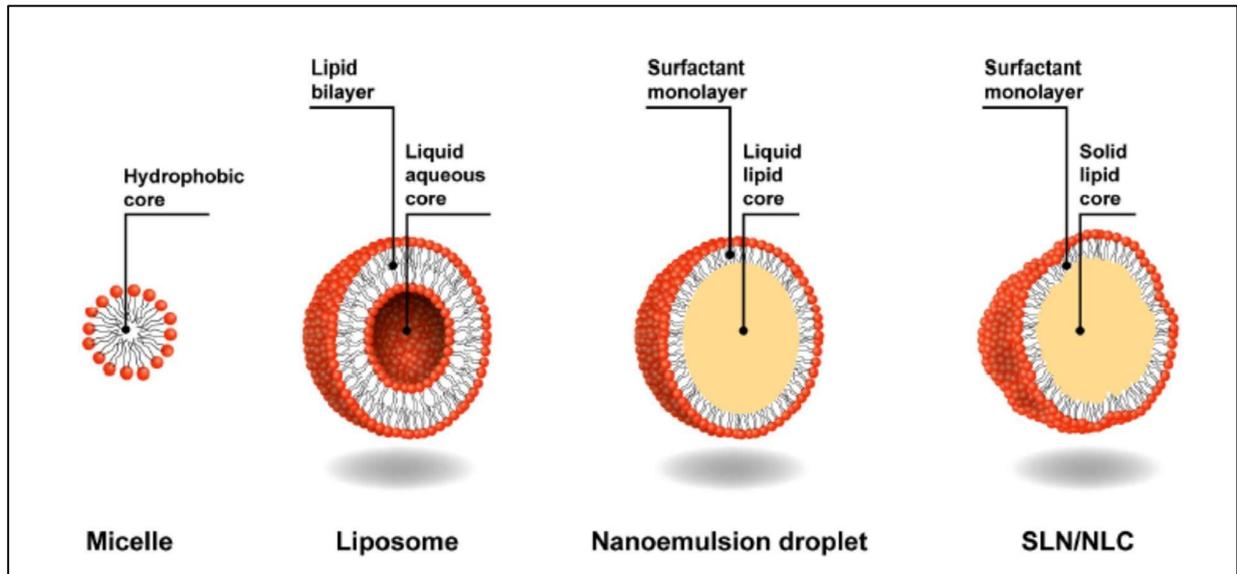


Figure 5 : Comparaison entre micelles, liposomes, nanoémulsions et nanoparticules lipidiques solides.

(Micelles à noyau hydrophobe formé par les queues des molécules de tensioactifs) Liposomes à noyau aqueux entourés d'une double couche de phospholipides Nanoémulsions gouttelettes avec noyau liquide hydrophobe composé de l'huile qui est dispersée dans l'eau et stabilisée par une monocouche de tensioactif. SLN et NLC avec noyau hydrophobe de lipide solidifié, souvent la solidification / cristallisation du lipide se traduit par une forme non sphérique des particules).

Tableau 3 : Exemples de lipides communément utilisés dans les formulations de SLN et NLC

Group of commonly used lipids in the preparation of SLN and NLC				
Triglycerides	Monoglycerides	Mixtures	Free fatty alcohols	Others
Glyceryl tristearate	Glyceryl monostearate	Glyceryl behenate	Stearyl alcohol	Castor oil
Glyceryl tripalmitate		Glyceryl palmitostearate	Cetyl alcohol	Hydrogenated castor oil
Glyceryl trimyristate		Free fatty acids	Myristyl alcohol	Hydrogenated palm oil
Medium chain triglycerides		Behenic acid	Lauryl alcohol	
Glyceryl trioleate		Stearic acid	Waxes	
		Palmitic acid	Cetyl palmitate	
		Myristic acid	Beeswax	
	Oleic acid	Carnauba wax		

Tableau 4 : Exemples de tensioactifs communément utilisés dans les formulations de SLN et NLC

Surfactants			Co-surfactants
Non ionic	Ionic	Amphoteric	
Polyoxyethylene sorbitan fatty esters	Anionic		
Polysorbate 20	Sodium dehydrocholate		
Polysorbate 60	Sodium taurocholate		
Polysorbate 80	Sodium glycocholate		
Polysorbate 85	Sodium cholate		1-Butanol
	Sodium lauryl sulphate		Low molecular weight PEG Diethylene glycol monoethyl ether
Polyoxyethylene alkyl/aryl ethers	Cationic	L- α -phosphatidyl- choline	
Polyoxyethylene(20)cetyl ether		Soya lecithin	Propylene glycol
Polyoxyethylene(20) isohecadecyl ether		Egg lecithin	Ethanol Sorbitan monostearate
Polyoxyethylene(20)oleyl ether			
Polyoxyethylene(20)stearyl ether			
Tyloxapol	Cetrimonium bromide		
	DOTAP		
Ethoxylated castor oils	DOTMA		
PEG-35 castor oil	Dimethyldiocta- decylammonium bromide		
PEG-40 hydrogenated castor oil			
Poloxamers			
Poloxamer 188			
Poloxamer 407			
Others			
Polyoxyethylene- glycerine monostearate			
Macrogol(15) hydroxystearate			
PEG caprylic/capric triglycerides			
Polyglyceryl-3 methylglucose distearate			
[Polyglyceryl-6 distearate			

Outre les composants principaux constituant le SLN / NLC (c'est-à-dire les lipides et tensioactifs), de nombreux additifs différents peuvent trouver place dans chaque formulation particulière :

- ✓ Cryoprotecteurs dans des formulations lyophilisées : D-sorbitol, D-glucose, D-fructose ;
- ✓ Matériaux de revêtement de polysaccharide : chitosan ;

- ✓ Matériaux de revêtement de protéines : fibroïne de soie ;
- ✓ Emulsifiants polymères alternatifs - alcool polyvinylique (PVA) et poly (acides lactiques-Co glycoliques) (PLGA) ;
- ✓ Electrolytes et glycérol ;
- ✓ Conservateurs : parabènes, thiomersal, imidazolidinyl-urée, chlorométhylisothiazolinone et méthylisothiazolinone.

D'autres exemples pertinents sont les combinaisons de SLN et de NLC avec différents excipients améliorant la viscosité pour produire des carbopols et des dextrans hydrogels.

L'instabilité physique de ce type de structure lipidique est liée majoritairement à l'état cristallin des lipides dans la formulation. Les lipides expriment plusieurs modifications cristallines. Ces modifications sont de type α , β et γ . A ces différents états, les lipides expriment des propriétés différentes directement liées à la stabilité. Lorsque la formulation est rapidement refroidie, les lipides cristallisent favorablement dans la modification α ou dans certains cas forment une masse fondue super-refroidie. Pendant le stockage, il se produit une transition entre les modifications cristallines moins stables ou l'état super-refroidi vers les modifications plus stables. Ceci conduit à la formation de structures cristallines plus ordonnées et plus stables dans les lipides.

Les SLN ont été initialement conçus pour résoudre certains des problèmes des nanoémulsions parentérales. Cependant, depuis vingt ans, les formulations SLN et NLC se sont étendues à une variété de nouvelles applications. Les SLN ont résolu certains des problèmes liés à l'expulsion rapide de médicaments à partir de la nanoémulsions parentérale. Lors d'une modification appropriée de la surface (par exemple, stabilisation avec des poloxamères et des poloxamines), un SLN peut exprimer un effet contrôlé et prolongé après administration i.v. Outre l'obtention d'une libération contrôlée pour des SA comme la camptothécine, la nature du SLN / NLC peut augmenter la stabilité chimique du médicament après l'administration.

Les problèmes liés à la faible solubilité et biodisponibilité de divers médicaments après administration orale peuvent être résolus avec des formulations SLN et NLC. Après administration, les matrices lipidiques composées de triglycérides sont normalement digérées par des lipases pancréatiques en mono- et diglycérides. Les monoglycérides peuvent former des micelles et des micelles mixtes (avec des sels biliaires) qui contiennent encore le médicament. Ensuite, ces lipides peuvent subir une absorption conjointement avec le médicament *via* la formation du chylomicron (lipoprotéines qui se forment en période de digestion) principalement dans le système lymphatique. L'absorption lymphatique peut être contrôlée avec la taille des particules, car une plus petite taille entraîne une absorption plus élevée. De plus, les SLN et les NLC peuvent améliorer l'absorption du médicament par d'autres mécanismes - augmentation de l'absorption par les cellules M des plaques de Peyer dans l'intestin et adhérence des particules à la paroi intestinale.

Concernant l'utilisation des SLN et NLC pour un apport au niveau pulmonaire, leur petite taille permet leur incorporation dans des microparticules et des gouttes qui peuvent atteindre efficacement les alvéoles. De plus, les SLN et les NLC peuvent améliorer les paramètres pharmacocinétiques après administration par les poumons. Divers exemples incluent l'itraconazole, le phénéthylisothiocyanate, le célécoxib, la béclo méthasone, la thymopentine... La plupart de ces formulations sont destinées à être utilisées dans le traitement des maladies infectieuses et du cancer. Des résultats prometteurs ont aussi été rapportés pour les médicaments antituberculeux après incorporation dans le SLN pour administration pulmonaire. L'application intranasale est également prometteuse pour la variété des médicaments. L'utilisation de SLN s'est révélée être un support alternatif approprié pour l'administration intranasale de l'antiémétique ondansétron. D'autres exemples plus récents sont les formulations de SLN pour administration intranasale avec budésonide, ropinirole, alprazolam et bien d'autres. Le ciblage cérébral peut être réalisé par administration intranasale. Par exemple, l'administration nasale chez la souris de SLN chargé de rispéridone a montré une biodisponibilité prometteuse au niveau du cerveau (Li H *et al.* 2009).

Dans les formulations oculaires, SLN et NLC présentent un temps de rétention accru et une absorption accrue pour différents types de médicaments - tobramycine, cyclosporine A et timolol. Le SLN chargé de diclofénac aurait montré une libération prolongée et une plus grande perméabilité après des tests sur la cornée humaine.

Ces dernières années, SLN et NLC ont retenu une attention croissante dans le domaine de la thérapie génique en tant que supports alternatifs prometteurs pour des lipides cationiques en raison de leur absorption rapide par les cellules et la protection du composé incorporé contre la dégradation chimique.

2.1.1.3.7 Nanotubes de carbone (NTC ou CNT en anglais)

Les nanotubes de carbone sont une forme allotropique du carbone appartenant à la famille des fullerènes. Ils sont composés d'un ou plusieurs feuillets d'atomes de carbone enroulés sur eux-mêmes formant un tube. Le tube peut être fermé ou non à ses extrémités par une demi-sphère. On distingue les nanotubes de carbone simple-feuillet (SWNT ou SWCNT, pour Single-Walled (Carbon) Nanotubes) et multi-feuillets (MWNT ou MWCNT, pour Multi-Walled (Carbon) Nanotubes). Les conductivités électriques, conductivités thermiques et résistances mécaniques des nanotubes de carbone sont remarquablement élevées dans leur sens longitudinal. Ils font partie des produits issus des nanotechnologies actuellement utilisés et commercialisés dans différents domaines (Beg *et al.* 2011). La biocompatibilité des nanotubes peut être améliorée par modification chimique de leur surface. Cela peut être mis en œuvre par exemple par greffage covalent de dendrimères PAMAM (Zhang B *et al.* 2010), copolymères diblocs amphiphiles (Di Crescenzo *et al.* 2011), ou de PEG (Bhirde *et al.* 2010). Il existe trois façons « d'immobiliser » une substance active au niveau des nanotubes de carbone, qui sont: l'encapsulation d'un médicament dans le nanotube de carbone (Arsawang U *et al.* 2011 / Tripisciano *et al.* 2010), l'adsorption chimique en surface ou dans les espaces entre les nanotubes (par des interactions électrostatiques, hydrophobes, π - π et par liaisons hydrogènes)

(Chen *et al.* 2011), et fixation d'agents actifs à des nanotubes de carbone fonctionnalisés (f-CNT). La libération de la substance active du nanotube peut être contrôlée de façon chimique ou électrique.

Le

Tableau 5 recense des exemples de substances actives immobilisées sur des nanotubes de carbone

Tableau 5 : Utilisation des nanotubes de carbone comme vecteur de substance active

Type de nanotube	Substance active	Méthode d'immobilisation
MWCNTs	Cis-platine	encapsulation
f-CNTs	Amphotéricine B	conjugaison
SWCNTs	gemcitabine	encapsulation
MWNTs	Chlorhydrate d'épirubicine	adsorption
MWCNTs	dexaméthasone	encapsulation

2.1.1.3.8 Particules métalliques

De nombreuses nanoparticules ont été synthétisées à partir de divers métaux mais celles d'argent et d'or restent d'une importance primordiale pour leur utilisation biomédicale. Un grand nombre de ligands ont été liés à ces nanoparticules telles que des sucres, des peptides, des protéines mais aussi de l'ADN.

Bien que les nanoparticules métalliques présentent un potentiel d'utilisation assez large (détection, imagerie, thérapeutique...), il faut néanmoins nuancer ce point de vue car les nanoparticules avec des propriétés magnétiques, ont tendance à s'agréger, formant alors des clusters de grandes tailles, et perdant de ce fait les propriétés spécifiques liées à leurs petites dimensions et rendant leur manipulation plus difficile. De plus, le « moment » magnétique peut ne pas être assez fort pour surmonter la force du flux sanguin et pour accumuler les particules seulement au niveau du site ciblé (Neuberger *et al.* 2005). Par conséquent, la conception de systèmes d'administration de substance active basée sur des nanoparticules magnétiques, nécessite de prendre en considération de nombreux facteurs, tels que par exemple, les propriétés magnétiques et la taille des particules, la force du champ magnétique, la capacité de « chargement » en principe actif (drug loading), le lieu d'accessibilité du tissu cible ou le débit sanguin. Selon les propriétés magnétiques, les nanoparticules métalliques peuvent être divisées en métaux purs (tels que le cobalt Meng *et al.* 2011), le nickel (Kale *et al.* 2012), le manganèse (Sayed *et al.* 2011 /) et le fer (Smolensky *et al.* 2011), alliages et oxydes.

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont reçu une AMM par la FDA et EMA. Ces nanoparticules ont comme caractéristiques :

- ✓ D'être faciles à synthétiser (une seule étape de fabrication par co-précipitation alcaline de Fe²⁺ + et Fe³⁺ + (Figuerola *et al.* 2010) ;
- ✓ Une stabilité chimique dans des conditions physiologiques ;
- ✓ La possibilité d'être modifiées chimiquement au niveau de leur surface par des polymères (Choucka *et al.* 2010), des organosilanes (Chang *et al.* 2008) ou des molécules dendrimériques (Pan *et al.* 2005).

Attacher une substance active à une nanoparticule magnétique peut se faire par différents moyens :

- ✓ La formation d'une liaison covalente (Figuerola *et al.* 2010) ;
- ✓ Des interactions électrostatiques entre la nanoparticule et la substance active (Figuerola *et al.* 2010) ;
- ✓ Par phénomène d'adsorption (Yallapu *et al.* 2011) ;
- ✓ Par un processus d'encapsulation (Wu *et al.* 2010).

Le ciblage des nanoparticules magnétiques vers leur cible, peut être effectué par un mécanisme actif ou passif. Comme rappelé précédemment, le ciblage passif est le résultat d'une meilleure perméabilité vasculaire et de rétention (EPR) des tissus tumoraux. La stratégie active repose sur l'attraction de la nanoparticule sur le site dédié en utilisant des ligands de reconnaissance (par exemple, des anticorps) attachés à la surface des nanoparticules et par l'utilisation d'un champ magnétique externe.

Les nanoparticules magnétiques ont été utilisées simultanément en tant que biocapteurs (diagnostic) et vecteurs de médicaments (thérapie). L'utilisation concomitante d'imagerie par résonance magnétique ou magnéto-fluorescente et de thérapie ciblée (*via* la conjugaison de fractions de ciblage) peut améliorer l'efficacité de la thérapie contre le cancer. Cette stratégie est aussi appelée théranostique qui est définie comme le développement de nanoparticules permettant à la fois l'imagerie médicale pour le diagnostic et la libération d'un principe actif dans l'organisme.

Les nanoparticules magnétiques ont également été testées pour le traitement de la thrombose. Il est à noter que le traitement traditionnel thrombotique est souvent associé à des effets secondaires graves, tels que des complications hémorragiques. Afin d'éliminer ces problèmes, un activateur du plasminogène tissulaire (tPA = tissue plasminogen activator / protéine impliquée dans la dissolution des caillots sanguins) a été couplé de manière covalente à des nanoparticules magnétiques silanisées (Kempe H, Kempe M 2010) et chitosan-modifiées (Chen *et al.* 2011). Ainsi, il a été montré que les nanoparticules ferromagnétiques conjuguées avec tPA induisaient une hémolyse négligeable et les études initiales sur un modèle de porc ne révèlent aucun effet indésirable à court terme. L'effet hémolytique de la silice est bien connu et a été attribué à son activité de « donneur » d'hydrogène dans les interactions avec les phospholipides les

membranes cellulaires et à l'implication de ses groupes de silanol de surface dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.

En revanche, les nanoparticules ferromagnétiques recouvertes de En outre, une étude préliminaire suggère que les conjugués peuvent être utiles pour la lyse magnétiquement ciblée de la thrombose intra-stent.

Le Tableau 6, ci-dessous, résume différents modèles de nanoparticules magnétiques utilisées :

Tableau 6 : Nanoparticules magnétiques utilisées comme vecteurs

Substance active	Indication thérapeutique	Nanovecteur (cœur @ fonctionnalisation de surface)
Ciprofloxacine	Anti-infectieux	Fe ₃ O ₄ @poly(vinyl alcohol)-g-poly(methyl methacrylate)
Gemcitabine	Cancer chimiothérapie	Fe ₃ O ₄ @poly(ethylene glycol)
Doxorubicine	Agent antinéoplasique	Fe ₃ O ₄ @gelatin
5-Fluorouracile	anticancéreux	Fe ₃ O ₄ @ethylcellulose
Cis-platine	Cancer chimiothérapie	Fe ₃ O ₄ @poly ε-caprolactone
Paclitaxel	Inhibiteur mitotique utilisé en chimiothérapie	Fe ₃ O ₄ @poly[aniline-co-sodium N-(1-butyric acid)
tPA	thrombose	Fe ₃ O ₄ @chitosan
Dopamine	Maladie de Parkinson	Fe ₃ O ₄ @silica

2.1.1.3.9 Les hydrogels (nanogels)

Un hydrogel consiste en un assemblage de chaînes macromoléculaires réticulées constituant une structure tridimensionnelle capable d'encapsuler des molécules actives. C'est un type de matériau comportant une composante liquide et une composante solide. Il a diverses applications biomédicales notamment dans la libération de médicaments et dans le traitement de brûlures cutanées et peut-être imprimé en 3D. La réticulation peut être chimique (cas des gels permanents) ou physique (cas des gels réversibles). Lorsque de telles structures sont mises au contact de solvants thermodynamiquement compatibles, les chaînes polymères se relaxent. Ceci est uniquement possible lorsque la température de travail est au-dessus de la T_g (température de transition vitreuse) du polymère utilisé (Bajpai, A.K *et al.* 2008). La température de transition vitreuse d'une matière est souvent décrite comme représentant l'intervalle de température à travers lequel la matière passe d'un état caoutchouteux à un état vitreux, solide (rigide).

Dans le cas des hydrogels permanents, la structure est capable de gonfler en présence d'eau mais ne se dissout pas complètement (Díez-Peña, E *et al.* 2002/ Annaka, M *et al.* 2002 / Varga, I *et al.* 2001).

Les hydrogels réversibles sont une classe d'hydrogels capables de se transformer de façon réversible en solution sous l'application d'un stimulus. Ce type de transition, appelée sol-gel, s'explique par la progressive disparition des nœuds de réticulation de la structure par l'altération des interactions intra-chaînes les constituant. Dans ce cas, le stimulus entraîne une transition de phase et non un changement de dimension de la structure des hydrogels, leur donnant notamment la particularité d'être injectables (Guan, J *et al.* 2008 / Hatefi, A.; Amsden, B. 2002 / Lin, H. H.; Cheng, Y. L. 2001 / Jeong, B. *et al.* 1997).

✓ Nanogels formés à partir de chitosan

D'un point de vue technique, pour son utilisation comme vecteur de substances médicamenteuses, il est important que le chitosan soit hydrosoluble et chargé positivement. Ces propriétés permettent à ce polymère d'interagir avec des polymères chargés négativement, des macromolécules, et même avec certains polyanions lors du contact dans un environnement aqueux. Ainsi, ces forces interactives et les étapes de transition sol-gel résultantes ont été exploitées à des fins de nano-encapsulation (Shutava *et al.* 2006 / Fan *et al.* 2006). D'autre part, le chitosan a la particularité de pouvoir adhérer aux surfaces des muqueuses dans le corps, une propriété qui a donc suscité l'attention de différentes équipes de recherche pour étudier la libération de substances actives au niveau des muqueuses (Pandey *et al.* 2005 / Lehr *et al.* 1992).

Les nanogels formés à partir de chitosan peuvent se décliner en deux catégories:

- Avec réticulations covalentes (Oya *et al.* 1994),
- Avec réticulations ioniques (Dung *et al.* 2007 / Gan *et al.* 2005 / Pan *et al.* 2002).

✓ Nanogels formés à partir d'alginate

L'acide alginique est un biopolymère anionique constitué de chaînes linéaires d'acide α -L-glucuronique et d'acide β -D-mannuronique possédant des propriétés telles qu'un degré élevé de solubilité en solution aqueuse, une tendance à la gélification (avec une grande porosité des gels résultants), une biocompatibilité et une toxicité limitée.

En 1993, Rajaonarivony a proposé un nouveau « support » composé d'alginate de sodium. Celui-ci était composé des nanoparticules d'alginate avec un large éventail de tailles de particules (250-850 nm), formées dans une solution d'alginate de sodium après l'addition de chlorure de calcium suivie de poly-L-lysine. Dans cette étude, les concentrations des solutions de polymère et de contre-ion étaient plus faibles que celles utilisées régulièrement pour la formation de gel. Avec la doxorubicine comme médicament modèle, cette équipe a montré que la capacité d'encapsulation pouvait atteindre plus de 50 mg pour 100 mg d'alginate.

Depuis la fin des années 1990, le nombre d'études impliquant l'utilisation de NPs à base d'alginate a augmenté (Yi Y.M. *et al.* 1999 / / Aynié I. *et al.* 1999), en utilisant les agents thérapeutiques tels que l'insuline (Sarmiento B. *et al.* 2006 / Sarmiento B. *et al.* 2007 / C.P. Reis *et al.* 2007), les antituberculeux et

les antifongiques (Z. Ahmad *et al.* 2006 / R. Pandey *et al.* 2006 / Z. Ahmad *et al.* 2005), et il a même été montré un certain intérêt dans le domaine de la thérapie génique (K.L. Douglas *et al.* 2006).

- ✓ Nanogels formés à partir de poly (vinyl alcohol) PVA

Les composites à structure hétérogène impliquant les PVA ont suscité un vif intérêt comme par exemple les polyesters biodégradables constitués de courtes chaînes de poly (lactone) greffées à du PVA qui sont utilisés comme une nouvelle classe de polyesters en « peigne » (structure intermédiaire entre la forme linéaire-ramifiée) solubles dans l'eau. Ces polymères ont la particularité de s'auto-réarranger spontanément pour former des nanostructures capables de former des complexes stables avec un certain nombre de protéines (par exemple sérum albumine humaine, etc.). De plus, le développement de telles nanostructures ne nécessite pas l'usage de solvants ni de surfactants. Divers dérivés du PVA, tels que PLGA, ont été par la suite testés dans divers registres comme par exemple la libération locale de paclitaxel par l'intermédiaire de l'utilisation de nanogel de NP-PGA-g-PLGA dans le traitement de Resténose (Westedt *et al.* 2007).

Il existe d'autres nanogels formés à partir de différents types de polymères :

- ✓ Poly (oxide d'éthylène) et poly (éthylène-immine),
- ✓ Poly (vinyl pyrrolidone),
- ✓ Poly-N-isopropylacrylamide.

2.1.1.3.10 Nanosilice

Les nanoparticules de silice présentent plusieurs avantages pour leur utilisation comme agent de vectorisation, tels qu'une bonne biocompatibilité, un réseau hautement poreux et une facilité en termes de fonctionnalisation (Amato G 2010). Parmi les nanoparticules inorganiques, les matériaux de silice sont les supports qui ont le plus souvent été choisis à des fins biologiques (Slowing I *et al.* 2007).

Les matériaux de silice utilisés dans les systèmes d'administration contrôlée de médicaments sont les xérogels (Czarnobaj K 2008) et les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN).

Un xérogel est un matériau à réseau macromoléculaire d'oxydes, vitreux, fabriqué par le procédé sol-gel (abréviation de « solution-gélification ») et en général plus dense et moins macroporeux qu'un aérogel.

La silice mésoporeuse est un nanomatériau présentant un réseau organisé de « canaux » constitués de pores de tailles variables (2-30 nm), ce qui lui confère une surface spécifique particulièrement grande, d'où un grand intérêt en catalyse. La méthode de synthèse classique est un mécanisme d'auto-assemblage coopératif, CTM (Cooperative Templating Mechanism). Cette méthode de synthèse consiste en une polycondensation d'un précurseur inorganique de type SiO_4^{2-} autour de micelles de tensioactifs. La concentration des tensioactifs est choisie de façon à atteindre une CMC (Concentration Micellaire Critique)

pour laquelle les tensioactifs vont s'organiser en un réseau hexagonal de micelles cylindriques autour desquelles va se former le polymère de silice. L'élimination des tensioactifs après formation de la structure de silice permet d'obtenir une silice mésoporeuse.

Comme il a été précédemment indiqué, la méthode « sol-gel » est la méthode la plus fréquemment utilisée pour intégrer des SAs aux xérogels (Czarnobaj K, 2008), on note parmi les SAs utilisées la phénytoïne (Fidalgo A *et al.* 2009), le cisplatine (Czarnobaj K, Lukasiak J, 2007), la doxorubicine (Prokopowicz M, 2010), le diclofénac (Czarnobaj K, Czarnobaj J, 2008), l'héparine (Ahola MS *et al.* 2001).

Les nanosilices mésoporeuses (MSNs) possèdent, par rapport aux xérogels, une structure plus homogène, une polydispersité plus faible et une surface plus élevée pour l'adsorption (chimique ou physique) de substances à des fins thérapeutiques ou de diagnostic (Di Pasqua AJ *et al.* 2009).

Par ces types procédés, divers types substances ont pu être incorporées dans les MSN comme des médicaments anticancéreux (Di Pasqua AJ *et al.* 2009 ; He Q *et al.* 2011), des antibiotiques (Li Z *et al.* 2010) et des substances contre les maladies cardiovasculaires (Popovici RF *et al.* 2011). Il est à noter que la libération de la SA se fait alors par un système de diffusion. Grâce à leur structure, les MSN ont la capacité de pouvoir incorporer à la fois des petites molécules (Di Pasqua AJ *et al.* 2009) ou de macromolécules (Kim TW *et al.* 2011), leur permettant ainsi d'avoir été testées dans diverses thérapeutiques telles que la thérapie génique (Slowing I *et al.* 2008).

2.1.1.4 Action de la nanoparticule au site de ciblage

Une fois qu'il a atteint son site d'action, le nanovecteur peut alors procéder à la libération de son contenu ou la nanoparticule peut être activée. Ces mécanismes sont engendrés par un stimulus soit endogène (diminution du pH ou présence d'enzymes spécifiques au sein des tissus cancéreux), soit exogène par augmentation locale de température ou par l'application d'un champ magnétique extracorporel, d'ultrasons ou de photons capables de déstructurer le nanovecteur ou d'en modifier l'organisation supramoléculaire.

Seuls les stimuli externes seront rapidement présentés car ils nécessitent le développement de techniques complexes.

Les différents types de stimuli externes rapportés sont décrits ci-dessous.

2.1.1.4.1 Par application d'un champ électrique

Les techniques utilisant un champ électrique permettent la libération d'un principe actif encapsulé dans un polymère de type électrolyte contenant un grand nombre de groupements ionisables. De tels polymères sont à la fois pH-sensibles et électro-sensibles. Sous l'application d'un champ électrique, ces systèmes ont tendance à gonfler ou se contracter en raison de mouvements d'ions et permettent la libération d'un principe actif préalablement encapsulé.

2.1.1.4.2 Par irradiation

La libération d'un principe actif par irradiation suppose le couplage d'un vecteur avec une molécule photosensible et peut se faire de deux façons. La première possibilité implique une molécule photosensible capable de se dissocier sous forme ionique lors de l'application de rayonnements UV. Il en résulte une augmentation de la pression osmotique du vecteur conduisant à son gonflement. La seconde possibilité consiste à introduire un chromophore capable d'absorber la lumière puis de la dissiper sous forme de chaleur. Ainsi, couplé à un vecteur thermosensible, l'application de rayons UV peut permettre la diffusion d'un principe actif hors du vecteur.

2.1.1.4.3 Par application d'un champ magnétique

Les nanoparticules magnétiques (magnétite, maghémite, pérovskite,...) permettent d'envisager l'établissement de systèmes de relargage ciblé prometteurs. En effet, en plus d'être détectables par imagerie IRM, les particules magnétiques sont capables de générer de la chaleur localement sous l'application d'un champ magnétique. L'échauffement ainsi émis dépend alors de la taille des particules ainsi que de leurs propriétés magnétiques. Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) et de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont les plus utilisées en raison de leur compatibilité avec les milieux biologiques et de leurs propriétés magnétiques adaptées à l'application au biomédical.

2.1.1.4.4 Par action de la chaleur

La température est un des stimuli les plus utilisés et étudiés. La raison d'un tel intérêt est tout d'abord la possibilité de libérer un principe actif dans le corps humain de façon non sélective, sans stimulus externe : la température du corps (37°C) augmentant en présence d'agents pathogènes ($39\text{-}42^\circ\text{C}$ dans le cas de tumeurs), cette déviation peut être utilisée pour activer le relargage uniquement au niveau des zones infectées. Cependant, la température du corps pouvant varier (cas d'une simple fièvre), le traitement de pathologies plus sérieuses peut s'avérer complexe suivant la sensibilité du système thermosensible. Dans ce cas, la température peut être utilisée comme stimulus externe appliqué localement.

La thermosensibilité de certaines macromolécules peut s'expliquer par différentes caractéristiques des polymères telles que leurs propriétés physico-chimiques en solution, leur température de transition vitreuse (cas des polymères amorphes) ou encore leur température de fusion (cas de polymères semi-cristallins). Toutes ces propriétés sont relatives à une température critique.

- On parle de LCST (Lower Critical Solution Temperature) pour décrire la température au-delà de laquelle un polymère n'est plus soluble dans une solution donnée (l'eau dans le cas des milieux physiologiques). En dessous de la LCST, la contribution enthalpique domine et entraîne la formation de liaisons hydrogène entre l'eau et les groupements polaires de la chaîne macromoléculaire permettant ainsi au polymère d'être à l'état dissous dans l'eau. Au-delà de la LCST, la contribution entropique l'emporte et entraîne la multiplication des interactions hydrophobiques intra-chaînes.

- On parle d'UCST (Upper Critical Solution Temperature) pour décrire la température au-dessus de laquelle un polymère n'est plus soluble dans une solution donnée.
- Enfin, on parle de température de transition vitreuse (Tg) dans le cas d'un polymère seul pour désigner la température au-dessus de laquelle les chaînes sont mobiles.

2.1.2 Secteurs d'utilisation, produits en développement et sur le marché

De nombreux efforts de recherche ont été réalisés en vue du développement de nanomédecines de nouvelle génération pour le ciblage spécifique par la liaison du ligand de surface et des récepteurs actifs à la surface des cellules ciblées. Le premier nanomédicament approuvé par la FDA était le Doxil® (1995), une formulation liposomale PEGylée chargée de doxorubicine pour le traitement du cancer. Vingt ans après son approbation, ce médicament continue d'être largement utilisé et constitue le modèle des «nanodrugs» injectables et des systèmes de « drug-delivery » de médicaments.

En Europe, la première nanomédecine approuvée était Ambisome® (1990). Ce produit est basé sur des liposomes chargés d'Amphotéricine B pour les infections fongiques systémiques.

Cependant, des preuves récentes ont démontré qu'une formulation d'oxyde de fer nanoparticulaire pour administration intraveineuse, utilisée depuis les années 1960, a été classée par erreur comme une solution d'oxyde de fer.

Comme le montre la Figure 6, la grande majorité des produits sous forme nanoparticulaire sont en développement et notamment en phases 1 et 2. Bien évidemment on retrouve une utilisation massive de ces nanoproduits en oncologie.

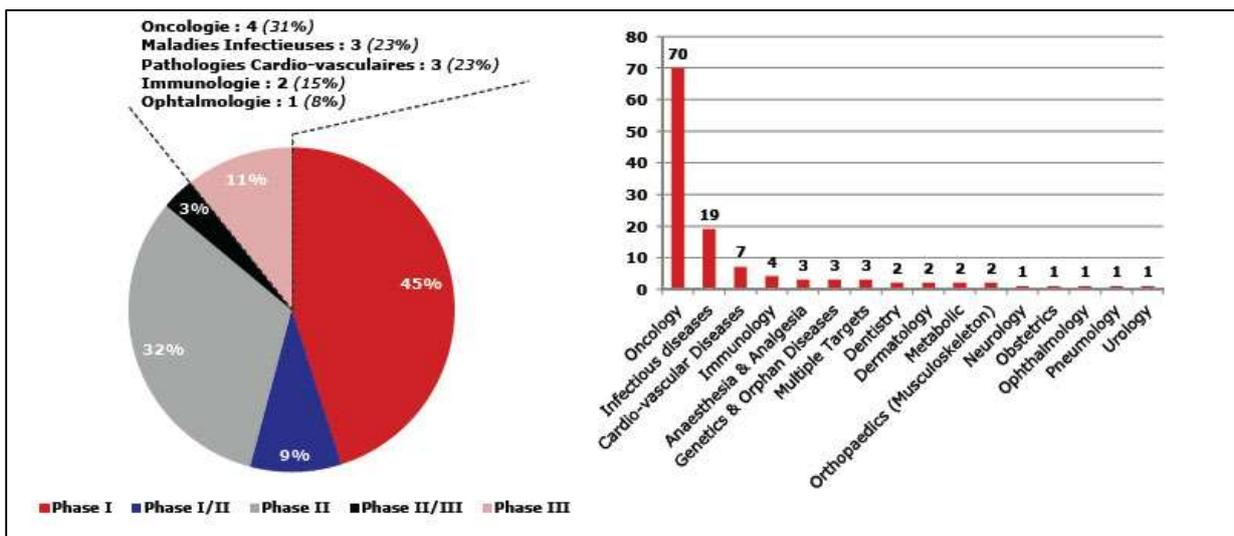


Figure 6 : Répartition de l'utilisation de nanomédicaments selon les gammes thérapeutiques et la phase clinique

2.1.2.1 Oncologie

2.1.2.1.1 Chimiothérapie et vectorisation

La vectorisation de médicaments dans le cancer est importante pour optimiser l'effet des médicaments et réduire les effets secondaires toxiques.

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) lié à des nanocristaux d'or a été testé dans le but de mesurer son efficacité sur des animaux ayant une charge tumorale. Ceci constitue la base d'une nouvelle formulation du puissant anticancéreux TNF- α , qui détruit les tumeurs, mais qui est également très toxique pour les tissus sains. En couplant le TNF- α à de l'or colloïdal, une thérapie anticancéreuse plus efficace et moins toxique est espérée par une technique ciblée d'adressage du TNF- α .

L'Abraxane® est commercialisé pour le traitement du cancer du sein après l'échec de la chimiothérapie combinée pour une maladie métastatique ou une rechute dans les 6 mois de chimiothérapie adjuvante. La SA est le paclitaxel sous forme de particules liées à de l'albumine dans une suspension injectable. Ce médicament est basé sur la technologie des nanoparticules, qui intègre des protéines biocompatibles avec des médicaments pour créer la forme nanoparticulaire du médicament ayant une taille d'environ 100 à 200 nm ; cela dans le but de surmonter les problèmes d'insolubilité rencontrés avec le paclitaxel. L'Abraxane® permet d'administrer des doses plus élevées de paclitaxel, ce qui peut expliquer en partie l'augmentation de l'activité antitumorale. De plus, l'albumine permet généralement le transport des éléments nutritifs aux cellules et s'est révélée s'accumuler dans des tumeurs en croissance rapide. Par conséquent, l'efficacité accrue d'Abraxane® peut également être due à un meilleur ciblage des cellules cancéreuses grâce à l'albumine.

Plusieurs nanosystèmes injectables et biodégradables ont été synthétisés par incorporation d'anti-œstrogènes dans les nanoparticules et des liposomes. Ainsi, des nanosphères et des nanocapsules incorporant des quantités élevées de 4-hydroxy-tamoxifène (4-HT) ou RU 58668 ont été testées. Il a été montré que l'activité apoptotique (dans plusieurs lignées cellulaires à myélome multiple) de liposomes contenant de RU 58668 pouvait être augmentée lorsque le ratio SA-lipide était optimisé. Ces lignées cellulaires expriment des sous-types alpha et bêta de récepteur aux œstrogènes. Ces liposomes, administrés par voie intraveineuse dans un modèle animal, ont induit l'arrêt de la croissance tumorale. Ainsi, la « drug-delivery » de médicaments ciblant les œstrogènes augmente leur capacité à arrêter la croissance des tumeurs, ce qui représente un intérêt particulier par exemple pour le traitement du cancer du sein hormono-dépendant. De plus, cette méthode représente une approche thérapeutique puissante dans le cadre du myélome multiple.

Les oligonucléotides antisens présentent de nombreux problèmes concernant leur administration. Ainsi, les nanoparticules constituées d'albumine humaine et contenant différents oligonucléotides antisens ont été utilisées pour faciliter la vectorisation vers les tumeurs.

Le développement de formulations liposomales moins toxiques de cisplatine a été entravé par la faible solubilité dans l'eau et la faible lipophilie du cisplatine, ce qui a donné une efficacité d'encapsulation très faible. Un procédé permet l'encapsulation efficace du cisplatine dans une formulation lipidique; Il est basé sur un processus de congélation et de décongélation répétée d'une solution concentrée de cisplatine en présence de phospholipides chargés négativement. Les nanocapsules ainsi formées ont une cytotoxicité *in vitro* jusqu'à 1000 fois plus élevée que la SA seule.

Les nanoparticules biodégradables revêtues de PEG peuvent être couplées à de l'acide folique pour cibler la protéine liant le folate. Cette molécule est la forme soluble du récepteur du folate qui est surexprimée à la surface de nombreuses cellules tumorales. Ainsi, les nanoparticules liées au folate représentent un nanovecteur potentiel pour le ciblage sélectif des cellules tumorales. Les nanoparticules de polycyanoacrylate biodégradables revêtues de PEG conjuguées à la transferrine pourraient également être un support efficace pour la vectorisation de paclitaxel.

Au total différents nanosystèmes sont utilisables : nanoparticules métalliques, dendrimères, liposomes etc.

2.1.2.1.2 Radiothérapie

La radiothérapie ainsi que la chirurgie et la chimiothérapie sont les principales stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer. La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers. Elle consiste à utiliser des rayonnements (on dit aussi rayons ou radiations) pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. Elle a comme inconvénient la possibilité de léser les tissus sains environnants. De plus, certaines cellules tumorales sont plus éloignées du site de rayonnement et pourraient donc recevoir une intensité inférieure du faisceau de rayonnement. En outre, les cellules peuvent développer une résistance au rayonnement. Habituellement, la sensibilité des cellules tumorales mitotiquement actives est seulement légèrement supérieure à celle des tissus sains environnants. Du fait du développement de la résistance des cellules tumorales au rayonnement, il est nécessaire d'utiliser des doses plus élevées qui conduisent à la mort du tissu sain limitrophe.

Des approches multiples ont été utilisées pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie tout en réduisant la toxicité.

Ainsi, trois principales approches sont possibles :

✓ **Améliorer la radiosensibilisation des tissus tumoraux;**

Au cours des dernières années, on a constaté un intérêt considérable pour l'utilisation de formulations pour améliorer les effets radiothérapeutiques, en particulier en utilisant des nanoparticules de métal (principalement de l'or) (Herold DM *et al.* 2000). Les particules métalliques « densément emballées »

peuvent disperser et / ou absorber sélectivement les rayonnements gamma / rayons X à haute énergie. Cela permet un meilleur ciblage des composants cellulaires dans les tissus tumoraux permettant des lésions plus localisées et consolidées. La diffusion photoélectronique lors de l'exposition de la surface des métaux à l'irradiation gamma est également proposée comme mécanisme d'activité améliorée. Une combinaison de tous ces phénomènes aboutit à une réduction de la dose de rayonnement thérapeutique limitant davantage les dommages aux tissus sains. L'utilisation de radiosensibilisateurs nanomatériaux est également appelée Nanoparticle Enhanced X-ray Therapy (NEXT).

L'utilisation de nanoparticules d'or a été largement développée car :

- Les nanoparticules d'or améliorent l'effet du rayonnement sur une grande zone de tumeur éliminant ainsi le besoin des nanoparticules d'être délivrées à toutes les cellules du tissu tumoral ;
- Les nanoparticules sont connues pour avoir une clairance systémique faible par rapport aux agents de contraste de faible poids moléculaire tels que l'iode laissant suffisamment de temps au matériau « photosensibilisant » pour être absorbé dans le tissu tumoral ;
- Les nanoparticules sont bien connues pour être bien absorbées dans les circulations systémiques, une meilleure perméation dans le tissu tumoral. Ceci avec un taux de clairance plus faible entraîne un effet amélioré de perméation et de rétention (EPR) ;
- En attachant des ligands spécifiques tels que des anticorps, un grand nombre des atomes d'or peut être spécifiquement dirigé vers le tissu tumoral par rapport à ce qui serait obtenu avec une utilisation classiques de solutions d'iode ;
- Il est beaucoup plus facile d'effectuer des études pharmacocinétiques avec les nanoparticules d'or car elles sont faciles à visualiser et à quantifier. Ainsi, les niveaux de dose peuvent être optimisés pour obtenir les meilleurs résultats.

D'autres agents radio-sensibilisants comme l'oxyde de Gadolinium (irradiation rayons X Hainfeld et coll., 2010), les nanoparticules d'argent, de dioxyde de titane, d'oxyde de fer ont été testés. Ces nanoparticules peuvent alors induire après activation par rayonnement, des effets cytotoxiques dus à la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*), ce qui entraîne des dommages au niveau de l'ADN et d'autres organelles cellulaires.

D'autres nanoparticules non-métalliques ont été testées comme agent radio sensibilisant comme par exemple les nanoparticules de silice, les fullerènes C₆₀ etc.

✓ **Diminuer la résistance au rayonnement dans le tissu tumoral;**

Différents médicaments et stratégies de traitement sont conçus de manière à cibler ces voies spécifiques rendant les cellules cancéreuses plus sensibles à la radiothérapie. La survivine est une de ces protéines cibles qui est surexprimée dans la plupart des tumeurs humaines, mais ses taux sont à peine détectables dans les tissus normaux. Cette protéine intervient comme régulateur de la division cellulaire, de l'apoptose, de la réponse au stress cellulaire, et aussi de la migration cellulaire et des métastases.

L'augmentation de l'expression de la survivine a été directement liée à la résistance acquise aux agents chimiothérapeutiques ainsi qu'à la radiothérapie. Ainsi, de nombreuses recherches mettant en jeu des nanoparticules d'oxyde de fer couplées à des siRNA ciblant la survivine sont en cours d'élaboration. Une autre cible majeure pour l'inversion de la résistance aux rayonnements est le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Il a été montré que les traitements anti-EGFR augmentaient l'activité thérapeutique de la radiothérapie.

✓ **Améliorer la radiorésistance du tissu sain proche de la tumeur.**

Les principales cibles de la radiothérapie sont l'eau et l'ADN. Malheureusement elles sont également présentes dans les tissus sains, ce qui les rend sensibles aux blessures et aux dommages importants si les rayons ne sont pas dirigés correctement vers le tissu ciblé. L'efficacité de la radiothérapie peut être augmentée et ses effets indésirables diminuent si, d'une certaine façon, les tissus sains environnants peuvent être protégés contre ces dommages ou rendus moins sensibles aux radiations. Certains composés naturels tels que la curcumine exercent un double mode d'action après irradiation en fonction de sa dose (Jagetia GC 2007). La curcumine protège les cellules contre les effets néfastes du rayonnement en réduisant le stress oxydatif et l'inhibition de la transcription des gènes liés au stress oxydatif et aux réponses inflammatoires. Ces effets de radiosensibilisation dans les cellules cancéreuses peuvent être dus à une régulation positive des gènes responsables de la mort cellulaire. L'amifostine est un adjuvant cytoprotecteur utilisé en chimiothérapie du cancer impliquant des agents chimiothérapeutiques liant l'ADN. L'administration orale d'amifostine n'a pas montré d'activité radioprotectrice significative, toutefois, l'utilisation de polymères nanoparticulaires contenant de l'amifostine a montré une forte radiorésistance après administration orale (Pamujula S *et al.* 2005). Il avait été également montré que l'amifostine restaure l'activité transcriptionnelle de p53 augmentant les réponses apoptotiques au rayonnement (Maurici D *et al.* 2001).

2.1.2.2 *Maladies neurodégénératives*

Une des applications les plus importantes des nanotechnologies réside dans le traitement des troubles neurodégénératif. Le traitement non invasif efficace des maladies neurologiques est souvent limité par le faible accès des agents thérapeutiques au système nerveux central (SNC). La majorité des médicaments et des agents biotechnologiques ne pénètrent pas facilement dans le parenchyme cérébral en raison de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Par conséquent, l'un des défis les plus importants auxquels est confronté le développement des médicaments du SNC est la disponibilité d'une technologie de ciblage cérébral efficace. Les progrès récents en nanotechnologie ont fourni des solutions prometteuses à ce défi. Pour la « drug-delivery » de thérapeutiques au niveau du SNC, différentes nanostructures telles que des dendrimères, des nano gels, des nanoémulsions, des liposomes, des nanoparticules polymères, des nanoparticules lipidiques solides et des nanosuspensions, ont été étudiées. Le transport de ces nanomédicaments a été effectué sur divers modèles de BHE *in vitro* et *in vivo* par endocytose et / ou transcytose. Des succès précoces ont été montrés au niveau du stade préclinique dans le management de la maladie d'Alzheimer, des tumeurs cérébrales, d'encéphalopathie suite à une infection au VIH, et

l'ischémie cérébrale aigue. Néanmoins ces nanomédicaments peuvent être optimisés en améliorant leur perméabilité à la BHE et en réduisant leur neurotoxicité.

Par exemple, afin de minimiser les effets secondaires périphériques des formes classiques de la maladie de Parkinson, la recherche porte sur la conception, la simulation biométrique et l'optimisation de dispositif (NESD= intracranial nano-enabled scaffold device) permettant une libération spécifique de dopamine au niveau du cerveau. Les peptides et les nanoparticules peptidiques sont des outils plus récents pour diverses maladies du SNC.

Dans le cadre des recherches sur la maladie d'Alzheimer, les produits expérimentaux suivants ont été testés :

- Nanoparticules de n-butylcyanoacrylate pour la libération de dérivés de la quinoline,
- Nanoencapsulation du marqueur fluorescent Thioflavine-T (ThT) pour la détection des plaques de β -amiloïde,
- Nanoparticules d'or pour la destruction de fibrilles de β -amiloïde.

2.1.2.3 Antibiothérapie

L'éradication de certaines infections bactériennes telles que la tuberculose reste difficile en raison des mécanismes complexes de l'agent pathogène dans la déstabilisation du système immunitaire de son hôte, ainsi que des barrières qui empêchent les antibiotiques d'atteindre les sites d'infection. Les antibiotiques très puissants, y compris certains aminoglycosides et fluoroquinolones, génèrent des effets indésirables graves et ne sont réservés qu'aux infections graves. L'émergence de la résistance aux antibiotiques a généré des inquiétudes majeures, menaçant de retarder la progression contre une gamme de maladies infectieuses.

L'infection bactérienne augmente la perméabilité vasculaire, ce qui rend possible le ciblage passif. Ces caractéristiques de l'infection bactérienne suggèrent que l'effet amélioré de perméation et de rétention (EPR) peut être exploité par des nanoparticules pour une administration ciblée d'antibiotiques. Les bactéries pathogènes conservent une charge superficielle négative dans les conditions physiologiques. Ainsi, les nanoparticules cationiques sont susceptibles de pouvoir se lier à des bactéries *via* des interactions électrostatiques pour un ciblage bactérien efficace (Dillen K *et al.* 2008). Cette stratégie est attrayante pour son effet multivalent et sa capacité à cibler les infections polymicrobiennes.

En conséquence, une gamme diversifiée de polymères et de peptides bactéricides a été incorporée dans diverses nanostructures pour des applications antibactériennes (Kenawy E-R *et al.* 2007). Plus important encore, la formulation de nanoparticules peut augmenter la charge locale et les densités de masse des composants bactéricides, aboutissant à un indice thérapeutique amélioré. Par exemple, une nanoparticule peptidique cationique auto-assemblée a montré de fortes propriétés antimicrobiennes tout en induisant une toxicité systémique minimale (Liu L *et al.* 2009).

Le ciblage actif avec des ligands de liaison pathogène directement conjugués à la surface des nanoparticules est une autre stratégie visant à cibler les bactéries. Par exemple, de petites molécules telles que la vancomycine ont été conjuguées aux surfaces des dendrimères (Choi SK *et al.* 2013), de nanoparticules d'oxyde de fer (Choi K-H *et al.* 2012), de nanoparticules d'or (Gu HW *et al.* 2012), et de nanoparticules de silice poreuse (Qi G *et al.* 2013), ce qui a permis une liaison préférentielle des nanoparticules aux bactéries Gram-positives. Les nanoparticules polymériques conjuguées à des lectines spécifiques de mannose ou spécifiques de fructose ont montré une affinité de liaison améliorée aux récepteurs de surfaces de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ce qui suggère une approche prometteuse pour la libération spécifique au site pour traiter l'infection par *H. pylori*.

Les aptamères sont également devenus une classe de fragments de ciblage attrayants due en grande partie à l'avancement des techniques de sélection d'aptamères basées sur des bactéries, qui améliorent continuellement l'affinité et la spécificité de liaison d'aptamère. Ces molécules de ciblage ont été largement explorées pour cibler des nanoparticules à des bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhimurium* et *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) (Chen F *et al.* 2007 / Duan N *et al.* 2013).

Pour améliorer encore l'efficacité thérapeutique des nanoparticules antimicrobiennes, les chercheurs ont exploré des nanoparticules qui restent inactives jusqu'à ce qu'elles soient déclenchées par des repères trouvés dans le microenvironnement des sites d'infection. Ces stimuli externes peuvent être des signaux physiques tels que la température, le champ électrique, le champ magnétique et les ultrasons; Ils peuvent également être des signaux chimiques tels que le pH, la force ionique, le potentiel redox et les activités enzymatiques.

Le diagnostic, et plus particulièrement l'imagerie médicale, constituent également un domaine d'application pour lequel les nanoparticules, utilisées comme traceurs ou agents de contraste, peuvent apporter de réelles améliorations.

2.1.2.4 Imagerie-Diagnostic

En imagerie médicale, un produit (ou agent) de contraste est une substance qui augmente artificiellement le contraste permettant de visualiser une structure anatomique (par exemple, un organe) ou pathologique (par exemple, une tumeur) naturellement peu ou pas contrastée, et que l'on aurait donc du mal à distinguer des tissus voisins. Le principe de fonctionnement du produit de contraste dépend de la technique d'imagerie utilisée : en radiographie, on exploite la capacité du produit à absorber les rayons X ; en imagerie par résonance magnétique, les composés utilisés sont choisis en fonction de leurs propriétés magnétiques ; en échographie, on utilisera des substances dont l'écho aux ultrasons est caractéristique, en optique les composés émettent à une longueur d'onde donnée que l'on va détecter.

Les nanoparticules sont de plus en plus répandues dans les rapports de nouveaux agents de contraste, en particulier pour l'imagerie moléculaire, la détection des processus cellulaires. Les avantages des nanoparticules incluent leur puissance pour générer le contraste, la facilité d'intégration de propriétés

multiples, les temps de circulation prolongés et la possibilité d'inclure des charges utiles élevées. Comme la chimie des nanoparticules s'est améliorée au cours des dernières années, des exemples plus sophistiqués d'agents de contraste de taille nanométrique ont été rapportés tels que des «quantum dots» paramagnétiques, ciblés par des macrophages par exemple. Les derniers modèles d'agents de contraste d'imagerie moléculaire nanoparticulaires incorporent les matériaux de génération de contraste appropriés (par exemple, fluorescents, radioactifs, paramagnétiques, super-paramagnétiques...), des groupes de ciblage, un revêtement biocompatible et la possibilité d'autres fonctionnalités telles qu'un agent thérapeutique. Un grand nombre de substances fonctionnellement actives utilisées pour générer un contraste pour l'imagerie moléculaire ont une biocompatibilité très faible, ce qui conduit à une excrétion rapide, une demi-vie en circulation faible, une stabilité diminuée et une toxicité potentielle.

L'imagerie *in vivo* des systèmes nanométriques sera alors réalisée en utilisant différents types de techniques d'imagerie, notamment la tomographie par émission de photons (SPECT), la tomographie par émission de positons (PET), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la microscopie à fluorescence, la tomodensitométrie.

L'imagerie joue un rôle de plus en plus important dans la détection des maladies et la planification de la thérapie et de la chirurgie. En effet, les essais cliniques dépendent de plus en plus des données d'imagerie pour fournir des mesures non invasives et objectives de la réponse thérapeutique.

2.1.2.4.1 Scintigraphie

La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale de médecine nucléaire qui produit une image fonctionnelle par l'administration d'un médicament radiopharmaceutique dont on détecte les rayonnements qu'il émet une fois qu'il a été capté par l'organe ou la cible à examiner. La scintigraphie est une imagerie d'émission (c'est-à-dire que le rayonnement vient du patient après injection du traceur appelé radio pharmaceutique), par opposition à l'imagerie radiographique qui est une imagerie de transmission (le faisceau est externe et traverse le patient). On injecte au patient un traceur : c'est l'association d'une molécule vectrice et d'un marqueur radioactif. La molécule vectrice est choisie pour se fixer de façon sélective sur une structure particulière de l'organisme (un organe, un secteur liquidien, une lésion). Dans cette molécule se trouve un isotope radioactif. Ce marqueur radioactif permet de suivre la position de la molécule dans l'organisme, car il émet un rayonnement gamma qu'on peut visualiser à l'aide d'une gamma-caméra (c'est une caméra à scintillation qui donne les scintigraphies). Ce traceur est un médicament, appelé radiopharmaceutique, qui n'a pas d'effet sur l'organisme étant donné les doses massiques extrêmement faibles utilisées. Il émet un rayonnement à la fois adapté à sa détection et de très faible toxicité sur le plan biologique et radiotoxicologique.

La scintigraphie planaire est une imagerie 2D basée sur la détection de radioéléments émetteurs de rayons gamma à vie courte (principalement Technétium 99m, Iode 123, Indium 111). Le radiotraceur est détecté

grâce à une « gamma caméra » qui permet d'obtenir une image 2D correspondant ainsi à la projection du volume étudié sur un plan.

Ainsi, comme il est indiqué, il n'est pas surprenant de retrouver des nanoparticules comme vecteur de radioéléments. Des produits comme Nanocoll®, sont sur le marché français depuis 1995. Il s'agit de nanoparticules colloïdales d'albumine humaine marquées au Technétium (^{99m}Tc). Nanocis®, a obtenu l'AMM en 1981. C'est un radiopharmaceutique comprenant du sulfure de réhénium nanocolloïdal marqué à nouveau par du ^{99m}Tc . Il existe actuellement d'autres produits en cours d'essais cliniques comme par exemple du sulfure de rhénium associé à du lipiodol.

2.1.2.4.2 IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est basée sur les caractéristiques de la résonance des atomes d'hydrogène lorsque le sujet, placé dans un champ magnétique statique est soumis à un champ magnétique variable à haute fréquence. En fonction du microenvironnement moléculaire de ces atomes, il est possible de visualiser l'anatomie de très nombreuses structures. Ses applications sont multiples : imagerie morphologique avec un grand contraste tissulaire, imagerie fonctionnelle du mouvement, des flux, de la perfusion. Une application particulière est la spectroscopie de résonance magnétique qui permet d'obtenir la composition biochimique d'une région d'intérêt à partir d'un volume localisé spatialement par IRM.

Les sources de contraste au sein du système nanoparticulaire peuvent être soit insérées dans le noyau des nanoparticules, fixées à la surface ou faire partie du «coating». Cette flexibilité permet l'inclusion de divers types d'agents de contraste ou une combinaison entre agents de contraste et agents thérapeutiques (médicament de théranostique). Un large panel de nanoparticules existe pouvant être utilisées comme agent de contraste, néanmoins chaque modalité d'imagerie nécessite l'utilisation des nanoparticules aux propriétés différentes pour la production de contraste souhaité. En effet si l'on prend l'exemple de système nanoparticulaire utilisant le Gadolinium (Gd) comme agent de contraste, il est possible d'avoir différents types de plateforme nanoparticulaire selon la technique d'imagerie souhaitée. Par exemple, les nanoparticules marquées au Gadolinium telles que les liposomes, les micelles, les microémulsions, les lipoprotéines, les virus et les nanotubes de carbone conviennent pour fournir un contraste pour une IRM de type T1, ceci est dû au paramagnétisme du Gadolinium. Les oxydes de fer de leur côté ont été largement exploités pour induire un contraste pour l'IRM de type T2 dû aux propriétés superparamagnétiques du Fer.

Il est à noter que la sensibilité de la détection des nanoparticules enrichies en Gadolinium est généralement plus faible que celle des nanoparticules d'oxyde de fer, le Gadolinium produit un contraste positif qui est facile à attribuer à l'accumulation de l'agent dans le tissu examiné. De leur côté, les oxydes de fer induisent un contraste négatif ou une perte de signal et comme il existe de nombreuses sources de perte de signal dans les images, il peut être difficile d'attribuer une perte de signal à l'agent de contraste de fer avec certitude.

Si la cible à imager est exprimée en très faibles concentrations, la sensibilité de l'oxyde de fer est très utile. Les oxydes de fer sont également bien adaptés pour l'imagerie dans les tissus qui produisent des signaux homogènes et ont des structures prévisibles, comme le cerveau. Dans les régions du corps où la structure est moins prévisible et des vides de signal se produisent couramment, comme l'abdomen, les agents à base de Gadolinium ont un avantage car ils produisent un contraste positif.

Des systèmes dendrimères-Gd de poids moléculaire inférieur à 60 kD pour l'IRM, ont été développés pour surmonter les durées de rétention prolongées et la toxicité des dendrimères de plus grandes tailles mais aussi des produits de contraste contenant de l'albumine nanoparticulaire. Kobayashi H *et al.* (2004) ont mis en évidence que les dendrimères de taille inférieure sont excrétés plus rapidement par les reins et ont été capables d'obtenir une meilleure visualisation des structures vasculaires que celles que l'on pouvait obtenir en utilisant le Gadolinium-diéthylène triamine penta-acétique acide (Gd-DTPA)

Concernant l'utilisation des oxydes de fer, bien que celui-ci soit considéré comme non toxique et métabolisé par l'organisme dans l'hémoglobine (Laurent S *et al.* 2008 /; Gupta AK, Gupta M 2005), l'administration de fortes doses de fer peut engendrer un risque de toxicité (Qiao R, Yang C, Gao M 2009). Par conséquent, pour son utilisation *in vivo*, il est important d'utiliser des nanoparticules d'oxyde de fer ayant des valeurs d'aimantation à saturation élevée pour minimiser la surcharge en fer chez l'individu.

2.1.2.4.3 Tomodensitométrie

La tomodensitométrie (TDM), appelée aussi tomographie axiale calculée par ordinateur (TACO) ou CT-scan (CT=computerized tomography), ou CAT-scan (CAT=computer-assisted tomography), est une technique d'imagerie médicale qui consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis, par traitement informatique, à numériser et enfin reconstruire des images 2D ou 3D des structures anatomiques. Pour acquérir les données, on emploie la technique d'analyse tomographique ou «par coupes», en soumettant le patient au balayage d'un faisceau de rayons X.

Les molécules à base d'iode ou de gadolinium sont utilisées comme agents de contraste en tomodensitométrie. Cependant, ils souffrent de nombreux inconvénients, comme une biodistribution souvent non spécifique, des demi-vies de circulation courtes (<10 min pour les composés iodés conventionnels) (Rabin O *et al.* 2006), une légère toxicité rénale et un faible contraste chez les patients de forte corpulence (Hainfeld JF *et al.* 2006). Ainsi, de nombreuses nanoparticules ont été développées pour palier à ces inconvénients, Il s'agit notamment des nanoparticules de sulfure de bismuth (Bi_2S_3) (Rabin O *et al.* 2006), des nanoparticules iodées, des nanoparticules d'or (Kattumuri V *et al.* 2007 / Hainfeld JF *et al.* 2006 / Kim D *et al.* 2007), ainsi que des structures polymériques et liposomales transportant des agents de contraste conventionnels à base d'iode (de Krafft KE *et al.* 2009 /; Pan D *et al.* 2009 / Hyafil F *et al.* 2007).

Les nanoparticules Bi_2S_3 revêtues de polymères sont une nouvelle classe prometteuse d'agent de contraste qui a été développée pour une utilisation avec l'imagerie par tomodensitométrie. Ces nanoparticules sont typiquement synthétisées *via* un processus en deux étapes. Les noyaux Bi_2S_3 sont créés par précipitation

de citrate de bismuth et de sulfure de sodium et sont ensuite revêtus d'un polymère tel que la polyvinylpyrrolidone (PVP) pour leur conférer une stabilité colloïdale, la biocompatibilité et la capacité d'éviter les macrophages (Rabin O *et al.* 2006). Ces particules présentent une absorption des rayons X, 5 fois supérieure à celles des agents de contraste classiques à base d'iode et présentent des demi-vies de circulation beaucoup plus longues (> 2 heures), ce qui ouvre la possibilité de pouvoir ainsi les utiliser comme agents de contraste ciblés (Rabin O *et al.* 2006). Néanmoins, des difficultés ont été relevées pour l'utilisation de ces nanoparticules comme un manque relatif de méthodes pour modifier leur surface (Kim D *et al.* 2007) et la capacité à contrôler la forme des nanoparticules synthétisées.

Les nanoparticules d'or représentent une autre classe d'agents de contraste pouvant être utilisées en lieu et place des nanoparticules de bismuth pour la tomodensitométrie. Les nanoparticules d'or sont d'excellents agents de contraste en raison de leur absorption accrue aux rayons X (2,7-5,7 fois) par rapport à l'iode et à leur temps de demi-vie dans la circulation sanguine (4 heures chez le rat comparé à 10 minutes pour l'iode) (Hainfeld JF *et al.* 2006 / Kim D *et al.* 2007). Ce temps de circulation plus long est la résultante d'un effet synergique du fait de la biocompatibilité du polymère enrobant les particules (Kim D *et al.* 2007) et de leur taille accrue, ce qui contribue à réduire la clairance rénale rapide. Un autre avantage majeur de l'utilisation d'agents de contraste à base d'or est qu'il est possible d'augmenter la qualité d'imagerie avec des énergies de rayons X de 80-100 keV. Cette gamme d'énergie a une absorption réduite à la fois par les tissus mous et l'os, ce qui signifie que les patients peuvent être soumis à des doses plus faibles de rayonnement (Hainfeld JF *et al.* 2006).

Toutefois, l'iode reste, de nos jours, l'agent de contraste le plus utilisé pour ce type d'imagerie. Bien qu'il possède d'excellentes capacités d'atténuation des rayons X, les agents de contraste actuels à base d'iode souffrent toujours d'un manque de spécificité tissulaire et d'un temps de circulation court. Ainsi, pour pallier à ces inconvénients, l'iode a été incorporé dans diverses nanostructures :

- utilisation de polymères de coordination à l'échelle nanométrique capables de transporter une charge utile importante en iode (deKrafft KE *et al.* 2009),
- encapsulation d'iode dans des liposomes (Mukundan S *et al.* 2006 / Elrod DB *et al.* 2009 / Kweon S *et al.* 2010),
- autres nanostructures (Chrastina A, Schnitzer JE 2010 / Aillon KL *et al.* 2010).

Tableau 7 : Exemples d'agents de contraste utilisés en IRM et tomodensitométrie

Type d'imagerie	Agents de contraste	spécificité	statuts	Substance active /nom commercial
IRM	Gadolinium (sels, chélates)		Utilisation clinique	Ablavar Eovist Gadavist Magnevist Omniscan Optimark
	Gadolinium nanostructures	Polymères, liposomes, nanoparticules inorganiques	Préclinique	
	Nanoparticules oxide de fer	Nanoparticules avec coating polymère	Utilisation clinique et essais cliniques	GastroMark Resovist Endorem Ferridex Venoferr Ferrisat ...
Tomodensitométrie	Iode		Utilisation clinique	Gastrografine Radioselectan Omnipaque Hexabrix Iopamiron ...
	Bi ₂ S ₃ nanoparticules		préclinique	
	Nanoparticules iodées	Polymères, Liposomes, Nanoparticules inorganiques	préclinique	
	Nanoparticules d'Or		Essais cliniques	

2.1.2.4.4 La tomographie par émission de positons

Cette technique se nomme aussi TEP ou PET en anglais. La tomographie par émission de positons, est une méthode d'imagerie qui permet de mesurer en trois dimensions une activité métabolique ou moléculaire d'un organe grâce aux émissions produites par les positons issus d'un produit radioactif injecté au préalable.

Contrairement à des techniques telles que l'IRM, le TDM et les rayons X, qui tendent à fournir des informations de nature structurale, le PET fournit des informations fonctionnelles sur le corps. Cette méthode est également une technique quantitative, ce qui signifie qu'elle peut être utilisée pour mesurer la quantité d'agent de contraste présent dans un organe ou un tissu particulier sur une période de temps (Cai W, Chen X 2007). La méthode repose sur le principe général de la scintigraphie qui consiste à injecter un traceur dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe ou la présence d'une cible moléculaire. Ce traceur est marqué par un atome radioactif (carbone, fluor, azote, oxygène...) qui émet des positons dont l'annihilation produit deux photons. C'est la détection en coïncidence de ces photons qui permet la localisation du lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe. C'est cette information quantitative que l'on représente sous la forme d'une image faisant apparaître en couleurs les zones de forte concentration du traceur. Par exemple, le fluorodésoxyglucose est un radiotraceur utilisé pour mesurer le métabolisme du glucose dans un PET scan.

Les tomodensitométries ont généralement une pénétration tissulaire accrue par rapport à de nombreuses autres techniques d'imagerie comme l'imagerie optique, la fluorescence et l'imagerie par ultrasons (Cai W, Chen X (2007) / Herth MM et al. 2009). Étant donné que les analyses PET ne fournissent pas une bonne résolution structurale, le PET est souvent utilisé de concert avec d'autres techniques d'imagerie (par exemple CT) afin de fournir des informations structurales et fonctionnelles sur le corps.

Les techniques PET scan constituent un outil intéressant pour les chercheurs en nanomatériaux qui souhaitent suivre la biodistribution d'une nouvelle formulation de nanomatériaux. Par exemple, les nanotubes à paroi simple (SWCNT) ont été radiomarqués afin de suivre leur biodistribution *in vivo* (Cai W, Chen X (2007), Hong H *et al.* 2009 / Liu Z *et al.* 2007). Ainsi, les nanomatériaux peuvent être un outil précieux pour la technologie PET, agissant comme des supports pour des molécules de radiomarquage tout en effectuant d'autres tâches telles que la « drug-delivery » de substance active. Il faut toutefois garder à l'esprit que la technologie PET ne détecte que le radiomarqueur et non la nanoparticule elle-même. De ce fait, il est possible d'obtenir des résultats imprécis si les deux composés se dissocient l'un de l'autre après administration (Cai W, Chen X 2007).

2.1.2.4.5 Imagerie de fluorescence

L'imagerie par fluorescence est la visualisation de composés organiques fluorescents ou de protéines comme marqueurs pour des processus ou des structures moléculaires. Il permet un large éventail d'observations expérimentales, y compris l'emplacement et la dynamique de l'expression des gènes,

l'expression des protéines et les interactions moléculaires dans les cellules et les tissus. Les méthodes utilisées permettent de travailler à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* chez le petit animal avec une très forte sensibilité sans pour autant devoir recourir à des pratiques invasives (Nune SK *et al.* 2009).

Les petites entités chimiques peuvent être incorporées dans diverses macromolécules et utilisées avec des techniques telles que la microscopie confocale et la cytométrie de flux pour étudier l'interaction *in vitro* de ces macromolécules avec des cellules (par exemple l'internalisation) ainsi que leur biodistribution et leur devenir *in vivo*. Les molécules fluorescentes sont souvent utilisées pour l'étiquetage des cellules et le suivi des cellules. Elles sont également fortement employées dans la recherche biomédicale pour examiner l'absorption cellulaire, la rétention des nanoparticules et de suivre la biodistribution des nanoparticules dans des modèles animaux.

Actuellement, il existe de nombreuses limitations à l'imagerie par fluorescence avec des fluorophores classiques: une mauvaise pénétration de la peau / tissu, des bandes d'émission et d'absorption larges, une faible intensité du signal, des temps d'imagerie courts *in vivo* et une grande susceptibilité à la destruction éventuelle du fluorophore due à l'énergie lumineuse nécessaire pour la stimulation.

De nombreuses nanoparticules ont été testées, parmi celles-ci, on peut citer celles fabriquées à partir de silice et de silice organiquement modifiée, de polymères organiques hydrophobes et hydrophiles, de polymères organiques semi-conducteurs, de quantum dots, de nanomatériaux carbonés, notamment de nanotubes de carbone et de nanotubes, nanodiamants, de particules métalliques, d'oxydes métalliques etc.

2.1.2.5 Théranostique

L'objectif de la nanomédecine théranostique est d'adapter les thérapies au diagnostic spécifique d'un patient et d'améliorer les résultats du traitement avec moins d'effets secondaires dans un laps de temps plus court que les régimes de traitement actuels. Les nanoparticules ont des avantages significatifs en théranostique en raison de leur ciblage et de leur multifonctionnalité. Par ciblage passif et / ou actif, les nanoparticules peuvent cibler le site de la maladie. Elles peuvent diagnostiquer la maladie en signalant l'emplacement de tissus endommagés, le stade d'évolution de la pathologie ou la réponse au traitement. Enfin, les nanoparticules peuvent délivrer un agent thérapeutique au site ciblé aux concentrations nécessaires, en réponse à des signaux moléculaires ou à des stimuli externes. La théranostique peut être utilisée pour surveiller l'administration du médicament, la libération du médicament et son efficacité. Comme indiqué précédemment, une des composantes du théranostique étant le diagnostic on retrouvera par conséquent les différents types de nanoparticules mentionnées, pouvant être utilisées : nanoparticules métalliques (dont les nanoparticules d'or), les nanoparticules magnétiques, polymériques notamment.

La théranostique permet une plus grande personnalisation que l'utilisation de protocoles usuels.

Cela passe par trois objectifs primordiaux:

- ✓ Affiner le diagnostic en identifiant des marqueurs de diagnostic précoce et en permettant de définir des sous-populations de patients dont l'évolution naturelle et le pronostic sont différents.
- ✓ De rationaliser la prise en charge thérapeutique en passant d'une conception de masse où les traitements sont appliqués indistinctement à l'ensemble des malades à une conception individualisée où le traitement est défini patient par patient afin d'en optimiser le rapport bénéfique/risque.
- ✓ D'engager le patient dans une démarche préventive, en augmentant son adhésion et son observance tout en adaptant les programmes de prévention au profil du patient.

La *Figure 7* représente la complexité que peut prendre un nanosystème à des fins de théranostique.

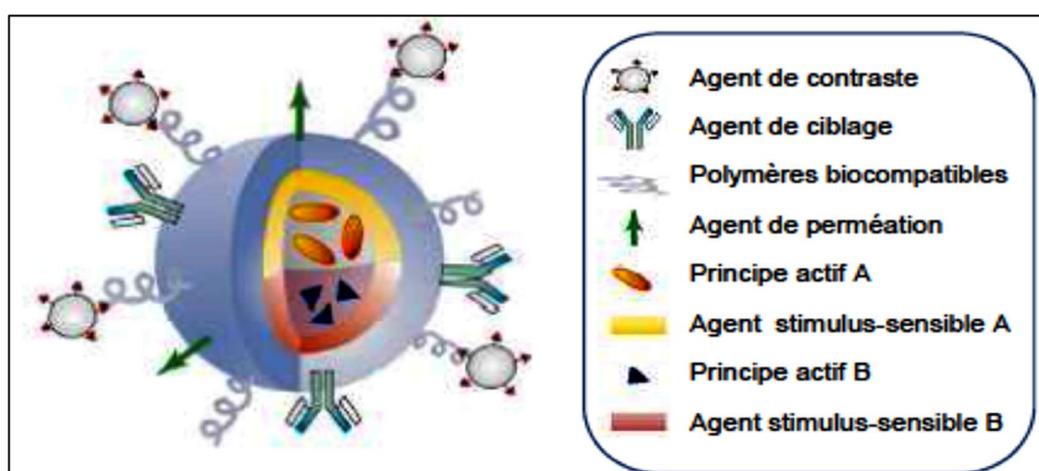


Figure 7 : Nanosystème et théranostique

En utilisant principalement les propriétés uniques des nanoparticules pour parvenir à l'identification des biomarqueurs et à l'administration de médicaments, des « nanothéranostiques » peuvent être appliqués pour découvrir et cibler de manière non invasive des biomarqueurs d'image et poursuivre le traitement en fonction de la distribution des biomarqueurs. Les biomarqueurs représentent tout type de biomolécule, comme les protéines, les lipides, les gènes et les métabolites, qui lorsqu'ils sont présents ou altérés signifient des conditions physiologiques importantes se produisant dans le corps. L'oncologie est la discipline pour laquelle la théranostique est la plus appliquée. Néanmoins, la théranostique n'est pas totalement appliquée pour une vraie médecine personnalisée, car il demeure un manque de connaissances sur le type et le nombre de biomarqueurs chez les individus au cours des stades précoces du cancer. Le profilage moléculaire est la forme la plus courante de trouver des biomarqueurs de gènes, par des réseaux d'ADN, corrélés avec différentes formes de cancer en utilisant des algorithmes de tri. De cette façon, des signatures spécifiques de cancer ont pu être identifiées et des classes de tumeurs individuellement attribuées à des patients.

En plus d'identifier l'expression de certains gènes à différents stades d'une maladie, les anticorps, les peptides et les aptamères peuvent cibler des biomarqueurs protéiques spécifiques qui ont été identifiés et

validés. Ces biomarqueurs sont généralement des ligands naturellement exprimés sur de nombreuses cellules, mais sous une condition pathologique, ils sont surexprimés. Les profils d'expression des protéines des tumeurs en utilisant l'immunohistochimie et la cytométrie de flux et les profils d'expression d'ARNm sont nécessaires pour la sélection des biomarqueurs. Une fois qu'un biomarqueur est validé, il peut être ciblé et bloqué pour l'inhibition, ou ciblé pour délivrer des médicaments conjugués ou des sondes d'imagerie pour traiter et surveiller le site « spécifique ».

En général, les biomarqueurs peuvent servir d'indicateurs de pronostic, prédictifs ou thérapeutiques. Les biomarqueurs de pronostic, biomarqueurs les plus couramment utilisés à ce jour, peuvent prédire la catégorie spécifique de cancer, ce qui peut aider à choisir des thérapies et des doses appropriées. Les biomarqueurs prédictifs, sont utilisés pour déterminer si le stade de la maladie permettra de répondre ou non à certains types de traitements. Enfin, les biomarqueurs thérapeutiques renseignent sur l'évolution de la maladie après l'initiation du traitement. Ce type de biomarqueur se révèle particulièrement nécessaire dans la clinique et pendant le développement du médicament pour identifier rapidement si le traitement choisi a un effet sur la tumeur.

La théranostique permet donc de cibler, de façon non invasive, et suivre les biomarqueurs impliqués dans la progression de la maladie. Ce type d'information peut aller au-delà de l'identification d'un dérèglement génétique, car il fournit une analyse globale des événements moléculaires en temps réel. Ainsi, les cliniciens peuvent identifier la variation de certains biomarqueurs qui existent dans le corps, ce qui est important dans la mise en place de la maladie et la planification du traitement de celle-ci tels que le dosage des médicaments et la durée du protocole à suivre.

L'une des techniques les plus efficaces pour étudier les biomarqueurs est la médecine nucléaire. Elle peut être facilement appliquée pour déterminer la liaison des récepteurs et ainsi détecter les biomarqueurs de la maladie par l'imagerie PET scan par exemple. La radiothérapie peut alors être conduite avec les mêmes molécules après avoir changé le radionucléide d'imagerie en radionucléide thérapeutique (Eckelman WC *et al.* 2008). De cette façon, la médecine nucléaire devient un réel système de médecine personnalisée. Par exemple, l'EMA a octroyé, en 2004, une AMM à un médicament de radio-immunothérapie de type nanoparticulaire. Ibritumomab tiuxetan, vendu sous le nom commercial Zevalin, est un anticorps monoclonal de traitement radio-immunothérapeutique. Zevalin est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un lymphome non hodgkinien (LNH) à cellules B CD20⁺, de type folliculaire, en rechute ou réfractaire après traitement par le rituximab. Le médicament utilise l'anticorps monoclonal IgG1 de souris ibritumomab en conjonction avec le chélateur tiuxetan, auquel est ajouté un isotope radioactif (yttrium-90 ou indium-111). Tiuxetan est une version modifiée du chélateur DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique).

Au-delà des anticorps, les peptides peuvent également être utilisés pour cibler des intégrines spécifiques *in vivo* avec une facilité de fonctionnalisation pour différentes techniques d'imagerie.

2.1.2.6 Exemples de produits ayant obtenus une AMM

Différents médicaments ont depuis reçus une AMM et nombre d'entre eux auront leur brevet qui tombera dans le domaine public.

Le Tableau 8 représente une liste non-exhaustive de nanomédicaments ayant obtenus une AMM par EMA, FDA, ANSM (Fr).

Tableau 8 : Liste non-exhaustive de nanomédicaments ayant eu une AMM

Nom commercial	Nanostructure et substance active	Indication	Date AMM
Abelcet®	Nanoformulation lipidique non liposomale (Amphotéricine B)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement des aspergilloses et des candidoses systémiques 	FDA (1995) Fr (1997)
Abraxane®	Nanoformulation polymérique (paclitaxel)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement du cancer du sein métastatique traitement (en association avec gemcitabine) adénocarcinome du pancréas métastatique traitement (en association carboplatine) cancer bronchique non à petites cellules 	FDA (2005) EMA (2008) Fr (2008)
Adagen®	Adénosine déaminase PEGylée	<ul style="list-style-type: none"> Traitement de maladie à immunodéficience sévère 	FDA (1990)
Ambisome®	Liposome (Amphotéricine B)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement des infections fongiques invasives à <i>Aspergillus</i> en alternative thérapeutique en cas d'échec ou d'intolérance au voriconazole Traitement des infections fongiques invasives à <i>Candida</i> et des cryptococcoses neuro-méningées chez le sujet infecté par le VIH 	FDA (1997) EMA (1990) Fr (1998)
Cimzia®	Anticorps PEGylé (Certolizumab)	<ul style="list-style-type: none"> Maladie de Crohn polyarthrite rhumatoïde rhumatisme psoriasique spondylarthrite ankylosante 	FDA (2008) EMA (2009)

			Fr (2009)
Copaxone®	Nanoformulation polymérique (acétate de glatiramère)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement des formes récurrentes de la sclérose en plaques (SEP) 	FDA (1996) Fr (2004)
Curosurf®	Liposome (Poractant alpha)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement des nouveau-nés prématurés à haut risque de présenter ou présentant un syndrome de détresse respiratoire (SDR) par déficit en surfactant pulmonaire (maladie des membranes hyalines) 	FDA (1999) Fr (1992)
DaunoXome®	Liposome (citrate de daunorubicine)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement du sarcome de Kaposi cutanéomuqueux extensif ou viscéral, chez des patients à un stade avancé de l'infection par le VIH 	FDA (1996) Fr (1996)
Definity® (FDA) / Optison® (EMA/Fr)	Liposome (perfultrène)	<ul style="list-style-type: none"> Agent de contraste échocardiographie 	FDA (2001) EMA (1998) Fr (1998)
Depocyte®	Liposome (Cytarabine)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement de la méningite lymphomateuse 	FDA (1999) EMA (2001) Fr (2001)
Diprivan®	Nanoformulation surfactant (Propofol)	<ul style="list-style-type: none"> Anesthésie 	FDA (1999) Fr (1986 et 1996)
Doxil® (FDA) / Caelyx® (EMA, Fr)	Liposome (chlorhydrate de doxorubicine)	<ul style="list-style-type: none"> En monothérapie chez les patients ayant un cancer du sein métastatique, avec un risque cardiaque augmenté Dans le traitement d'un cancer ovarien à un stade avancé chez les femmes après l'échec d'une chimiothérapie de première intention à base de platine En association avec le bortézomib pour le traitement du myélome multiple en progression chez les patients qui ont reçu au 	FDA (1995) EMA (1996) Fr (1996)

		<p>moins un traitement antérieur et qui ont déjà subi ou qui sont inéligibles pour une greffe de moelle osseuse</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dans le traitement du Sarcome de Kaposi (SK) associé au SIDA chez des patients ayant un faible taux de CD4 (< 200 lymphocytes CD4/mm³) et présentant des lésions cutanéomuqueuses ou viscérales étendue 	
Eligard®	Nanoformulation polymérique (acétate de leuproréline)	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement du cancer de la prostate hormono-dépendant à un stade avancé et en association avec la radiothérapie dans le traitement du cancer de la prostate localisé à haut risque et localement avancé hormono-dépendant. 	FDA (2002) Fr (2005)
Emend®	Nanocrystaux (Aprépitant)	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention des nausées et des vomissements associés à des chimiothérapies anticancéreuses hautement et moyennement émétisantes chez les adultes et les adolescents à partir de 12 ans 	FDA (2003) EMA (2003) Fr (2003)
Invega®	Nanocrystaux (Palipéridone)	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement de la schizophrénie 	FDA (2006) EMA (2007) Fr (2007)
Macugen®	Anti-VEGF aptamère PEGylé (pégaptanib octasodium)	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement de la forme néovasculaire (humide) de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) 	FDA (2004) EMA (2006) Fr (2006)
Mircera®	Epoétine bêta PEGylée (méthoxy polyéthylène glycol-époétine bêta)	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement de l'anémie chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique 	FDA (2007) EMA (2007) Fr (2007)

Myocet®	Liposome (doxorubicine)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement en première ligne du cancer du sein métastatique 	EMA (200) Fr (2000)
Oncaspar®	L-asparaginase PEGylée (pegaspargase)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) 	FDA (1994) EMA (2016) Fr (2016)
Pegasys®	Interféron alpha-2a PEGylé (Interféron alpha-2a)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement hépatite B Traitement hépatite C 	FDA (2002) EMA (2002) Fr (2002)
PegIntron®	Interféron alpha-2b PEGylé (Interféron alpha-2b)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement de l'hépatite C chez les patients adultes (âgés de 18 ans et plus) avec une maladie hépatique compensée 	FDA (2001) EMA (200) Fr (2000)
Rapamune®	Nanocristaux (sirolimus)	<ul style="list-style-type: none"> Indiqué chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale, en prévention du rejet d'organe 	FDA (200) EMA (2001) Fr (2001)
Ritalin LA® (FDA) Ritaline LP® (Fr)	Nanocristaux (chlorhydrate de méthylphénidate)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement du Trouble Déficitaire de l'Attention avec Hyperactivité (TDAH) 	FDA (2002) Fr (2003)
Somavert®	Peptide PEGylé (Pegvisomant)	<ul style="list-style-type: none"> Traitement de l'acromégalie chez des patients qui ont eu une réponse insuffisante à la chirurgie et/ou la radiothérapie et chez lesquels un traitement médical approprié par les analogues de la somatostatine n'a pas normalisé les concentrations en IGF-I ou n'a pas été toléré 	FDA (2003) EMA (2002) Fr (2002)
		<ul style="list-style-type: none"> Utilisé au cours d'un examen échographique, afin d'améliorer l'échogénicité du sang, ce qui 	

<p>Sonovue®</p>	<p>Microbulles composées de nanocapsules (Hexafluorure de soufre)</p>	<p>permet une amélioration du rapport signal/bruit. Il doit être utilisé uniquement chez les patients pour lesquels l'examen échographique sans amplification de contraste ne permet pas de conclure</p>	<p>FDA (2001) EMA (2001) Fr (2001)</p>
<p>Venofer®</p>	<p>Nanoformulation (fer sucrose)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • en traitement de l'anémie chez l'insuffisant rénal chronique hémodialysé, en pré-dialyse ou en dialyse péritonéale, lorsqu'un traitement par fer oral s'est révélé insuffisant ou mal toléré, • en situation pré-opératoire: chez les patients inclus dans un programme de don de sang autologue en association avec l'érythropoïétine, à condition qu'ils aient une anémie modérée (Hb entre 9 et 11 g/100 ml), et que leur ferritinémie initiale soit inférieure à 150 µg/l, • en traitement des anémies aiguës en post-opératoire immédiat chez les patients ne pouvant pas recevoir d'alimentation orale, • en traitement des anémies hyposidérémiques par carence martiale (Hb < 10,5 g/100 ml) liées aux maladies inflammatoires chroniques sévères de l'intestin lorsque le traitement par voie orale n'est pas adapté 	<p>FDA (2000) Fr (1998)</p>
<p>Visudyne®</p>	<p>Liposome (vertéporfine)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement des patients atteints de dégénérescence maculaire exsudative (humide) liée à l'âge (DMLA) présentant une néovascularisation choroïdienne (NVC) rétrofovéolaire à prédominance visible <p>Traitement des patients présentant une néovascularisation choroïdienne rétrofovéolaire due à la myopie forte</p>	<p>FDA (2000) EMA (2000) Fr (2000)</p>

<p>Zevalin®</p>	<p>Anticorps monoclonal radiomarqué (Ibritumomab tiuxetan)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement de consolidation après induction d'une rémission chez les patients atteints d'un lymphome folliculaire non traités antérieurement • Traitement des patients adultes atteints d'un lymphome non hodgkinien (LNH) à cellules B CD20+, de type folliculaire, en rechute ou réfractaire après traitement par le rituximab 	<p>FDA (2002) EMA (2004) Fr (2004)</p>
------------------------	--	---	--

2.2 Les dispositifs médicaux

2.2.1 Identification de dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux

L'absence de données centralisées rend difficile l'établissement d'une liste, a fortiori exhaustive, de dispositifs médicaux incorporant des substances sous forme de nanomatériaux.

A cet égard, en Juillet 2016, l'ANSM a interrogé le Syndicat National de l'Industrie des Technologies Médicales (SNITEM) afin de connaître les nanoparticules utilisées à titre volontaire dans les dispositifs médicaux ou dans leur fabrication. En réponse, en décembre 2016 le SNITEM apporte les éléments ci-dessous (*Tableau 9*).

Tableau 9: Déclaration du SNITEM concernant les nanomatériaux utilisés de façon volontaires dans la conception de dispositifs médicaux.

Type de DM	Contact Patient et/ou utilisateur	Nanomériau utilisé	Propriétés de ce nano	Justification de cette utilisation	Analyse de risque spécifique nano
Tuteur urétral	Contact direct avec les muqueuses urinaires	Aerosil	Renforcement d'un silicone	Il est classique de renforcer un silicone avec de la silice fumée. La silice fumée est prise dans la matrice silicone	Non
Sonde de Blakemore Sonde urétrale Sonde prostatique Sonde de prélèvement multi-organes Sonde de néphrostomie Sonde de Foley	Contact direct avec muqueuse ou surface lésée ou endommagée	Oxyde de titane RKB2	Opacifiant visuel et protection anti-UV	Le plus efficace et agréé FDA. Le TiO2 est pris dans la matrice polymère.	non

Aiguille d'injection vésicale					
Sonde de Blakemore Sonde urétrale Sonde de Foley	Contact direct avec muqueuse ou surface lésée ou endommagée	Monarch 490	Colorant noir (noir de carbone)	Colorant « historique » qui sera retiré des mélanges en 2018	Non
Pansement	Oui : peau	Nanocristalline silver	<p>Metallic silver coating incorporating a column-shaped crystals on dressing surface by physical vapour deposition ("sputter coating") process.</p> <p>Creates surface topography with features on a nano-scale, giving larger surface area to volume ratio compared to other silver presentations</p> <p>Typical size of smallest dimension 15 nm ("nanocrystals")</p> <p>Releases silver ions (Ag+) in presence of solution (e.g. water, wound exudate)</p> <p>Provides supplemental antimicrobial action additional to dressing properties</p>	Creates surface topography with features on a nano-scale, giving larger surface area to volume ratio compared to other silver presentations.	
Pompe à insuline	non	Titanium dioxide	Pigment pour la couleur blanche de la peinture	Pigment connu pour son utilisation dans les peintures, pas de contact direct patient vu que la peinture est recouverte d'un revêtement type laque	Pas d'analyse B/R spécifique mais TiO2 est un pigment connu utilisé dans de nombreux produits même en contact avec la peau
Solution synthétique de greffe osseuse	Implantable	Nanoparticule d'hydroxyapatite	Rapport surface/poids élevé permettant une ostéointégration	Repousse osseuse	Oui : dispositif contenant nanoparticule d'hydroxyapatite + eau

Par ailleurs, chaque mois est mise à jour sur le site de l'ANSM la communication par les fabricants, les mandataires ou les distributeurs, de la mise en service pour la première fois en France de dispositifs médicaux de classe IIa, IIb, III et DMIA (Dispositifs Implantables Actifs) (Article L.5211-4 et R. 5211-66 du Code de la Santé Publique transposant l'article 14 de la directive européenne 93/42/CEE du 14 juin 1993).

D'après la liste des communications des dispositifs de classes IIa, IIb, III et DMIA enregistrées au 10 Avril 2017 publiée sur le site de l'ANSM, en réalisant une extraction du terme « nano » dans la colonne « Dénomination du dispositif sur la notice » voici présenté dans le

Tableau 10 des exemples de dispositifs médicaux avec des nanomatériaux déclarés à l'ANSM.

Tableau 10: Exemples de dispositifs médicaux avec des nanomatériaux déclarés à l'ANSM (extraction de la liste des communications des DM IIa, IIb, III, DMIA d'Avril 2017, publiée sur le site de l'ANSM)

Classe DM	Type de Dispositif Médical	Type de nanomatériaux
III	Substitut osseux synthétique	Hydroxyapatite nanocristallin
III	Pansement antimicrobien	Nanocristaux d'argent
III	Stent	Endoprothèse à nano-revêtement
IIa	Matériel dentaire	Composite fluide nano-dimer photopolymérisable

L'analyse des formes nanomatériaux a été réalisée en classant les dispositifs médicaux en fonction de leur interaction avec le corps humain. Un type de dispositif médical sera plus particulièrement développé pour chaque classe de dispositifs médicaux.

2.2.2 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs au contact avec une surface

2.2.2.1 Avec la peau :

L'usage des nanoparticules comme l'argent s'est étendu aux textiles et aux équipements médicaux (masques, blouses, bandages, ...). Pour être efficaces, il faut que les nanoparticules d'argent soient présentes à la surface des fibres et les lavages consécutifs peuvent en diminuer l'efficacité. (Afssaps, 2011).

2.2.2.2 Avec les muqueuses :

Il s'agit ici d'aiguilles pour injection intradermique, sous-cutanée miniaturisée et atteignant le micromètre. Elles ne font pas partie à proprement parler des nanotechnologies mais elles permettent l'administration de micro ou nano-doses de médicaments, d'insuline ou de vaccins. (Afssaps, 2011)

2.2.2.3 Avec les surfaces lésées ou endommagées :

Les nanoparticules d'argent sont utilisées au contact des peaux lésées notamment pour ses propriétés antibactériennes.

2.2.2.4 Focus sur les pansements à base de nanoparticules d'argent

Utilisation des nanoparticules d'argent dans les pansements

L'argent est utilisé depuis le 18^e siècle pour le traitement des ulcères (Duràn et al 2016), le soin des plaies ; son activité antibactérienne est connue, c'est-à-dire qu'il a soit un effet inhibiteur de croissance des microorganismes, soit un effet létal vis-à-vis des microorganismes (Anses, 2015).

L'argent peut être présent sous différentes espèces chimiques, telles que l'argent pur métallique (Ag^0), les ions argent (les plus communs sont Ag^{1+} , Ag^{2+} , Ag^{3+}) et les nanoparticules d'argent. (SCENIHR 2014).

Il peut également se présenter sous les formes suivantes : élément argent, composé inorganique (par exemple, l'oxyde d'argent, le phosphate d'argent, le chlorure d'argent, le sulfate d'argent, le phosphate de calcium et de sodium, le composé de zirconium argent, le SSD) et sous forme de complexes organiques, tels que l'allantoïate d'argent-zinc, l'alginate d'argent, la carboxyméthylcellulose d'argent. (International Consensus, 2012).

Les nanoparticules d'argent sont utilisées comme agent antibactérien dans les pansements, tels que des bandages pour protéger les patients souffrant de brûlures graves contre les infections

L'utilisation de l'argent en tant qu'agent biocide représente une très faible fraction de l'utilisation de l'argent au niveau mondial (moins de 1%) (SCENIHR, 2014).

Il est noté que la réglementation actuelle relative au dispositif médical et le règlement européen (UE) 2017/745 du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux), n'exige pas en matière d'étiquetage, que le nanomatériau soit inscrit spécifiquement comme un ingrédient.

L'argent dans les pansements peut apparaître : (International Consensus, 2012).

- Comme revêtement sur l'une ou les deux surfaces externes du pansement (argent élémentaire ou nanocristallin)
- À l'intérieur de la structure du pansement - soit comme un revêtement sur des matériaux de pansement (argent élémentaire ou composé), soit en tant que composé faisant partie de la structure de pansement (par exemple alginate d'argent)
- Comme une combinaison de ceux-ci.

L'argent sur la surface du pansement peut entrer en contact avec la plaie où il exerce l'action antibactérienne. L'argent dans la structure de pansement agit sur les bactéries absorbées dans le

pansement avec l'exsudat de la plaie, mais est également susceptible de se diffuser dans une certaine mesure dans la plaie.

Mécanisme d'action de l'argent : Hypothèses

Sous forme métallique (élémentaire), l'argent est non réactif et ne peut pas détruire les bactéries. Pour devenir bactéricide, les atomes d'argent (Ag ou Ag^0) doivent perdre un électron et devenir des ions argent chargés positivement (Ag^+). L'argent élémentaire s'ionise dans l'air, mais il s'ionise plus facilement lorsqu'il est exposé à un environnement aqueux tel que l'exsudat de la plaie. Les composés d'argent contiennent des ions argent positifs liés à des ions ou molécules chargés négativement. Lorsqu'ils sont exposés à des environnements aqueux, certains des ions argent se détachent du composé. (International Consensus, 2012).

Le mécanisme d'action de l'argent sous forme ionique et nanoparticulaire implique de façon générale une rupture membranaire, bien que le mécanisme exact de son interaction avec les bactéries soit encore débattu dans la littérature scientifique avec différentes pistes envisagées.

Duràn et al 2016 réalise une revue des différents mécanismes d'action des nanoparticules d'argent sur les bactéries :

Selon Wong et Liu cité dans Duràn et al 2016, un mécanisme possible est le suivant :

- les nanoparticules d'argent fournissent une grande surface pour le contact avec les bactéries, ce qui peut permettre aux particules de s'attacher à la membrane cellulaire et de pénétrer facilement dans les bactéries.
- les nanoparticules d'argent ou les ions argent interfèrent avec la chaîne respiratoire dans les mitochondries bactériennes, entraînant la mort cellulaire.

Duràn et al 2010 précisent que les ions argent réagissent avec les groupes thiols des protéines produisant une inactivation bactérienne.

Marambio-Jones et Hoek 2010 cités dans Duràn et al 2016 proposent d'autres possibles mécanismes d'action :

- a) l'absorption d'ions argent libres suivie d'une interruption de la production d'ATP et réplication de l'ADN,
- b) la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) par les nanoparticules d'argent et ions argent, et
- c) des dommages directs à la membrane cellulaire par nanoparticules d'argent.

MaQuillan et al, 2012 cités dans Duràn et al 2016 indiquent que le principal mécanisme d'action des nanoparticules d'argent est la dissolution de la membrane cellulaire.

Li et al, 2008, cités dans Duràn et al 2016, proposent également d'autres mécanismes possibles antibactériens des nanoparticules d'argent :

- a) les nanoparticules adhèrent probablement à la surface des bactéries et par conséquent modifient les propriétés de la membrane.
- b) les nanoparticules d'argent à l'intérieur de la cellule bactérienne peuvent entraîner des dommages à l'ADN.
- c) la dissolution des nanoparticules d'argent libère des ions argent antimicrobiens, qui peuvent interagir avec des protéines contenant du thiol dans la paroi cellulaire et affecter leurs fonctions.

Une revue commentée par Xiu et al 2012, cités dans Duràn et al 2016, a établi que les nanoparticules d'argent n'exercent pas significativement de toxicité directe spécifique sur les bactéries mais peuvent servir de support pour délivrer plus efficacement des ions argent au cytoplasme et à la membrane des bactéries.

Reidy et al, 2013, cités dans Duràn et al 2016, ont commenté une autre possibilité de mécanisme proposé par Cao et al, 2011, impliquant le gradient de protons électrochimiques par le processus respiratoire de la bactérie, force motrice de la synthèse de l'ATP. Les nanoparticules d'argent peuvent interrompre cette source d'énergie, conduisant à la mort cellulaire.

Kon and Rai, 2013 cités dans Duràn et al 2016, ajoutent que l'activité antibactérienne des nanoparticules (NP) dépend également des espèces de micro-organismes cibles.

Certains auteurs soutiennent soit que le mécanisme d'action antibactérien des nanoparticules d'argent est dû au relargage des ions argent, tandis que l'activité particulaire des nanoparticules d'argent peut être considérée comme négligeable, soit que les nanoparticules d'argent sont plus efficaces que les ions argent libérés.

L'activité des NPs d'Ag en dessous de 10 nm est principalement due à la nanoparticule lui-même, tandis qu'à de plus grandes tailles, le mécanisme prédominant se produit à travers les ions d'argent.

Les nanoparticules d'argent pénètrent plus efficacement les cellules que les ions d'argent.

Les substances chimiques résiduelles (impuretés) peuvent s'adsorber et modifier l'état des nanoparticules d'argent et *in fine* leur activité (Anses, 2015).

L'Anses (2015) indique que « l'étude des impuretés ne se résume pas à l'analyse des seuls résidus présents dans les suspensions des nanoparticules d'argent. El Badawi et al. (2011) insistent sur l'importance de renseigner les méthodes de purifications ainsi que les résultats de contrôles. Dans leur étude, les auteurs montrent que la purification des nanoparticules d'argent entraîne une diminution de leur activité bactéricide sur le genre *Bacillus* liée à l'élimination des ions Ag^+ . »

L'Anses (2015) cite également les travaux de Guzman et al (2012) établissant « une relation inversement proportionnelle entre l'activité bactérienne et la taille des nanoparticules entre 9 et 30 nm ».

L'Anses (2015) propose d'après les travaux de Lavanya, Veenavardhini et al (2013), quatre niveaux d'analyse à effectuer :

- « le suivi par spectrométrie UV de la formation et de la stabilité des nanoparticules d'argent ;
- la caractérisation par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier des ligands qui recouvrent et stabilisent les nanoparticules d'argent ;
- la caractérisation par diffraction des rayons X de la structure cristalline ;
- l'évaluation par microscopie électronique de la taille et de la forme des nanoparticules d'argent ».

Spectre d'activité des nanoparticules d'argent

Grâce à leur morphologie, leurs propriétés physico-chimiques, leur large ratio surface/volume, les nanoparticules d'argent ont une activité bactérienne à large spectre.

La concentration des ions argent libérés est augmentée dans le cas d'une grande surface spécifique des nanoparticules d'argent, ce qui peut modifier les propriétés antimicrobiennes.

Les nanoparticules d'argent ont des efficacités différentes en fonction des bactéries. Selon Duràn et al 2016, la sensibilité antibactérienne des bactéries gram positif (couche de peptidoglycanes) est inférieure à celles des bactéries gram négatif (couche de lipopolysaccharides, où les nanoparticules d'argent peuvent modifier l'isomérisation des acides gras). Cette différence est probablement due à l'épaisseur de la couche en peptidoglycane des bactéries gram positifs.

Evaluation de l'exposition

Le SCENHIR (2014) indique par le biais de cas rapportés dans la littérature scientifique, qu'il existe une absorption cutanée de l'argent lors de l'utilisation de pansements sur des plaies en contenant. De l'argent a été détecté dans le sérum sanguin et dans les urines, ce qui suggère une disponibilité systémique de l'argent. Des études *in vitro* sur cellules de Franz (sur peau intacte et endommagée) ont montré sur l'absorption des nanoparticules d'argent était très faible mais détectable.

Le SCENHIR (2014) indique notamment qu'il est important de savoir si les nanoparticules d'argent peuvent être libérées. Pour cela, une étude des substances relargables réalisées selon les normes harmonisées ISO 10993-12 et ISO 10993-17 peut être conduite.

Le SCENHIR (2014) propose le Tableau 11 ci-dessous déterminant un « potentiel d'exposition » en fonction de la catégorie de produits et de la sous-catégorie de produits et de la voie d'exposition.

Tableau 11: Classification de l'exposition humaine potentielle au nano-argent, selon le SCENIHR 2014

Catégorie	Sous-catégorie	Voie d'exposition	Exposition potentielle
Alimentation et boissons	Nettoyage	Inhalation / dermique	Elevé

	Ustensiles de cuisine, revêtements	Dermique	Faible
	Stockage	Dermique	Faible
	Supplément	Oral	Elevé
Produits de soin et cosmétiques	Soin de la peau	Dermique	Elevé
	Hygiène orale	Oral	Elevé
	Nettoyage	Dermique	Elevé
	Soin des cheveux	Dermique	Faible ?
	Soin des bébés	Dermique	Elevé ?
	Pansements	Dermique	Elevé
	Produits en vente libre	Dermique ?	Elevé ?
Textile et chaussures	Vêtement	Dermique	?
	Autres textiles	Dermique	?
	Jouets	Dermique / oral	?
Electronique	Produit de soin	Dermique	Faible
	Appareils ménagers	Dermique	Faible
	Matériel informatique	Dermique	Faible
	Appareils mobiles	Dermique	Faible
Produits ménagers / Amélioration de l'habitat	Nettoyage	Inhalation / Dermique	Elevé
	Revêtement	Dermique	Elevé ??
	Ameublement	Dermique	Faible
	Ameublement / Revêtement	Dermique	Faible
Filtration, purification, neutralisation, Assainissement	Filtration	Inhalation	?
	Nettoyage	Inhalation / Dermique	Elevé

« Elevé » indique soit une forte probabilité d'exposition, soit une possibilité d'exposition élevée, ou les deux

"Faible" indique soit une faible probabilité d'exposition, soit une possibilité de faible exposition, ou les deux

"?" Indique qu'il n'y a pas suffisamment d'informations disponibles

Pour les pansements, on peut les associer à des produits de soin de la peau « skin care », avec une voie d'exposition dermique. Selon le Tableau 11 du SCENIHR, le niveau d'exposition à l'argent est donc « high ».

Un niveau d'exposition élevé indique soit une forte probabilité d'exposition, soit une possibilité d'exposition élevée, soit les 2.

Ce potentiel d'exposition est à considérer comme une indication d'exposition potentiellement élevée. Le SCENIHR rappelle que cette classification est basée sur les connaissances actuelles et peut nécessiter des modifications lorsque de nouvelles informations sont disponibles. Un autre point intéressant serait de prendre en compte l'exposition cumulée par l'intermédiaire de divers produits contenant des nanoparticules d'argent et de l'argent. Cependant, actuellement aucune information à ce sujet n'est disponible.

Hansen et al. (2008) cité dans le SCENHIR (2014), indique que le regroupement des produits de consommation en fonction de l'emplacement du nanomatériau, a conduit à l'identification de trois catégories d'exposition suivantes :

1. *Susceptible de causer une exposition* : L'homme entre en contact direct avec ces produits. Les «nanoparticules dans les liquides» et les «particules en suspension dans l'air» appartiennent à cette catégorie d'exposition.

2. *Peut causer une exposition* : Bien que les nanoparticules dans les produits ne soient pas destinées à être libérées, une certaine quantité d'usure doit être anticipée. Les «nanoparticules liées à la surface» appartiennent à cette catégorie.

3. *Pas d'exposition prévue du consommateur* : Une exposition négligeable est attendue car les nanoparticules sont encapsulées dans le produit. « Les nanoparticules en suspension dans les solides» sont dans cette catégorie.

En conclusion, pour déterminer le risque pour l'exposition, plus d'informations sont à prendre en compte :

- la concentration en nanoparticules d'argent dans le produit ;
- la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent avec les impuretés ;
- la taille ;
- la forme (agrégat, agglomérat) ;
- la probabilité de relargage de nano Ag⁺ du produit.

Résistance bactérienne aux nanoparticules d'argent

La première bactérie résistante aux ions d'argent a été identifiée et isolée dans les années 1960 à partir d'une plaie due à une brûlure qui a été traitée avec du nitrate d'argent.

Il est à noter que le relargage des ions argent dans l'environnement peut faciliter la dissémination de la résistance aux ions argent dans les microorganismes environnementaux.

Il faudrait étudier le comportement des nanoparticules d'argent dans différentes souches bactériennes et différentes espèces du même genre. Cela permettrait de mieux comprendre la résistance bactérienne.

Le SCENHIR (2015) indique que la résistance bactérienne à l'argent sous forme ionique et aux nanoparticules d'argent a été décrite. Un certain nombre de mécanisme a été observé : diminution de

l'accumulation de l'argent sous forme ionique et de l'argent sous forme nanoparticulaire, augmentation de l'efflux, conversion de l'argent sous forme ionique en sa forme métallique et augmentation de la respiration anaérobie dans les bactéries exposées aux nanoparticules d'argent. Il ajoute que plus de données sont nécessaires pour comprendre la réponse bactérienne à l'exposition aux ions argent et aux nanoparticules d'argent pour pouvoir évaluer le risque de résistance microbienne.

Dans son expertise concernant la mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent », l'ANSES en 2015, a indiqué les points suivants concernant le développement de phénomènes de résistance sur des bactéries exposées à l'argent :

« cette notion de résistance représente différents phénomènes dont les conséquences ne sont pas de même portée :

- *un premier phénomène est la résistance naturelle et intrinsèque de certains microorganismes à l'argent inclus dans le spectre d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent ;*
- *un deuxième phénomène est lié à la présence d'une barrière physiologique (exopolysaccharides, plus largement des biofilms) limitant ou empêchant l'accès de l'argent sous toutes ses formes aux cellules bactériennes cibles ;*
- *un troisième phénomène, observé chez de nombreux microorganismes, consiste en leur capacité d'adaptation de manière transitoire ou définitive par régulation de l'expression des gènes ou mutation; ayant pour conséquence la baisse de leur sensibilité ;*
- *un quatrième phénomène est la capacité de diffusion des gènes de résistance à l'argent portés notamment par des plasmides.*

Les deux derniers phénomènes sont à l'origine de résistance croisée ou de co-résistance avec les antibiotiques.

Sur ce volet de la résistance, il est admis que des bactéries peuvent s'adapter à l'ion argent et qu'un mécanisme ubiquitaire comme l'utilisation des pompes à efflux codées par des gènes portés par des plasmides en sont responsable. Cependant, le faible nombre d'études sur le terrain ne permet pas d'apprécier le risque de propagation de cette résistance.

Les études récentes s'intéressant aux différents aspects de cette résistance conduisent parfois à des conclusions en apparence contradictoires et ne fournissent pas de données sur la disponibilité de l'argent, notamment dans les milieux naturels.

Dans ce domaine, le besoin de standardisation nécessaire à une meilleure interprétation de ces phénomènes de résistance est flagrant. Ce constat rejoint les recommandations du Scenihp sur la définition du terme « nanomatériau » (Scenihp 2010), traitant plus globalement des effets des biocides sur la résistance antibactérienne. Elles suggèrent la mise en place de stratégies de recherches pour :

- *le développement d'outils et de protocoles standardisés pour mesurer la résistance, y compris la résistance croisée ;*
- *l'étude de l'effet de concentrations sub-létales sur l'émergence de résistances aux biocides et aux antibiotiques, prolongée par des expérimentations in situ ;*
- *l'étude de l'impact des biofilms sur ces phénomènes de résistance, y compris de résistance croisée;*
- *le transfert de gènes de résistance et leur propagation.*

Le SCENIHR, 2013 sur les nanoparticules d'argent, insiste également sur le fait qu'aucun document n'est actuellement disponible sur les risques associés à la dissémination de résistance suite à l'utilisation de nanoparticules d'argent.

Bien que la capacité d'adaptation des bactéries à l'ion argent monovalent et les résistances croisées à certains antibiotiques aient été démontrées en laboratoire, sa transposition aux nanoparticules d'argent n'est pas possible à ce jour. En effet, il est toujours difficile d'appréhender le mécanisme d'action réel des nanoparticules d'argent. Par ailleurs, des travaux épidémiologiques, qui aujourd'hui font défaut, devront être entrepris afin de mieux comprendre la réalité du risque d'adaptation des bactéries sur le terrain.

2.2.3 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs communiquant avec l'extérieur

2.2.3.1 De façon indirecte avec le circuit sanguin

Il est noté l'utilisation de nanoparticules d'argent aux propriétés antimicrobienne dans les cathéters veineux, afin de prévenir la formation de biofilms infectieux. (Afssaps, 2011 et SCENIHR, 2014)

Le SCENIHR (2015) indique également l'existence de cathéters avec un revêtement en nanoargent pour le drainage vésical, l'hémodialyse et l'administration locale d'anesthésie. Des cathéters à morphologie nanotopographique imprimés sur la surface exposée sont également identifiés. (SCENIHR, 2015)

2.2.3.2 Tissus, os, dentine

Des nanoparticules dans des composites pour restauration dentaire sont utilisés (Afssaps ; 2011). Les nanoparticules d'argent sont également utilisées en dentaire (Sussman et al 2015).

2.2.3.3 Focus sur les dispositifs utilisés en dentisterie

La dentisterie est l'un des rares domaines des dispositifs médicaux dans lesquels la nanotechnologie a longtemps été utilisée. Depuis les années 1970, les matériaux de remplissage de taille nanométrique ont été utilisés dans les composites dentaires, bien qu'ils aient été appelés à l'époque «composites microfilled» (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015).

Les composites dentaires sont des matériaux reconstituants utilisés pour remplir des cavités ou reconstruire des parties d'une dent. Ils se composent de trois composants principaux : matrice organique, matrice

inorganique (charge) et un agent de couplage. La plupart des composites classiques actuels ont une granulométrie de remplissage dans la gamme de 40 à 700 nm. Les nouveaux composites contiennent des nanocharges avec une taille de particule de 1-100 nm. Les nanocharges améliorent les propriétés mécaniques des composites dentaires en augmentant la force de liaison micro-adhérente, la résistance à la flexion, le module de flexion, la résistance aux fractures et la dureté du matériau (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015). Les nanoparticules ont également été utilisées pour correspondre à la radiopacité des adhésifs dentaires et pour réduire les temps de travail et de fixation des résines dentaires (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015).

En outre, ces nanocomposites offrent des avantages esthétiques en termes de souplesse, de polissage et de translucidité pour modifier, améliorer leurs couleurs par rapport à celles des dents naturelles des patients (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015). Cependant, il semble y avoir un optimum en pourcentage de nanocharge, après quoi les propriétés mécaniques ne s'améliorent plus ou même se détériorent (Atai et al., 2009; Prentice et al., 2006 cités par le RIVM 2015).

Les implants dentaires ont idéalement un taux de performance élevé et une longévité. Les taux actuels d'échec de 5 à 10% sont principalement attribuables à une mauvaise ostéointégration, une infection ou un rejet (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015). Le succès d'un implant dentaire est déterminé par la réponse inflammatoire et le comportement du tissu à l'interface tissu-implant. En conséquence, la chimie et la topographie de la surface de l'implant sont d'une importance majeure (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015). Dans ce type d'utilisation, la nanotechnologie peut faire une différence, car les cellules et les protéines du corps interagissent avec l'implant à l'échelle nanométrique.

Souvent, les nanomatériaux en céramique, tels que l'hydroxyapatite, le verre bioactif et d'autres composés de phosphate de calcium, sont utilisés pour créer des revêtements sur des implants métalliques (Besinis et al., 2015 cités par le RIVM 2015). Ces revêtements augmentent la biocompatibilité des implants et favorisent l'adhérence cellulaire accrue.

Il est suggéré que la taille et la morphologie des particules (par exemple en forme de tige, de prisme) peuvent jouer un rôle dans l'adhésion des cellules osseuses et la formation d'os (Mankani et al., 2001, Shi et al., 2009 cités par le RIVM 2015). Cela correspond à la connaissance actuelle sur les nanoparticules, où la taille et la morphologie peuvent avoir un impact important sur la fonctionnalité et les propriétés des particules.

La nanotechnologie est également utilisée dans d'autres catégories de produits dentaires :

- **Les agents de liaison** sont utilisés pour faire adhérer des composites dentaires et d'autres matériaux à la substance naturelle des dents. L'utilisation de la nanotechnologie assure l'homogénéité des produits et un meilleur mélange dans les solutions adhésives dentaires (Arora et Kapoor, 2014 cités par le RIVM 2015).

- Il existe du **matériel dentaire contenant des nanoparticules d'or et d'argent** qui ont des propriétés antibactériennes ce qui devraient empêcher la formation de caries secondaires sur des dents précédemment traitées (Bednarski et al., 2013, Nanotec Endo cités par le RIVM 2015).
- **Les matériaux d'impression** sont utilisés pour créer une empreinte négative des tissus durs et mous dans la bouche, dans le but de former « une fonte » à un stade ultérieur.
- **Les pâtes d'obturation canalaire.** L'étanchéité du canal radiculaire est importante pour prévenir l'infection par des bactéries. Les nanoparticules, composées de silicate de calcium, de phosphate de calcium, d'hydroxyde de calcium ou de zircone, utilisées dans les pâtes d'obturation des canalisations fournissent une meilleure manipulation et des propriétés physiques optimisées. Les nanoparticules offrent une meilleure adaptation aux dents irrégulières et aux surfaces des canalisations. De plus, la formation d'une nanostructure d'hydroxyapatite dans le canal de la racine fournit des propriétés antimicrobiennes en raison de son pH hautement alcalin (Khurshid et al., 2015 cités par le RIVM 2015).
- **Les matériaux de placage** servent de revêtement dentaire pour améliorer l'esthétique ou pour protéger la surface de la dent. La nanotechnologie sert à améliorer les qualités esthétiques, à prévenir la décoloration et à augmenter la résistance à l'usure des matériaux de placage.

2.2.4 Nanomatériaux utilisés dans les dispositifs implantables

2.2.4.1 Os, tissus, sang

Des nanoparticules sont utilisées dans les produits de comblement osseux. (Afssaps, 2011). Il existe également des implants métalliques nanostructurés.

Il est noté que les nanoparticules d'argent sont aussi utilisées en orthopédie pour leurs propriétés antibactériennes. (Sussman et al, 2015).

Le rapport de l'Afssaps de 2011 cite aussi le développement d'organes artificiels tel que le rein artificiel avec des membranes siliconées nanoporeuses. De plus, pour le traitement de la cécité causée par les rétinopathies pigmentaires, des implants rétiniens à partir d'éléments nano-électroniques sont en cours de développement.

2.2.4.2 Focus sur les substituts osseux

Principe du remodelage osseux

L'os se renouvelle en permanence. C'est un cycle permanent de formation et de destruction de l'os qui est un tissu vivant : il s'agit du remodelage osseux. Dans un premier temps, les ostéoclastes creusent des lacunes dans l'os et vont le détruire. Il s'agit de la phase de résorption.

Ensuite, les ostéoblastes au fond des lacunes creusées, vont combler ces dernières avec des protéines. Il s'agit de la phase de formation. Enfin, c'est sur ce tissu osseux et jeune appelé tissu ostéoïde que le calcium va venir se fixer. Il s'agit de la phase de minéralisation.

Le remodelage osseux a lieu dans l'os spongieux (taux de renouvellement de 25% par an) et dans l'os cortical (taux de renouvellement de 3 à 4% par an). (Site internet de la Société Française de Rhumatologie).

Cependant, dans certains cas, ce processus naturel d'autoréparation est insuffisant (pathologies, interventions chirurgicales) pouvant aboutir à d'importantes pertes de substance osseuse. La reconstruction de l'os doit alors être assistée. (Inserm, fiche thématique « Réparer l'os »), par le biais de la greffe osseuse.

Définition du substitut osseux

D'après la HAS (2013), il n'existe pas pour les substituts osseux de définition technique ou professionnelle, faisant l'objet d'un consensus international tel que c'est le cas par exemple pour les biomatériaux définis par l'European Society of Biomaterials, de même qu'il n'existe pas de définition officielle et réglementaire établie par les pouvoirs publics. Le GESTO devenu SOFROT a proposé, depuis de nombreuses années déjà une définition rappelée dans sa monographie : « peut être considéré comme un substitut osseux tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique,

- destinée à l'implantation chez l'homme ;
- dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux ;
- qu'il s'agisse du renforcement d'une structure osseuse ;
- du comblement d'une perte de substance, d'origine traumatique ou orthopédique ;
- de la consolidation d'une fracture ou de son équivalent.

Outre les biomatériaux, il faut maintenant y ajouter les produits d'ingénierie tissulaire.

Il faudra plutôt parler de substitut de l'os plutôt que de substitut osseux dans la mesure où tous les substitués ne proviennent pas du tissu osseux mais ce terme est consacré par l'usage. »

La greffe osseuse

L'autogreffe (HAS, 2013) :

L'autogreffe est la référence (« gold standard ») pour le comblement d'une perte de substance osseuse. Elle possède l'ensemble des caractéristiques nécessaires à la croissance osseuse : ostéoconduction, ostéo-induction, ostéogenèse et compatibilité immunitaire. La morbidité du site de prélèvement, la quantité restreinte et la qualité variable du matériel disponible sont les principales limites de l'autogreffe, conduisant les professionnels à recourir aux substituts osseux.

Différentes catégories de substituts existent. La classification suivante, non exhaustive, reprend brièvement les différents types de substituts osseux et les distingue selon leur origine (naturelle ou synthétique) et leur composition chimique.

L'allogreffe (HAS, 2013) :

Les allogreffes sont des tissus d'origine humaine. Elles sont ostéoconductrices⁴ et ostéo-inductrices⁵.

Elles sont distribuées par des banques de tissus et sont soumises à des prérequis réglementairement opposables.

Les xéno-greffes (HAS, 2013) :

Les xéno-greffes sont fabriquées à partir de tissus d'origine animale non viables, débarrassés de leur moelle osseuse, ou de dérivés rendus non viables. Elles sont d'origines diverses : corail, seiche, mammifères. La plupart des substituts osseux d'origine animale proviennent de bovins.

Les xéno-greffes sont ostéoconductrices, ostéo-inductrices.

Les xéno-greffes peuvent être céramisées à très haute température. Ce traitement thermique provoque la céramisation de la trame phospho-calcique en détruisant les éléments organiques. Ces substituts osseux sont utilisés en tant que hydroxyapatites biologiques. Tel est le cas de certains matériaux d'origine corallienne, notamment.

Inconvénient de l'autogreffe

Bien que les autogreffes soient le traitement standard actuel pour la régénération des défauts osseux, elles présentent encore des inconvénients tels que la limitation de l'offre de donneurs, la douleur dans le site du donneur ou le risque d'une hémorragie (Li et al 2015)

Inconvénients de l'allogreffe

Il s'agit du risque de rejet immunitaire, la transmission de maladies infectieuses et l'effet négatif sur les propriétés mécaniques et biologiques du greffon (Li et al 2015)

Au cours de ces dernières décennies, afin de surmonter ces inconvénients associés au traitement standard actuel des greffes osseuses, il est observé un intérêt croissant concernant les biomatériaux de substitution (matériaux dérivés et / ou synthétiques). Les substituts de greffe osseuse doivent être biocompatibles, biorésorbables, ostéoconducteurs, ostéoinducteurs, structurellement semblables aux « substituts naturels », faciles ou prêts à l'emploi.

Les matériaux synthétiques (HAS, 2013) :

⁴ Ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur, au contact de ce matériau

⁵ Ostéoinduction : capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable

- Céramiques de phosphate de calcium (HAS, 2013 et Colat-Parros, 2009-2010)

Leur composition chimique est similaire à celle de la phase minérale de l'os, d'où leur potentiel ostéoconducteur. Elles sont fabriquées à partir d'une poudre de synthèse chimique compactée sous un effet de pression associé à un processus thermique (frittage). On distingue principalement les catégories suivantes :

- hydroxyapatite (HA) : les hydroxyapatites synthétiques, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, sont ostéophiles, ostéoconducteurs, non résorbables et biocompatibles. Il existe des hydroxyapatites poreuses ou denses (peu utilisées car ils ne permettent pas l'envahissement cellulaire et osseux).
- phosphate tricalcique (TCP) dont le type le plus utilisé est le β TCP ;
- céramiques biphasées : mélanges en proportion variable de β TCP et HA ;
- céramiques multiphasées : mélanges en proportion variable de β TCP, HA et ciment ionique
- phosphate dicalcique dihydraté (Di-Calcium Phosphate Dihydrate - DCPD), dit « brushite ».

Ces matériaux peuvent être présentés sous forme de pâte modelable dont l'avantage est de s'adapter parfaitement à la forme de la perte de substance osseuse. Ils sont injectés directement dans le défaut osseux afin de remplir les espaces. La prise et le durcissement de la pâte injectée se réalisent sur le site d'injection de manière spontanée, en un temps variable (généralement quelques minutes).

La propriété principale des céramiques de phosphate de calcium est leur bioréactivité, c'est-à-dire, leur capacité à établir des échanges et des interactions avec les cellules, les tissus et les fluides environnants. La dissolution des ions calciums et phosphate issus provenant du substitut osseux conduit à une saturation locale puis une précipitation des ions phosphates et calcium aboutit à la formation de cristaux d'apatite biologique strictement identiques à ceux de l'os natif. Ces cristaux vont se déposer sur les fibres de collagène, il n'y a donc pas d'interposition fibreuse entre les céramiques et les substituts osseux et donc une liaison chimique directe os/céramique se crée (Maîtrise orthopédique, site internet).

- Céramiques de sulfate de calcium

Il s'agit des plus anciens des substituts osseux. Les céramiques de sulfate de calcium correspondent au « plâtre de Paris », obtenu par calcination du gypse. Elles se caractérisent par la résorbabilité la plus rapide de tous les substituts ostéoconducteurs disponibles (4 à 12 semaines).

- Matériaux composites

Ces substituts osseux sont composés d'une céramique de phosphate de calcium ayant un potentiel ostéoconducteur (β TCP et HA), associée à un collagène d'origine animale, utilisé comme matériel ostéo inducteur.

- Autres matériaux (hors champ d'évaluation)

D'autres substituts osseux d'origine synthétique ont été développés pour le comblement d'un défaut osseux. Ils ne sont pas pris en charge par l'Assurance maladie et ne font pas partie du champ de la présente évaluation. Quelques exemples sont mentionnés ci-après :

- substituts osseux d'origine végétale ;
- bioverres (ostéoconducteurs), composés essentiellement de silice, d'oxyde de sodium, d'oxyde de calcium et de phosphates ;
- polymères (ostéoconducteurs) naturels (ex. : à partir de fibres de collagène) ou synthétiques (ex. : à partir de polyméthylmétacrylate (PMMA) ;
- matrice osseuse déminéralisée (ostéoconductrice et ostéo-inductrice), produite par décalcification de l'os cortical (appelée *Demineralized Bone Matrix – DBM*) ;
- substituts osseux à base de facteurs de croissance isolés ou synthétisés, à forte capacitéostéoconductrice (ex. : Transforming Growth Factor α , TGF- α / facteur de croissanceplaquettaire, PDGF / facteur de croissance fibroblastique, bFGF / protéines morphogéniques de l'os humain, rhBMP) ;
- substituts osseux associés à du plasma riche en plaquettes (*Platelet Rich Plasma – PRP*).

Substituts osseux sous forme de nanocristaux

Des nouveaux biomatériaux sont développés :

Les matériaux inorganiques à l'échelle nanométrique peuvent contribuer à la résistance mécanique (Yousefi et al., 2014 cités par RIVM 2015).

◆ Biomatérial composé de polymères naturels et d'hydroxyapatite nanocristalline dépourvu de facteurs de croissance et de cellule. Il démarre un processus de régénération d'une lésion osseuse au bout de 30 jours d'implantation chez le rongeur. Les applications qui sont visées sont l'orthopédie et la chirurgie maxillofaciale. (Inserm, Novembre 2016).

◆ L'hydroxyapatite est utilisé comme un revêtement pour implants orthopédiques et autres implants médicaux pour améliorer l'interaction entre la surface de l'implant et l'os environnant ou des tissus mous. Cette interaction est nécessaire pour la biocompatibilité, la différenciation cellulaire et l'ostéointégration. De nombreux implants orthopédiques ont une surface lisse. Les surfaces lisses induisent préférentiellement la croissance des fibroblastes et le dépôt de tissu fibreux au lieu d'os. Une topographie en surface tridimensionnelle à l'échelle nanométrique imite l'environnement cellulaire et extracellulaire naturel normalement rencontré par les cellules du corps. Une telle structure favorise la différenciation cellulaire et l'adsorption de molécules d'adhésion extracellulaires essentielles à la fonction ostéoblastique. De plus, un revêtement de surface à l'échelle nanométrique augmente la surface de l'implant d'un facteur mille par rapport à une surface à microscale, ce qui permet une plus grande surface de contact entre l'implant et le corps (Sullivan et al., 2014 cités par RIVM 2015).

◆ Substituts osseux à base de nanocristaux : ils se présentent sous forme injectable. Ils sont formés d'un mélange d'hydrogel et de nanocristaux d'hydroxyapatite de taille strictement similaire à ceux de l'os. Les nanocristaux ont une surface spécifique très élevée de l'ordre de m^2/g , ce qui confère une bioréactivité particulière à ces substituts osseux. Ils ne durcissent pas *in vivo*. (Maîtrise orthopédique, site internet). Ces nanocristaux de phosphate de calcium (hydrogel composé de nanocristaux d'HAP) sont bioactifs et bioconducteur. C'est l'os trabéculaire nanométrique qui est imité. La structure obtenue présente un rapport surface poids élevé. La dissolution est donc plus rapide que pour les céramiques phosphocalciques et s'ajoute à la résorption ostéoclastique pour conduire à la résorption du composé en plusieurs mois, avec en parallèle la néoformation osseuse. (Gutermann, et al 2013). Les matériaux nanostructurés peuvent favoriser l'adhérence cellulaire et stimuler la croissance osseuse par rapport aux matériaux conventionnels (RIVM, 2015).

◆ Substituts osseux à base de biocéramique de phosphates de calcium nanoporeuse : sert de support et contrôle le relargage de molécules bioactives.

◆ Développement de matériaux fibreux considérés comme prometteurs dans des applications d'échafaudage osseux, en raison de leur ressemblance avec la structure osseuse puisque l'os lui-même est un matériau composite fibreux composé de collagène et d'hydroxyapatite. Des fibres composites avec des nano- ou microparticules organiques de bioverre, d'hydroxyapatite ou de carbonate de calcium incorporés dans la matrice sont créées par électrospinning. (Holopainen et al 2014).

L'électrospinning est un procédé de mise en œuvre des polymères permettant l'élaboration de membranes non-tissées nanofibreuses (diamètre de fibres de l'ordre de 50 nm à 1 μm) à partir de solution de polymères ou de polymères à l'état fondu. (ICPEES, site internet).

Des revêtements de ces fibres sont appliqués sur des implants pour favoriser l'ostéointégration avec le tissu osseux.

2.2.4.3 Focus sur les stents cardiovasculaires

Il est à noter l'utilisation des nanoparticules d'argent pour leurs propriétés antibactériennes dans ce type d'implants. (Sussman et al, 2015).

Les stents avec des nanoparticules sont développés ci-après (Afssaps, 2011 et SCENIHR 2015), ainsi que d'autres implants cardiovasculaires

Rappel des évolutions relatives aux stents

Dans le cas notamment des maladies coronariennes, le stent est un dispositif médical sous forme de ressort métallique tubulaire inséré par exemple dans les artères (stent artériel ou endoprothèse artérielle) au cours d'une angioplastie. Le stent permet de maintenir ouverte une structure tubulaire de l'organisme et donc de traiter par exemple une artère rétrécie par de l'athérosclérose.

Dans les années 90, les stents nus permettent de fixer la lésion athérosclérotique au niveau de la paroi endothéliale, de recoller les dissections parfois occlusives et de diminuer le retour élastique de l'artère après angioplastie. Toutefois, le taux de resténose à moyen terme était trop important (environ 30%). (Carrié 2014)

La resténose intra stent est une réaction de cicatrisation excessive de la paroi vasculaire en réponse à l'implantation du stent, caractérisée par une hyperplasie de la néointima responsable d'un rétrécissement de la lumière artérielle. Elle est classiquement définie comme une réduction de plus de 50% en diamètre de la lumière artérielle à distance de l'implantation d'un stent. (Maurel et al 2013)

Dans les années 2000, les stents actifs (stent à élution médicamenteuse) sont arrivés sur le marché, permettant de réduire le taux de re-sténose intra-stent d'environ 30% à 5%. Cependant, on observe avec ce type de stents une endothélialisation incomplète pouvant conduire à une thrombose tardive (Yin et al, 2014)

Puis dans les années 2005-2006, l'utilisation des stents actifs composé de la matrice d'un stent nu à laquelle est ajouté un polymère contenant une substance active médicamenteuse (régulant la division cellulaire ou empêchant la thrombose, Ceyda Tuba Sengel, 2015) ont montré une diminution des resténose de 30% à 5% mais une augmentation du risque de thrombose tardive. Cette anomalie, la thrombose tardive, est en partie due à la présence de polymères à la surface du stent qui, même s'ils ont une structure biodégradables, provoquent une inflammation et augmentent la sensibilité aux thromboses, Ceyda Tuba Sengel, 2015).

Composition

Le matériau d'origine est l'acier inoxydable. Ensuite des alliages de chrome-cobalt et de platine-chrome ont été utilisés. Enfin, le nitinol est utilisé pour les stents auto-expansibles.

La radio opacité a été améliorée et la diminution de l'épaisseur des mailles, permet une augmentation de la conformabilité et de la flexibilité.

Les polymères ont aussi évolué. En effet, la présence d'un polymère durable peut retarder la cicatrisation artérielle, créer de l'inflammation, voire un anévrisme coronaire et augmenter le risque de thrombose tardive.

- Les stents avec des polymères durables permettent la libération de la substance médicamenteuse pendant les 3 premiers mois. Cependant, la persistance d'un polymère non résorbable au contact de la paroi vasculaire, longtemps après le relargage complet du médicament, est responsable d'une inflammation locale et d'un retard de cicatrisation, pouvant entraîner la thrombose du stent. (Maurel et al 2013)
- Les stents avec des polymères biodégradables : permettent une diminution du risque de resténose dans les premiers mois après la pose grâce à la molécule active puis la résorption du polymère peut être associée à une réaction inflammatoire importante créant parfois un environnement acide

et le risque de thrombose tardive reste semblable à celui d'un stent nu. De plus, une réponse immunitaire persistante peut également survenir lors de la dégradation des monomères. (Maurel et al 2013).

- Les stents sans polymère doivent trouver un système de délivrance du médicament et redevenir un stent nu à moyen terme. Il existe plusieurs variétés de stents sans polymère tels que les systèmes poreux ou microporeux, les réservoirs ou microréservoirs et les **nanoparticules**. Ils ont l'avantage d'éviter la présence prolongée d'un polymère, d'améliorer la cicatrisation, d'améliorer la surface du stent et de réduire la durée de la thérapie anti-thrombotique associée. (Maurel et al 2013)
- Les stents totalemt biorésorbables : d'apparition récente sur le marché, ont pour objectif de fournir un support architectural temporaire à la paroi du vaisseau. Leur principe est d'apporter la substance active et le support mécanique du stent jusqu'à la cicatrisation de la paroi vasculaire, puis de se résorber totalement afin d'éviter les risques de thrombose et de réduire la durée du traitement antiagrégant plaquettaire. Physiologiquement, l'absence de rigidité métallique doit permettre de favoriser de nouveau la vasomotricité de la paroi vasculaire et de réduire les contraintes de cisaillement, l'élargissement de la paroi et le remodelage tardif (Maurel et al 2013). Les polymères de stents bioabsorbables sont souvent composés de polylactides tels que l'acide polylactique ou le polycarbonate. Ils sont complètement métabolisés dans environ 12 à 18 mois. A ce jour, les performances de ces stents restent à confirmer.

Utilisation des nanotechnologies dans les stents actifs :

La nanotechnologie pourrait offrir une nouvelle voie pour l'amélioration de la technologie actuelle des stents. Les applications de la nanotechnologie peuvent être divisées en deux groupes en fonction de leurs stratégies thérapeutiques: une stratégie anti-resténose pour prévenir la prolifération des SMC et une stratégie de restauration de l'endothélium fonctionnel.

Deux systèmes de distribution sont envisagés, avec et sans revêtement supplémentaire à la surface du stent nu.

- Les stents métalliques non revêtus qui ont un médicament à leur surface ou incorporés dans des pores macroscopiques ou des nanopores, permettent une délivrance rapide de médicaments.
- Les stents métalliques revêtus d'une couche externe de polymère (bioabsorbable ou non bioabsorbable) peuvent être chargés par des médicaments, ce qui permet une administration contrôlée et soutenue des médicaments, ce qui pourrait permettre des interactions plus optimales entre les médicaments et les tissus. (Yin et al, 2014)

Dans la stratégie anti-resténose, la formation de néo-intima dans le stent peut être empêchée par l'administration assistée par nanoparticules d'agents thérapeutiques antiprolifératifs et anti-inflammatoires de faible poids moléculaire ou par ablation thermique de cellules inflammatoires avec des nanoparticules activables par la lumière. Les nanoparticules, découplées des stents, peuvent permettre un contrôle spatio-

temporel de l'administration du médicament afin de maximiser les effets antiprolifératifs tout en minimisant la toxicité systémique. Dans la stratégie de restauration anatomique, la ré-endothélialisation peut être facilitée en utilisant des échafaudages nanofibres qui imitent la matrice extracellulaire dans les vaisseaux, ou en utilisant des nanoparticules magnétiques pour la délivrance améliorée de cellules aux montants de stent sous des champs magnétiques. (Yin et al, 2014)

L'administration de médicaments utilisant des nanoparticules de polymère biodégradable en tant que supports a généré un intérêt immense en raison notamment de leur aptitude à faciliter une libération prolongée du médicament. Malgré les avantages potentiels des nanoparticules en tant que systèmes intelligents de délivrance de médicaments et de diagnostic, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour évaluer les problèmes potentiels de toxicité liés aux propriétés chimiques des nanoparticules, ainsi qu'à leur taille et leur forme. (Yin et al, 2014)

L'incorporation de nanoparticules dans la couche de revêtement polymère sur les stents actifs améliore profils de libération du médicament (Yin et al, 2014).

L'évaluation des stents de cobalt-chrome « nanocoatés » avec du Polyzène-F dans un modèle animal a donné des résultats favorables (Yin et al, 2014).

La technologie de surface Polyzene®-F de CeloNova Biosciences, Inc (USA) est thrombo-résistante, et favorise une endothélialisation rapide. Polyzene®-F est un revêtement polymère nano-mince (≤ 50 nm) appliqué aux stents en métal nu, qui évite l'ajout de la thérapie antiplaquettaire à long terme. (RIVM, 2015)

Les particules inférieures à 5 nm fuient rapidement au travers de la paroi des vaisseaux et sont rapidement éliminées par filtration rénale et. (Wang et al 2016).

Ainsi, la combinaison de la nanotechnologie avec le dispositif cardiovasculaire peut fournir une clé de la solution en induisant la prolifération des cellules endothéliales, tout en supprimant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en même temps. (Ceyda Tuba Sengel, 2015)

Dispositifs Médicaux coatés avec des nanoparticules :

En 1997, Labhasetwar et al cités par Ceyda Tuba Sengel 2015 ont étudié la puissance des systèmes d'administration de médicaments nanoparticulaires polymères développés sur le traitement de la resténose en utilisant un modèle artériel ex vivo. Ils ont préparé des nanoparticules polymères de poly (lactide-coglycolide) (PLGA) et ont modifié leurs surfaces par un agent cationique. L'étude modèle ex-vivo a démontré que l'absorption artérielle de nanoparticules revêtues en surface était 10 fois plus élevée que celle non coatées de nanoparticules.

Dans le prolongement de cette étude, les mêmes chercheurs ont conçu une autre expérience et produit des médicaments anti-sténoses encapsulés dans des formulations de polymères nanoparticulaires. Ils ont évalué l'aptitude à l'absorption de ces systèmes dans un modèle ex-vivo utilisant l'artère carotide de chien.

Cette étude a démontré que l'absorption artérielle dépend de la taille des particules et que celles d'environ 100 nm de diamètre pénètrent dans la paroi artérielle mieux que celles de 200 nm. Il a été également rapporté que lorsque l'artère n'était pas lavée, environ 26% des nanoparticules avaient été retenues, alors que si les nanoparticules en contact étaient suivies d'un lavage avec la solution de Ringer, la rétention a chuté à 6%. Ce résultat indique la possibilité de laver les nanoparticules revêtues de la surface du stent par le flux vasculaire.

La même année, ils ont étudié la rétention artérielle des systèmes nanoparticulaires polymères dans les artères coronaires porcines par un modèle *in vivo*. Cependant, ils ont trouvé une réduction de la capacité d'absorption des nanoparticules, par rapport aux résultats du modèle *ex vivo*

En 2002, Labhasetwar et son équipe de recherche, cités dans Ceyda Tuba Sengel 2015 ont évalué la puissance d'absorption et la localisation des nanoparticules par les cellules endothéliales. Ils ont rapporté que les nanoparticules préférentiellement localisées dans le cytoplasme des cellules et les nanoparticules d'environ 70 nm ont montré une absorption 27 fois plus élevée que celle des particules qui avaient approximativement 200 nm de diamètre.

Des résultats similaires ont été rapportés par différents chercheurs. Luderer et al ont préparé des nanoparticules de poly (D, L-lactide) chargées en sirolimus préparées avec un diamètre d'environ 250 nm. Ils ont conclu que les nanoparticules développées semblaient plus efficaces que le médicament libre dans l'inhibition de la prolifération lisse des cellules endothéliales sans affecter la multiplication des cellules endothéliales.

En 2004, Westedt et ses collègues cités dans Ceyda Tuba Sengel 2015, ont d'abord conçu les ballons de cathéter enduits de nanoparticules qui libèrent nano-soutports localement et montrent une libération de médicament biphasique. Westedt et son équipe ont évalué la capacité d'absorption artérielle des nanoparticules fluorescentes marquées qui ont été libérées d'un cathéter ballon microporeux. En conclusion, ils ont observé une plus grande absorption de nanoparticules.

Ce point de vue a apporté une autre perspective et une nouvelle approche relative au "revêtement des supports nanométriques sur la surface de stent au lieu de revêtement de nanoparticules sur ballons", a émergé.

En 2009, Nakano et al. cités dans Ceyda Tuba Sengel 2015, ont préparé des formulations de nanoparticules et ont revêtu leurs surfaces de chitosan pour obtenir une électrodéposition. Ensuite, les nanoparticules ont été posées sur une surface d'endoprothèse métallique par une technique de revêtement électro-cationique. Le revêtement de chitosan a également donné une charge de surface cationique aux nanoparticules. Cette cationicité aide davantage à l'absorption intracellulaire en raison de l'interaction avec des membranes cellulaires chargées négativement. Les résultats d'études *in vivo* réalisés sur le modèle porcin indiquent que les stents enrobés de nanoparticules encapsulées par la fluorescéine (FITC) présentent une

fluorescence dans des couches de néo-intima et de milieu comparativement aux stents revêtus exclusivement de polymère FITC qui n'ont pas de fluorescence.

En 2013, le consortium de Recherche médicale privée Private Ltd., Envision Scientific Private Ltd. et l'équipe de travail du professeur Lemos cités dans Ceyda Tuba Sengel 2015, ont rapporté un nouveau stent implantable cardiovasculaire. Ce système est constitué d'un nouveau système de nano-support encapsulé au sirolimus à base de phospholipides, exempt de polymères, revêtu sur des cathéters ballonnets autonomes et sur des stents avec des ballonnets précoupés. Les composants à base de phosphate de calcium rarement fixés à la surface des nanoparticules, conduisent à la libération du médicament encapsulé par les changements de pH. Cependant, des études pré-cliniques ont été réalisées uniquement sur les ballons basés sur le nanosystème. Les essais de phase clinique de ces systèmes sont encore en cours.

Le RIVM (2015) indique des exemples de nanomatériaux utilisés pour développer des matériaux nanocomposites synthétiques. Par exemple, des nanoparticules de silsesquioxane (POSS) oligomères polyédriques (~ 1,5 nm de diamètre) peuvent être incorporées dans le poly (carbonate-urée) uréthane (PCU) par modification covalente (Ghanbari et al., 2011 cités par RIVM 2015). Le nanocomposite POSS-PCU a montré une excellente hémocompatibilité avec des propriétés de surface anti-inflammatoires et anti-thrombogènes. L'incorporation de structures de nanocage POSS modifie la morphologie du polymère PCU et fournit une rugosité de surface à l'échelle nanométrique qui est plus favorable pour les interactions cellulaires endothéliales et le comportement cellulaire par adhérence, la croissance et la prolifération par rapport aux surfaces plus lisses. En outre, les groupes fonctionnels de la structure POSS nanocage au sein de POSS PCU ont le potentiel d'être encore modifiés par l'incorporation de peptides bioactifs, de facteurs de croissance, de ligands récepteurs et / ou d'anticorps avec la matrice polymère. (RIVM, 2015)

Ces dernières années, d'autres nanocomposites utilisant la cellulose bactérienne nanofibreuse, la fibroïne de soie, les nanotubes de carbone et les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont été explorées pour des applications de stents et greffons cardiovasculaires (Vellayappan et al., 2015 cités par RIVM 2015). L'inclusion cellulosique bactérienne dans un matériau a été trouvée pour améliorer la résistance mécanique et la compatibilité sanguine du nanocomposite. La fibroïne de soie améliore la résistance mécanique du matériau de la matrice. L'inclusion de nanotubes de carbone améliore l'hémocompatibilité, l'endothélialisation et la résistance mécanique. Lorsqu'on incorpore des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer dans le matériau de matrice, on trouve qu'elles améliorent l'activité antibactérienne de l'hôte.

Ceylan et al cités par Yin et al, 2014, ont développé un revêtement stent bioactif en conjuguant des nanofibres peptidiques amphiphiles avec un épitope REDV qui favorise sélectivement l'adhésion et l'étalement des CE sur les SMC et les plaquettes et une molécule Dopa qui forme une forte liaison hydrogène avec les surfaces hydrophiles en acier inoxydable, immobilisant de manière sûre la nanofibre sur la surface du stent.

Le PDGF (Platelet-derived growth factor) joue un rôle central dans la pathogenèse de la resténose. Par conséquent, une hypothèse a été émise, que les stents polymérisables à élution nanoparticulaire encapsulés par mésylate d'imatinib (inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur de PDGF) pourraient atténuer la formation de néo-intima stent. Les effets des stents à élution de nanoparticules incorporés à l'imatinib sur la formation de la néo-intima et la cicatrisation endothéliale ont été examinés dans un modèle de stent d'artère coronaire de porc. Les effets de l'imatinib-nanoparticule ont également été examinés dans des cellules en culture. Dans une étude cellulaire en culture, les nanoparticules d'imatinib ont atténué la prolifération de SMC vasculaires associées à l'inhibition de la molécule cible (phosphorylation du récepteur PDGF- β), mais n'ont pas montré d'effet sur la prolifération endothéliale. Dans un modèle de stent d'artère coronaire de porc, les stents d'imatinib-nanoparticules ont sensiblement atténué la sténose et la formation de néo-induction stentale d'environ 50%, évaluée par angiographie, histopathologie et imagerie par ultrasons intravasculaire. Les stents à élution d'imatinib-nanoparticules ont également atténué l'activité protéine kinase, mais n'a pas affecté l'inflammation et la ré-endothélialisation.

Ces données suggèrent que la suppression de la formation de néo-intima par un stent d'imatinib-nanoparticules peut être prometteuse en tant que système de délivrance de nanoparticules de ciblage moléculaire pour la prévention des ISR.

Bhargava et al. cités dans Yin et al 2014 ont évalué la réponse des artères coronaires porcines à un nouveau stent sans polymère de cobalt-chrome revêtu de nanoparticules de carbone-carbone éluant par le paclitaxel. Il a été implanté dans les artères coronaires porcines seize stents de cobalt-chrome non polymères revêtus de carbone-carbone avec deux doses différentes de paclitaxel (huit de chaque). De plus, huit stents de cobalt chromés revêtus d'un polymère biodégradable ont également été étudiés.

Les animaux ont été sacrifiés 6 semaines après l'implantation du stent et une analyse histomorphométrique a été effectuée.

Les résultats ont été comparés entre les trois groupes d'endoprothèses. Les stents de cobalt-chrome revêtus de carbone-carbone avec des doses faibles et moyennes de paclitaxel ont toutes deux démontré des caractéristiques de performance acceptables en ce qui concerne l'endothélialisation, l'hyperplasie néo-intimale, la sténose en pourcentage de diamètre, la réponse inflammatoire et la tendance au dépôt de fibrine. Cependant, les stents revêtus de polymères biodégradables de poly (lactide) et de poly (lactide-co-glycolide) et de 0,7 $\mu\text{g} / \text{mm}^2$ de paclitaxel ont présenté des performances médiocres. Il y avait une tendance significative à une mauvaise endothélialisation, une hyperplasie néo-intimale supérieure, un pourcentage de sténose du diamètre, une plus grande réponse inflammatoire et une tendance au dépôt de fibrine ($P < 0,01$ pour tous les paramètres). Cette évaluation préclinique démontre l'innocuité et l'efficacité d'un nouveau stent cobalt-chrome avec un revêtement carbone-carbone et des doses faibles et moyennes de paclitaxel.

On sait que les statines inhibent la prolifération de SMC vasculaires et favorisent la cicatrisation vasculaire.

Parmi les six statines commercialisées, la pitavastatine (Pitava) s'est révélée avoir les effets les plus puissants sur la prolifération des SMC vasculaires et la régénération endothéliale *in vitro*. Tsukie et al. [115] ont formulé un endoprothèse à élution de nanoparticules de Pitava (20 µg de Pitava par stent).

Dans un modèle d'artère coronaire de porc, les stents à élution de nanoparticules de Pitava ont atténué l'ISR aussi efficacement que les stents à élution de sirolimus (SES) revêtus de polymère. Dans les sites SES, des effets de cicatrisation endothéliale retardés ont été notés, alors qu'aucun effet de ce type n'a été observé dans les sites de stents à élution de nanoparticules de Pitava.

Les endoprothèses de Pitava-nanoparticules ont atténué l'ISR aussi efficacement que le SES sans les effets retardés de guérison endothéliale du SES dans un modèle d'artère coronaire porcine. Ces résultats suggèrent que cette plate-forme de la nanotechnologie pourrait être développée dans un dispositif plus sûr et plus efficace à l'avenir.

◆ Luderer et al. cités par Yin et al 2014 ont déterminé l'applicabilité des nanoparticules biodégradables de poly (D, L-lactide) (PDLLA) chargées de sirolimus en tant que vecteurs de médicaments pour empêcher les processus resténiques après implantation de stent.

Les nanoparticules chargées de sirolimus à 20% (p / p) de taille moyenne de 250 nm ont été caractérisées de façon extensive en ce qui concerne la dégradation *in vitro*, la biocompatibilité et la libération *in vitro* du médicament. Les particules ont démontré une cinétique de libération biphasique consistant en une libération rapide par éclatement de 50% (p / p) de charge utile de sirolimus, suivie d'une phase de libération plus longue, plus lente, qui étaient souhaitables pour leur application en tant que support de délivrance de médicament. Tous les résultats présentés démontrent le potentiel des nanoparticules de PDLLA chargées de sirolimus en tant que systèmes prometteurs de délivrance de médicaments locaux et soutenus administrés par voie intraluminale pour réduire la ISR après implantation de stent.

◆ Acharya et al. cités par Yin et al 2014 ont optimisé les conditions physico-dynamiques du système polymère comme substrat de revêtement pour les stents contre la resténose. Comme l'oxyde nitrique (NO) a des activités multifonctionnelles telles que la régulation du flux et de la pression sanguine et l'influence de la formation de thrombus, une livraison continue et spatiotemporelle de NO chargé dans les nanoparticules à base de polymères pourrait être une option viable pour réduire et prévenir la resténose.

Pour identifier le support le plus approprié pour la S-Nitrosoglutathione (GSNO), un promédicament de NO, les stents ont été revêtus de divers polymères, tels que le poly (acide lactique-glycolique) (PLGA), le polyéthylène glycol (PEG) et la polycaprolactone (PCL) utilisant la technique d'évaporation du solvant.

Les stents recouverts de la matrice PCL ont présenté des profils de libération de médicament plus soutenus et contrôlés que ceux enduits de PLGA et de PEG.

Les stents recouverts de la matrice PCL présentaient le taux d'adhérence plaquettaire le plus bas.

Par la suite, les stents revêtus de la matrice PCL ont été soumis à d'autres processus d'optimisation pour améliorer la morphologie de surface et améliorer la durée de libération du médicament. Les résultats de l'étude ont démontré qu'une matrice PCL contenant du GSNO est un système prometteur pour le revêtement de surface du stent contre la resténose.

Le Tableau 12 suivant reprend quelques exemples de dispositifs médicaux cardiovasculaires coatés avec des nanoparticules.

Tableau 12: Exemples de dispositifs médicaux cardiovasculaires coatés avec des nanoparticules

Médicament	Système nano-support	Résultats	Auteurs
Imatinib mesylate	Stent à élution de nanoparticules d'Imatinib	Une sténose et une sténose in-stent atténuées d'environ 50% dans le modèle de stent coronaire de porc	Masuda et al
Paclitaxel	Endoprothèse non polymère de cobalt-chrome revêtue de carbone-carbone	Caractéristiques de performance acceptables, en ce qui concerne l'endothélialisation, l'hyperplasie néo-intimale, la sténose en pourcentage de diamètre, la réponse inflammatoire et la tendance au dépôt de fibrine dans les artères coronaires porcines.	Barghava et al
Pitavastatin (Pitava)	Stent à élution de nanoparticules de Pitavastatin	Atténuation de la resténose intra-stent aussi efficacement que les stents à élution de sirolimus revêtus d'un polymère dans un modèle d'artère coronaire de porc	Tsukie et al
S-Nitrosoglutathione (GSNO)	Les stents ont été revêtus de divers polymères tels que le poly (D, L-lactide-co-glycolide (PLGA), le polyéthylène glycol (PEG) et la polycaprolactone (PCL)	Les stents revêtus de la matrice PCL présentent des profils de libération de médicament plus soutenus et contrôlés que ceux revêtus de PLGA et de PEG; Le taux d'adhérence plaquettaire le plus faible	Acharya et al

◆ Dans la recherche sur les matériaux vasculaires, l'héparine inhibe la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et empêche ainsi l'hyperplasie intimale. Nakano et al cités par Liu et al 2017, ont

développé un système stent de délivrance de médicament à médiation par nanoparticules par une technologie de revêtement par électrodéposition cationique et ont démontré une efficacité favorable dans la libération de médicament témoin. Dans notre étude récente, de nouvelles nanoparticules d'héparine / PLL (poly-L-Lysine – polymère cationique) ont été préparées et immobilisées sur une surface revêtue de dopamine, sur laquelle les nanoparticules offrent un comportement de libération favorable pour la direction sélective des plaquettes et le comportement des cellules vasculaires.

En résumé, les technologies actuelles de revêtement des nanoparticules sur les endoprothèses cardiovasculaires implantables sont une stratégie de traitement en place et à venir pour la thérapie des maladies cardiovasculaires. Les développements récents dans ce domaine vont encore renforcer la transition de ces stratégies vers le marché.

Dispositifs Médicaux nanostructurés :

◆ Un procédé exclusif a été développé par Hexacath (France) pour revêtir l'oxyde de nitrure de titane sur la surface de stent, sur la base d'une technologie plasma utilisant la nanosynthèse d'un mélange gazeux pré-spécifié d'azote, d'oxygène et de métal. Ce dépôt de titane en phase vapeur à plasma amélioré dans une chambre à vide peut être appliqué à différents métaux, par exemple l'acier inoxydable, les alliages cobalt-chrome-cobalt ou nickel-titane. Ce revêtement est extrêmement dense et dur, ce qui rend les stents revêtus d'oxyde de nitrure de titane extrêmement bien adaptés pour le stent direct. (RIVM, 2015)

◆ Les techniques à base de fluides supercritiques sont utilisées pour la production de nanoparticules, de nanofibres, de nanofils, de nanotubes, de nanofilms et de matériaux nanostructurés (Fulton et al., 2003 cités par RIVM 2015) et aboutissent à des nanomatériaux avec des performances potentiellement meilleures. Une technologie de fluide supercritique est utilisée pour s'appliquer au procédé de revêtement électrostatique, ce qui a pour résultat le dépôt de poudre sèche, de médicaments hydrophiles cristallins, (par ex. Sirolimus) sur la surface du stent. Du fait que le médicament n'est jamais dissous dans un solvant, la structure cristalline est maintenue pendant l'application du revêtement. Le médicament et le polymère sont stratifiés sur le stent et chaque couche est frittée pour fusionner le revêtement en un film lisse, conforme, bien adhérent. Le maintien de la structure cristalline du sirolimus dans le revêtement confère une stabilité accrue au médicament.

◆ D'après Ceyda Tuba Sengel 2015, au cours des dernières années, des recherches ont été menées sur les implants biomédicaux nanostructurés conçus par la voie de topographie de surface. La première étude dans ce domaine appartenait à Reed et al cité dans Ceyda Tuba Sengel 2015. En 1998, ils ont évalué l'intégration de la technologie de microstructures avec des stents vasculaires coronaires permettant la délivrance de médicaments antirésthéniques dans les artères coronaires en perçant à travers la plaque. Cependant, ce système n'a pas été capable de transporter les médicaments dans les couches artérielles au contraire des nanoparticules. Une solution à ce problème a été apportée par Wang et al. Wang et ses collègues ont insisté sur un revêtement du stent sans polymère en optant pour un revêtement composite

de nanotubes de carbone et de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse. Iakovou et al. [40] ont développé une approche alternative – en créant une nanotopologie - au lieu de recouvrir les nanotubes sur les stents.

Cette approche a impliqué la conception d'une surface stent métallique pour créer une nanostructure. Avec le découpage d'une surface exempte de polymère, le risque de thrombose induit par le polymère disparaît et ainsi, la complication majeure des stents actuellement commercialisés aura été surestimée. Ces stents nanoporeux ont l'avantage de permettre une capacité de chargement de médicament plus élevée (Mc Ginty et al 2015). Iakovou et al., ont également souligné avec cette étude que le risque et le taux de formation de thrombose étaient significativement plus faibles dans les stents métalliques nus que les stents à élution médicamenteuse. Ceci remet en question en soi la pratique consistant à former une matrice médicament-polymère sur la surface du stent et ouvre une voie pour fournir efficacement une concentration à long terme de médicament localement mais pose un tout nouveau problème de thrombose.

◆ Différents groupes de recherche travaillent sur les technologies de fabrication de fils entièrement métalliques avec des caractéristiques de surface nanostructurées. Le dépôt chimique en phase vapeur à haute température est une technique bien connue pour graver chimiquement des surfaces qui donne des propriétés de surface souhaitées. Récemment, Loya et al, cités par Ceyda Tuba Sengel 2015, ont exploré le plasma radiofréquence pour la création de structures nanopillaires métalliques émanant radialement sur des surfaces de stent, créant une texture dense et poreuse capable d'affecter les cellules vasculaires. De telles nanostructures métalliques sur les surfaces d'endoprothèse vasculaire peuvent fournir une opportunité d'amélioration de la sécurité d'utilisation de stents, avec une approche sans polymère qui réduit le risque de formation de thrombus chez les patients. Les applications de stent qui composent des surfaces métalliques nanostructurées peuvent éventuellement conduire à la réutilisation de stents métalliques nus.

◆ Une perspective importante sur la conception et l'ingénierie des stents est leur interaction avec les cellules endothéliales et leurs effets sur le processus d'endothélialisation. Jia et al. cités par Ceyda Tuba Sengel 2015, ont étudié l'efficacité des stents en acier inoxydable nanostructurés sur le mécanisme d'endothélialisation des cellules. Les stents en acier inoxydable nanostructurés chargés avec du paclitaxel ont été testés. Les études in vivo, qui ont été effectuées sur un modèle porcin, ont démontré que les stents préparés :

- conduisent à une ré-endothélialisation rapide ;
- favorisent la cicatrisation des vaisseaux avec moins de dépôt de fibrine ;
- réduisent les réponses inflammatoires par rapport à un stent de polymère à base de sirolimus et à un stent métallique nu.

En résumé, la technologie de cisaillement d'une surface de stent métallique à l'échelle nanométrique modifie positivement les réponses des cellules vasculaires pour stimuler spécifiquement l'adhésion et la prolifération

du type cellulaire requis, en particulier les cellules endothéliales conduisant à une ré-endothélialisation et réduire celle des cellules musculaires lisses vasculaires qui conduisent à une réaction défavorable. On s'attend non seulement à ce que ce type de stents élimine le risque de thrombose liée à l'endoprothèse, mais conduise aussi à la restauration de la fonction physiologique des vaisseaux traités.

Ceyda Tuba Sengel, 2015 indique les principaux avantages aux systèmes d'administration de médicaments nanoparticulaires sont :

Tableau 13: Avantages des dispositifs médicaux implantables cardiovasculaires coâtés avec des nanoparticules et nanostructurés

Dispositifs Médicaux implantables cardiovasculaires	Avantages
Dispositifs médicaux coâtés avec des nanoparticules	<ul style="list-style-type: none"> -Minimise les changements de la toxicité locale des médicaments en fournissant une libération prolongée -Forte absorption par les tissus attribuée à leur taille de sous-micron et sous-cellulaire - Biocompatibilité plus élevée et une moindre toxicité en évitant l'utilisation de polymères -Protection de médicaments chimiquement labiles en fournissant une enveloppe inerte
Dispositifs médicaux nanostructurés	<ul style="list-style-type: none"> -Imite la topographie sous-micronique du tissu interne renforçant la compatibilité du sang ou des tissus du biomatériau - Améliore la prolifération des cellules endothéliales - Supprime la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires

Stents à élution de gènes :

D'après Yin et al 2014, les stents à élution de gènes utilisent des stents comme échafaudages permanents pour obtenir une délivrance localisée et soutenue de gènes thérapeutiques à la paroi du vaisseau affectée.

Les stents à élution de gènes ont récemment été proposés comme une nouvelle méthode pour contourner les problèmes rencontrés dans les stents nus et les stents actifs. En utilisant la nanotechnologie, l'administration prolongée et localisée de gènes peut atténuer les problèmes de resténose et de thrombose tardive du stent en accélérant la capacité régénératrice de la ré-endothélialisation.

Vecteurs de délivrance : Transfert de gènes médié par un plasmide non viral

Dans la distribution de gènes à base de nanoparticules lipidiques, une étude préliminaire de Muhs et al cités par Yin et al 2014, a examiné la délivrance de plasmide iNOS à des modèles de lésion fémorale et coronarienne porcine en utilisant un vecteur complexe lipide-ADN (lipoplex), qui a été produit par complexation du plasmide iNOS avec le lipide cationique DAC-30 [un mélange du lipide monocaténique 3 β -N, N'-diméthylaminoéthane) -carbamoylcholestérol (DAC) à 30% p / p et le colipide neutre dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) à 70%, p / p.

Le transfert de gène iNOS médié par des liaisons cationiques combiné à une délivrance locale par un cathéter d'infusion Infiltrator a été montré pour permettre une expression suffisamment élevée de la protéine iNOS pour produire une efficacité thérapeutique dans la diminution de la formation néointimale.

Dans la distribution de gènes à base de nanoparticules polymères, contrairement à l'administration de nanoparticules lipidiques, peu d'études ont exploré des vecteurs polymères à base de nanoparticules pour la délivrance de gènes intravasculaires. Une étude *in vitro* de Kim et al. cités par Yin et al 2014, ont rapporté une efficacité de transfection du gène rapporteur considérablement accrue avec l'utilisation de polyplexes d'ADN / polyéthylénimine (PEI) plasmidique cationique GFP adsorbés sur des stents recouverts d'acide hyaluronique (HA) via de fortes interactions électrostatiques entre des polyplexes d'ADNc / PEI cationiques et HA anioniques.

Une autre nouvelle approche de délivrance de gènes à base de nanoparticules polymères a été décrite par Zhu et al cités par Yin et al 2014 et implique des endoprothèses par pulvérisation avec des nanoparticules d'ADN de plasmide de chitosane dodécylées (DCDNP). Un vecteur de gène final à base de polymère qui a été utilisé avec succès dans la thérapie génique intravasculaire utilise le copolymère biocompatible et biodégradable poly-DL-lactide / glycolide (PLGA), qui est l'un des rares polymères synthétiques approuvés pour l'utilisation chez l'homme.

Plateformes de délivrance

Ces dernières années, la nanotechnologie a été utilisée dans la conception de plates-formes de délivrance de gènes à base de stent, que ce soit dans des surfaces nanotexturées pour améliorer la biocompatibilité et améliorer les interactions cellule-stent ou dans spécifiquement ciblées, Et d'améliorer l'attachement endothélial, la prolifération et la migration.

Le tableau 14 **Tableau 14** reprend des exemples de stents recouverts de nanoparticules à élution de gènes :

Tableau 14: Stents recouverts de nanoparticules à élution de gènes

Gènes	Système nano-support	Résultats	Auteurs
Chitosane-ADN plasmidique	Les stents recouverts de nanoparticules d'ADN de	L'activité du gène rapporteur a été observée	Zhu et al

	plasmide chitosane dodécylé (DCDNP)	dans la région de l'artère en contact avec les stents DCDNP chez les animaux	
GFP (Green Fluorescent Protein)	Adénovirus; Stents recouverts de nanoparticules à base de polylactide (PLA) conjuguées à des protéines de liaison à l'Ad	L'augmentation de la transduction génique par l'absorption cellulaire indépendante du vecteur Ad dans les cellules souches aortiques de rat (A10), les cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) et les cellules d'endothéliome murin (H5V) de type coxsackie-adenovirus (CAR)	Chorny et al
VEGF (Vasculaire Endothelial Growth Factor) Angiopietin-1	Les nanoparticules ou nanoparticules endosomolytiques de peptide / ADN d'endosomolytic de Stent hybridées aux nanotubes de carbone à paroi simple enveloppés d'acide polyacrylique (PAA) (nanoparticule-CNT)	Re-endothélialisation améliorée de l'artère lésée, sténose atténuée et prévention de la formation de néo-intima dans l'artère fémorale canine	Paul et al
VEGF Paclitaxel	Stent revêtu de nanoparticules PLGA bicouches contenant un plasmide VEGF dans la couche externe et du paclitaxel dans le noyau interne	Ré-endothélialisation complète démontrée et suppression significative de la resténose intra-stent après 1 mois chez les mini-porcins	Yang et al

2.2.4.4 Les ballons à revêtement médicamenteux

Le cathéter de dilatation coronaire DIOR® (Eurocor GmbH, Allemagne) est revêtu d'une matrice nanoporeuse constituée de gomme laque, d'une résine naturelle et de paclitaxel. En contact avec le liquide corporel, c'est-à-dire le sang, le réseau de gomme-laque hydrophile du composite nanoporeux gonfle et ouvre la structure pour la libération rapide de paclitaxel induite par la pression sur le ballonnet gonflé. Les

ballons enduits de médicament ont déjà fait leurs preuves dans les essais cliniques pour le traitement de la resténose intra-stent. Son application coronarienne peut éventuellement être élargie à des sous-ensembles de lésions coronariennes de novo complexes, comme les vaisseaux de petit diamètre, le diabète et les lésions diffuses, où l'utilisation de stents peut être entravée par des résultats sous-optimaux (Loh et Waksman, 2012 cités par RIVM 2015). Les ballons enduits de médicaments sont également combinés avec des stents en métal nu. (RIVM 2015)

2.2.4.5 Les dispositifs d'assistance ventriculaire

Les dispositifs d'assistance ventriculaire sont nés du besoin d'aider des patients pour lesquels la pénurie d'organes empêche une transplantation immédiate. Les dispositifs d'assistance ventriculaire gauche implantable actuels soutiennent le flux sanguin de façon adéquate. Les dispositifs d'assistance ventriculaire sont maintenant utilisés pour traiter les patients atteints d'insuffisance cardiaque terminale, non seulement comme un pont vers la transplantation, mais aussi comme un pont vers la thérapie de récupération ou de destination chez certains patients. VentrAssist™ (Ventricor Ltd, Australie) est une pompe de troisième génération (c'est-à-dire une roue de pompage magnétiquement élevée) avec un revêtement de carbone de type diamant sur les surfaces en contact avec le sang, ce qui minimise la thrombose. VentrAssist™ a été implanté dans plus de 400 patients dans le monde avant que l'entreprise ne s'effondre en 2009. La propriété intellectuelle de Ventricor a été vendue à Thoratec Corporation (USA). Aucune donnée n'a été identifiée sur les dimensions structurelles des revêtements de type diamant. Cependant, étant donné la technologie de fabrication, cela peut être considéré comme un dispositif de la nanotechnologie. (RIVM 2015)

2.2.4.6 Dispositifs de gestion du rythme cardiaque

Actuellement, les piles à stimulateur cardiaque durent sept à dix ans, nécessitant des remplacements fréquents qui peuvent exposer les patients à des risques, soit de défaillance due aux dispositifs, soit liés à la procédure chirurgicale d'explantation. L'amélioration de la durée de vie de la batterie est donc un enjeu crucial pour assurer une longévité du dispositif médical implanté et augmenter le cycle de remplacement. À l'aide des nanotechnologies, une équipe de recherche en Corée a mis au point un stimulateur cardiaque auto-alimenté qui est exploité par un collecteur d'énergie piézoélectrique monocristalline souple («nanogenerator») (Hwang et al., 2014 cités par RIVM 2015). Testé dans un modèle animal, le nanogénérateur a stimulé le cœur en utilisant l'énergie électrique convertie à partir des mouvements du corps. Le collecteur d'énergie flexible pourrait conduire à une méthode robuste permettant un temps de fonctionnement plus long ainsi que la miniaturisation des batteries, car elles pourraient être facilement rechargées par des comportements de déformation cyclique à partir de sources d'énergie biomécaniques comme le battement de cœur ou l'élévation du diaphragme. Une autre équipe de recherche aux États-Unis a également développé un prototype de dispositif utilisant des « nanorubans » (« nanoribbons »)

piézoélectriques à base de polymère qui peuvent être utilisés pour récolter de l'énergie à partir du cœur battant ou pour exploiter le mouvement d'autres organes pour recharger des batteries pour des dispositifs médicaux nécessitant du courant (Dagdeviren et al. 2014 cités par RIVM 2015).

L'application des nanotechnologies et des nanomatériaux peut améliorer la technologie des batteries lithium-ion utilisées pour les dispositifs médicaux implantables tels que les dispositifs de gestion du rythme cardiaque et les dispositifs de neuromodulation. Les défibrillateurs implantables d'aujourd'hui utilisent des piles au lithium-oxyde de vanadium. Les oxydes nanostructurés de vanadium, tels que les nanotubes d'oxyde de vanadium / nanofils / nanorodes, les nanofils d'oxyde d'argent et de vanadium, ont une plus grande capacité et sont considérés comme les matériaux cathodiques les plus prometteurs. Cependant, ils souffrent encore d'une diminution rapide de la capacité lors de la décharge / charge à débit élevé. Le défi consiste à améliorer la stabilité cyclique des oxydes de vanadium à un taux élevé.

Un revêtement de type fractal de fils de stimulation implantable (c'est-à-dire la pointe de l'électrode) pour la thérapie par bradycardie, la thérapie de tachyarythmie et la resynchronisation cardiaque optimise la surface électro-active du plomb. La zone électrochimique de la pointe est considérablement augmentée par le fluide tissulaire pénétrant dans l'espace entre la surface micro / nanoporeuse de l'électrode, conduisant à une polarisation plus faible et des capacités de détection accrues. En outre, une petite surface géométrique et donc un seuil de stimulation faible peuvent être atteints. Le revêtement superficiel de la pointe améliore ses propriétés de détection et de stimulation électriques (Safak et al., 2013 cités par RIVM 2015). L'électrode est revêtue d'une couche mince d'iridium utilisant la technologie physique de dépôt en phase vapeur créant une structure de type chou-fleur. Biotronik SE & Co KG (Allemagne) est le précurseur dans ce domaine et est le seul fabricant de fils enrobés par fractale. Des sondes de stimulation temporaire revêtues de fractures peuvent également être utilisées pour le traitement et le diagnostic d'arythmies à la suite de procédures de chirurgie à cœur ouvert (Mellert et al., 2008 cités par RIVM 2015). (RIVM 2015)

2.2.4.7 Les nanotechnologies dans les valves cardiaques

Les micro et nanotechnologies jouent un rôle essentiel dans la reproduction biomimétique de la géométrie anatomique tridimensionnelle (3D) des valves cardiaques pour permettre l'hémodynamique des conduits et dans le développement de stratégies visant à améliorer la fonction des ingénieries tissulaires des valves cardiaques TEHV (Tissue Engineered Heart Valves). Ces valves, en tant qu'échafaudages biomimétiques complexes, subissent une croissance et un remodelage ultérieur après implantation, en particulier pour les patients pédiatriques (Hasan et al 2016).

Une ingénierie tissulaire efficace dépend fortement de la fabrication des échafaudages car la géométrie, la porosité, les caractéristiques de surface, la dégradabilité et les propriétés mécaniques influent directement sur l'adhérence cellulaire, la croissance et le remodelage. L'échafaudage est en contact direct avec le sang et doit donc être résistant à la thrombose (Hasan et al 2016).

2.2.4.8 Focus sur les nanotechnologies dans le traitement des cancers

Utilisation de la radiothérapie dans le traitement des cancers : La technologie NanoXray de la société Nanobiotix :

✓ Objectifs de cette technologie :

La société Nanobiotix a développé la technologie NanoXray. L'objectif est d'augmenter localement les effets de la radiothérapie. Cette approche consiste à injecter des nanoparticules à l'intérieur de la tumeur avant de l'irradier dont le but est d'amplifier l'efficacité de la radiothérapie tout en épargnant les tissus sains. Les nanoparticules permettraient d'augmenter les effets physiques de la radiothérapie à dose constante. (Marty ; 2012).

✓ Principe général du mécanisme d'action :

Les effets générés lors de la radiothérapie sont basés sur une absorption d'énergie par les molécules d'eau présentes au niveau des tissus. Cette énergie provoque une excitation du cortège électronique de la molécule qui en se désexcitant crée des radicaux libres oxygénés. Ces derniers se désexcitent de façon non spécifique en transférant l'énergie aux molécules d'ADN ou molécules présentes dans la cellule menant à la mort cellulaires.

Le mécanisme d'action de NanoXray est similaire à celui des molécules d'eau, à l'exception près que le matériau composant les NanoXray est beaucoup plus dense que l'eau et possède un nombre d'électrons par atome Z plus élevé. De part cette densité et le nombre d'électrons plus élevés, la probabilité d'absorption des photons X générés est plus importante (la probabilité d'absorption étant proportionnelle à la densité du matériau), ce qui permet de générer en cascade plus d'électrons et par conséquent plus de radicaux libres.

✓ Les nanoparticules NanoXray :

Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur inorganique d'oxyde d'hafnium (HfO₂) cristallisé. Les nanoparticules ont une taille moyenne de 50 nanomètres (environ 3 000 fois plus petit que le diamètre d'un cheveu), ce qui leur permet d'entrer dans les cellules cancéreuses pour générer leur efficacité.

La caractéristique la plus importante de HfO₂ est sa densité électronique élevée permettant l'absorption d'énergie délivrée par les rayons X.

Les nanoparticules ne sont actives que lorsque la radiothérapie est appliquée.

✓ Utilisation de NanoXray :

Les nanoparticules sont injectées (intra-tumorale, intra-artérielle) directement dans la tumeur, une seule fois en amont de la première séance de radiothérapie. Les nanoparticules sont destinées à augmenter le dépôt de la dose d'énergie de la radiothérapie dans la tumeur afin d'améliorer le bénéfice pour les patients. Pour Nanobiotix, ce concept pourrait être applicable à une majorité de tumeurs solides. Ce produit est

actuellement en développement clinique à travers le monde dans plusieurs indications en oncologie: sarcome des Tissus Mous, cancers de la Tête et du Cou, les cancers du Foie (Hépatocarcinome et métastases du Foie), cancer de la Prostate, cancer du Rectum. Ces essais cliniques sont en cours en France, en Europe, aux Etats-Unis et en Asie.

Concernant le marquage CE de ce produit, la Société a déposé le dossier de marquage 'CE' le 23 août 2016 auprès du Gmed (organisme notifié français) (...). L'organisme notifié a récemment indiqué que l'examen d'un tel dossier en vue du marquage 'CE' pourrait durer au minimum 9 mois.

A noter que sur le site de Nanobiotix, il est présenté 2 autres produits dont un gel contenant des nanoparticules, ayant vocation à être directement appliqué dans le lit tumoral à l'issue d'un acte chirurgical d'ablation d'une tumeur, et une suspension aqueuse stérile contenant des nanoparticules d'oxyde d'hafnium cristallines et un revêtement de surface spécifique conçu pour optimiser leur biodisponibilité une fois injectées dans le sang.

3 De nouveaux risques sont-ils à prendre en compte ?

3.1 Le médicament

Il est important d'accorder une attention particulière à la caractérisation des nanoparticules, non seulement dans le but d'obtenir une qualité irréprochable mais aussi dans le but de définir l'item qui sera testé durant les études de toxicologie. La caractérisation structurale est un paramètre qui joue un rôle important dans la détermination des divers attributs d'un nanosystème comme la forme, la taille, la morphologie de surface, la distribution spatiale, la densité, les caractéristiques géométriques. Le développement de l'outil de microscopie électronique améliore l'accessibilité et la faisabilité pour déterminer les attributs de l'échelle nanométrique. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais) produit l'image vers le bas à des échelles de 10 nm et fournit des informations précieuses concernant l'arrangement structurel, la distribution spatiale ainsi que la morphologie superficielle des nanoparticules. La microscopie électronique à transmission (MET ou TEM en anglais) et le MET à haute résolution sont des outils d'imagerie plus puissants que le MEB et donnent des caractéristiques géométriques et des informations plus détaillées comme la structure cristalline, la qualité, l'orientation des nanoparticules. De plus, le microscope à effet tunnel à balayage, la microscopie à gradient de champ électrique et la microscopie à balayage, combinée à la microscopie à force atomique, ont été utilisés pour définir les propriétés structurales, électroniques, magnétiques et thermiques, en plus des propriétés topographiques des nanosystèmes.

Il est aussi important de bien maîtriser lors du processus de fabrication mais aussi de stockage, une granulométrie la plus homogène possible. En effet, la distribution granulométrique étant un aspect important au cours des formulations de nanosystèmes, des efforts sont donc faits pour obtenir un système avec un indice de polydispersité plus faible. Pour déterminer la distribution granulométrique, la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS en anglais) est utilisée pour mesurer des particules allant de quelques nanomètres à environ 3 micromètres, tandis que la diffraction laser est utilisée pour détecter des microparticules ou des agrégats possibles de nanoparticules de médicament.

Le potentiel zêta (charge superficielle) est un paramètre caractéristique qui détermine la stabilité des nanoparticules ou l'agrégation dans une dispersion. Par conséquent, le contrôle de ce paramètre peut avoir des répercussions importantes sur les performances du produit. Les nanoparticules ont une charge en surface qui attire une mince couche d'ions de charge opposée à la surface des nanoparticules. Cette double couche d'ions voyage avec la nanoparticule car elle diffuse dans toute la solution. Le potentiel électrique à la limite de la double couche est connu sous le nom de potentiel Zêta des particules et a des valeurs qui varient typiquement de +100 mV à -100 mV. L'amplitude du potentiel zêta est prédictive de la stabilité colloïdale. Les nanoparticules avec des valeurs de potentiel Zêta supérieures à +25 mV ou inférieures à -25 mV présentent typiquement des hauts degrés de stabilité. Des dispersions avec une faible valeur de potentiel zêta finiront par s'accumuler en raison des attractions entre particules (forces de Van Der Waals).

Ainsi, le potentiel Zêta est un outil important pour comprendre l'état de la surface des nanoparticules et prédire la stabilité à long terme de la nanoparticule.

En 2012, un projet de norme relatif à la caractérisation physico-chimique des nano-objets manufacturés soumis aux essais toxicologiques a été publié par l'ISO (ISO / TR 13014 :2012). Ce projet décrit les propriétés physico-chimiques pertinentes des nano-objets nécessaires à une évaluation des risques :

- ✓ tailles des particules / distribution granulométrique ;
- ✓ état d'agrégation / agglomération ;
- ✓ forme ;
- ✓ surface spécifique ;
- ✓ composition chimique, pureté avec le taux d'impureté ;
- ✓ modification chimique de la surface ;
- ✓ charge superficielle ;
- ✓ solubilité et dispersibilité.

Un système de classification «nanotoxicité» (NCS) a été proposé pour évaluer le risque de toxicité des nanoparticules (Müller et al. 2011a). Les risques liés à la taille et à la biopersistance sont combinés pour classer les nanoparticules en fonction du risque de toxicité: Classe I (nanoparticules > 100 nm et biodégradable), classe II (nanoparticules > 100 nm et non biodégradable), classe III (nanoparticules <100 nm et biodégradable) et la classe IV (nanoparticules <100 nm et non biodégradable). Les NC sont des nanoparticules a priori à faible risque ou non à risque, en raison de leur taille de particule (généralement > 100 nm) et de leur nature biodégradable (la dissolution se produit en quantité d'eau suffisante). Dans le cas où les nanocristaux améliorent significativement la biodisponibilité, la dose thérapeutique doit être reconsidérée afin d'éviter la toxicité provoquée par un surdosage. Ainsi, le développement des nanocristaux nécessite une investigation poussée afin de faciliter les effets potentiels avec une faible toxicité, malgré l'utilisation de produits «biodégradables».

3.1.1 Evaluation du risque d'un médicament

Dans le cadre du médicament, l'évaluation du risque avant autorisation de mise sur le marché repose sur les résultats des études précliniques (études sur des modèles cellulaires et chez l'animal en amont de l'AMM), des essais cliniques (études chez l'Homme en amont de l'AMM). Après l'AMM, elle repose sur des remontées de signalements de la pharmacovigilance et des données des études pharmacoépidémiologiques. Ne seront abordés dans ce document que l'évaluation du risque relative au développement préclinique. En effet, les réflexions fondées sur l'évaluation du risque post commercialisation n'en sont qu'au stade préliminaire par manque de recul en pharmacovigilance sur ces nanotechnologies.

Le développement préclinique consiste à évaluer le comportement d'une substance médicamenteuse dans des systèmes *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Le développement préclinique est nécessaire quelle que soit l'échelle de taille de la substance d'intérêt thérapeutique. Ce développement

répond principalement à des lignes directrices éditées par ICH (International Conference on Harmonisation <http://www.ich.org/home.html>), l'OCDE, l'EMA, FDA... Il est à noter que la ligne directrice définissant la nature des études à réaliser en fonction du stade de développement du médicament est ICH M3 (http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf).

Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier une substance d'intérêt sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament ; elles répondent à des normes internationales de qualité scientifique et sont étroitement évaluées par les autorités de santé au moment de délivrer l'AMM.

Les études de pharmacologie ont pour but de valider le mécanisme d'action et de mesurer l'activité du médicament candidat dans des modèles expérimentaux de la maladie, *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Les études de pharmacologie primaire sont destinées à étudier le mode d'action et/ou les effets d'une substance par rapport à la cible thérapeutique souhaitée. Ce sont des études exploratoires dont les objectifs sont de documenter le mécanisme d'action (niveau cellulaire et moléculaire), de prévoir et d'expliquer l'activité du médicament candidat et des métabolites chez l'homme, d'expliquer les effets secondaires (en lien avec le mécanisme d'action), d'explorer les bénéfices thérapeutiques (modèles expérimentaux) et d'explorer d'autres indications. Les études de pharmacologie secondaire permettent de documenter les propriétés pharmacologiques d'une molécule, autres que celles reliées à la cible thérapeutique principale. Ces études apportent des éléments supplémentaires sur le profil global de l'activité pharmacologique. Ces nouvelles cibles thérapeutiques identifiées peuvent entraîner des effets délétères ou bénéfiques, et peuvent donc être à l'origine de nouvelles indications potentielles ou au contraire mettre en évidence des interactions médicamenteuses.

La pharmacologie de sécurité est un élément réglementaire incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Avant de mener les études cliniques de phase I sur l'Homme, les effets du médicament candidat sur les « fonctions vitales » (systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux central) doivent d'abord être étudiés et caractérisés chez l'animal en respectant les bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Pour la fonction cardiovasculaire, les effets tensionnels et électrocardiographiques doivent être étudiés en portant une attention particulière à l'étude de la repolarisation ventriculaire car la prolongation de celle-ci est un facteur de risque majeur dans la survenue de troubles du rythme mortels, comme les torsades de pointes (TdP). Le comportement global, l'activité motrice, les réflexes et la température corporelle doivent être évalués chez l'animal.

Les études de pharmacocinétique permettent de décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. Les études de pharmacocinétique permettent par exemple de déterminer pendant combien de

temps la concentration du principe actif est maintenue à un niveau efficace dans la circulation sanguine de l'animal. Ce sont de telles études qui permettent de déterminer la posologie qui sera indiquée sur les notices d'emploi. Ces études doivent être impérativement conduites chez l'animal car l'absorption d'un principe actif, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme (c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation) et enfin son élimination après administration résulte d'interactions très complexes entre les nombreux organes d'un animal (foie, rein, système digestif, appareil circulatoire etc). Des études *in vitro* permettent d'anticiper certains des paramètres pharmacocinétiques du produit et ainsi réduire le recours à l'animal, mais ne peuvent remplacer la complexité d'un organisme vivant et des études chez l'animal. Elles sont donc nécessaires à la fois pour des raisons scientifiques et réglementaires.

Les études de toxicologie visent quant à elles à établir quels sont les organes cibles et les doses toxiques du médicament candidat pour un organisme vivant. Les études précliniques de toxicologie réalisées *in vitro* et *in vivo* évaluent, dans un cadre réglementaire, les risques de génotoxicité et de toxicité générale (études aiguës subaiguës, subchroniques et chroniques) et cancérogenèse; toxicologie du développement et de la reproduction, le risque environnemental d'une nouvelle molécule.

Concernant la détermination du potentiel génotoxique, même 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.

Les effets primaires directs susceptibles de survenir seraient :

- ✓ Les nanoparticules qui pénétreraient dans le noyau et interagiraient directement avec l'ADN.
- ✓ Les nanoparticules qui produiraient des radicaux libres induisant des lésions de l'ADN.
- ✓ Les nanoparticules qui perturberaient 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.

Dans les 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 (ROS) et à l'interruption de la synthèse d'ATP.

- ✓ Une inhibition de la réparation de l'ADN.

Les effets secondaires 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, susceptibles d'être à l'origine de pathologies proliférantes ou génétiquement transmissibles.

De façon générale, les études de toxicité permettent la mise en évidence d'effets anormaux ou indésirables qui peuvent être la conséquence d'une activité pharmacologique exacerbée ou d'une toxicité directe. Connaissant ces organes cibles et ces doses toxiques, mais aussi l'activité et le comportement de la substance d'intérêt thérapeutique dans un organisme vivant, on déterminera les doses de médicament à administrer à l'homme au cours des essais cliniques en appliquant des marges de sécurité de manière à réduire au maximum les risques liés aux premières expositions humaines.

Pour toute nouvelle demande d'autorisation de mise sur le marché, le risque environnemental du médicament en développement doit être évalué. La ligne directrice « Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use » permet de savoir ce qui est exigé par les Agences de santé. L'évaluation du risque environnemental comporte une ou deux phases selon les résultats obtenus :

- ✓ Phase 1 qui permet d'estimer l'exposition environnementale du médicament.
- ✓ Phase 2 qui permet d'apprécier le risque environnemental du médicament dans les compartiments aquatiques et terrestres. Le devenir et le comportement de la substance prendront en compte les propriétés physico-chimiques, pharmacologiques et/ou toxicologiques de la molécule.

Au regard des points énumérés précédemment, les études précliniques doivent être capables de répondre aux interrogations sur le risque potentiel des médicaments sous forme nanoparticulaire. Contrairement aux nanomatériaux manufacturés, il y a peu de données dans la littérature scientifique concernant la toxicité des nanomédicaments ; en effet la toxicité des nanoparticules a été plus documentée pour évaluer les risques suite à l'exposition des travailleurs à des nanomatériaux manufacturés. Toutefois, dans le cadre du médicament, les exigences réglementaires pour les autorisations de mise sur le marché sont beaucoup plus contraignantes que celles fixées par REACH, où le nombre d'études pour définir le profil de sécurité d'une molécule dépend du tonnage de production et non de la dangerosité potentielle de celle-ci.

Un certain nombre d'études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certaines nanoparticules sont impliquées dans la toxicité de systèmes biologiques, causant une cytotoxicité, une réponse allergique ou une inflammation (Ai J *et al.* 2011).

Les nanoparticules ont tendance à produire des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des radicaux libres, ce qui entraîne un stress oxydatif, des événements inflammatoires, des atteintes au niveau de l'ADN, et fibrose. (Vega-Villa KR *et al.* 2008) Une autre préoccupation de toxicité associée aux nanomédicaments est leur accumulation dans les cellules, en particulier après une exposition continue ou une utilisation à long terme. La limite de taille supérieure pour la toxicité des nanoparticules n'est pas entièrement clarifiée. On peut cependant estimer qu'il se situe entre 65 nm et 200 nm.

3.1.2 Exemples d'interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques

3.1.2.1 Risques d'agrégation plaquettaire

Les interactions des nanoparticules avec le système de coagulation sanguine peuvent être considérées comme néfastes ou défavorables en fonction de l'utilisation prévue d'un nanomatériau. Les nanoparticules peuvent être conçues pour être pro-coagulantes ou pour entraîner des facteurs initiateurs de la coagulation pour traiter certains troubles. De même, elles peuvent être conçues pour être anticoagulantes ou porter des médicaments anticoagulants pour intervenir dans d'autres pathologies dans lesquelles la coagulation est une préoccupation. Lorsque les nanoparticules entrent dans la circulation systémique, elles rencontrent immédiatement des cellules sanguines, des protéines et des cellules endothéliales, ainsi que des composants clés du système de coagulation, tels que les plaquettes et les facteurs de coagulation. Si les nanoparticules sont conçues pour interagir spécifiquement avec les cellules et les facteurs de coagulation, leur effet sur le système de coagulation bénéficiera alors au traitement de certains troubles de la coagulation. Si, cependant, les nanoparticules induisent des altérations indésirables dans l'équilibre de fonctionnement de ces cellules et de ces protéines, elles peuvent alors causer des toxicités graves et même potentiellement mortelles. Par conséquent, il existe de plus en plus de préoccupations concernant les coagulopathies induites par les nanoparticules (c'est-à-dire les troubles de la coagulation causés par la perturbation du système de coagulation du sang). Il existe un nombre croissant d'études signalant que les nanomatériaux artificiels peuvent causer une toxicité sévère par un changement de l'équilibre hémostatique causé par la perturbation du système de coagulation. Ce type de toxicité est connu sous le nom de Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD ou DIC en anglais). C'est un syndrome acquis secondaire à une activation systémique et excessive de la coagulation. Il se définit par l'association d'anomalies biologiques avec ou sans signes cliniques témoins de la formation exagérée de thrombine et de fibrine, et de la consommation excessive de plaquettes et de facteurs de la coagulation. De façon plus surprenante, la CIVD aiguë se caractérise par l'épuisement des facteurs de coagulation, par la formation de petits caillots intravasculaires, suivis d'hémorragies anormales. De son côté, la CIVD chronique se caractérise par une thrombose intravasculaire. Lorsqu'elle n'est pas traitée, la CIVD peut entraîner une défaillance et une mort multiples des organes. Un autre trouble de la coagulation est la thrombose veineuse profonde (TVP). La TVP est un trouble caractérisé par la formation de caillots dans les veines profondes. Comme la CIVD, la TVP risque de mettre la vie en danger ; en effet un caillot peut se déplacer vers les poumons et provoquer

une embolie pulmonaire .Des incidents de thrombose vasculaire ont également été signalés pour certains nanomatériaux (Radomski A *et al.* 2005).

Comme le montre la *Figure 8* , les interactions avec les plaquettes, les facteurs de coagulation et les cellules endothéliales peuvent tous contribuer à des toxicités induites par la coagulation.

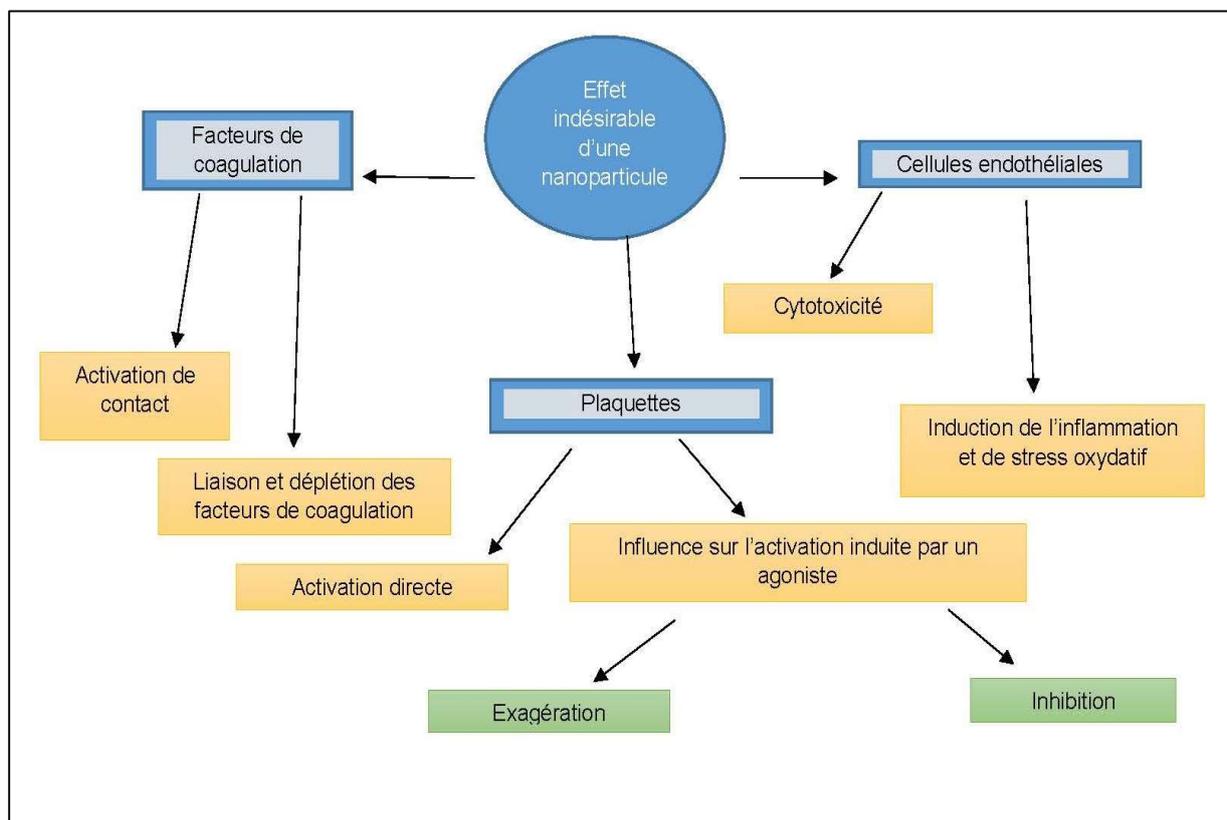


Figure 8 : Interactions indésirables possibles entre une nanoparticule et le système de coagulation

La compatibilité des nanoparticules administrées avec les composants du système de coagulation dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Les interactions de nanoparticules avec les protéines plasmatiques sont importantes pour évaluer les interactions indésirables entre les nanoparticules et le système de coagulation, car la liaison aux protéines peut modifier les propriétés physico-chimiques des nanoparticules (Mayer A *et al.* 2009 / Nel AE *et al.* 2009) qui, à leur tour, déterminent l'interaction des particules avec les protéines. Les protéines impliquées dans la coagulation du sang (par exemple, le fibrinogène) sont des composants courants de la «corona protéique» qui correspond à l'adsorption d'une couche de protéines à la surface des nanoparticules. Il est généralement admis que les interactions avec n'importe quelle surface peuvent entraîner des changements dans la conformation des protéines, l'activation ou l'inhibition de l'activité protéique et l'exposition des épitopes, entre autres. L'absorption / la liaison des facteurs de coagulation sur les surfaces des nanoparticules peut avoir deux conséquences: inactivation des facteurs ou disponibilité réduite à d'autres composants de la cascade de coagulation; ou une activation de ces

facteurs contact. Le premier évènement peut provoquer un allongement ou une carence en réactions de coagulation, tandis que le second peut provoquer des phénomènes de coagulation non souhaitée. Ainsi, les propriétés physico-chimiques ont leur importance sur la coagulation. Par exemple, le facteur de coagulation XII peut subir une auto activation après interaction avec une surface anionique. Il faut souligner que chaque nanoparticule est unique et que les mécanismes d'interactions avec divers composants du système de coagulation peuvent varier même pour les nanomatériaux de la même catégorie. Il a été démontré que les dendrimères cationiques sont cytotoxiques *in vitro* (Malik N *et al.* 2000), alors que les dendrimères anioniques et neutres ne le sont pas. L'effet cytotoxique des dendrimères cationiques sur les cellules endothéliales a été attribué aux dommages causés à la membrane cellulaire, ce qui est commun à d'autres nanomatériaux cationiques. La biocompatibilité des dendrimères de poly (amido amine) (PAMAM) *in vivo* est également dépendante de la taille et de la charge. Par exemple, les administrations i.v. et orale de dendrimères PAMAM à terminaison amine G4 et G7 ont entraîné une CIVD chez la souris (Greish K *et al.* 2011). Cette toxicité était dépendante de la dose et observée lorsque les dendrimères ont été injectés à des doses supérieures à leur dose maximale tolérée (MTD en anglais). Le mécanisme de la CIVD est très complexe et implique des facteurs de coagulation, des leucocytes, des cellules endothéliales et des plaquettes. La capacité des dendrimères cationiques à induire l'agrégation plaquettaire et une activité pro-coagulante leucocytaire a été étudiée *in vitro* (Dobrovolskaia MA *et al.* 2012 / Jones CF *et al.* 2012). Les nanoparticules peuvent alors exagérer la thrombogénicité d'un stimulus inflammatoire. En accord avec leur toxicité de type CIVD *in vivo*, seuls les dendrimères cationiques PAMAM, mais pas leurs homologues anioniques et neutres, induisent *in vitro* une agrégation plaquettaire (Dobrovolskaia MA *et al.* 2011) et une activation pro-coagulante dans les cellules HL-60. La toxicité des dendrimères cationiques observée dans ces études *in vitro* dépendait également de leur taille ; en ce sens uniquement les particules les plus grandes avec des densités plus élevées d'amines de surface étaient plus réactives vis à vis des plaquettes et des leucocytes.

Il a été montré que les nanoparticules de latex de polystyrène cationiques pouvaient induire une activation et une agrégation des plaquettes par perturbation de la membrane cellulaire, tandis que leurs homologues anioniques ont activé les plaquettes et ont induit leur agrégation par voie classique, impliquant la régulation positive des récepteurs d'adhésion cellulaire. La propriété fondamentale des récepteurs d'adhésion cellulaire est de connecter, ou mettre en relation, le milieu extracellulaire (la MEC ou des cellules voisines) et le milieu intracellulaire (le cytosquelette d'actine). De même, les nanoparticules modifiées par des fonctions amines ont diminué la production de la thrombine par l'épuisement des facteurs VII et IX.

Les effets des liposomes sur la coagulation ne sont pas aussi importants que ceux rapportés pour d'autres nanomatériaux, et sont principalement liés à la coagulation induite par un agoniste. La charge de surface est considérée comme le facteur clé pour ce groupe de nanomatériaux. Juliano *et al.* (2003) ont montré que les liposomes anioniques interagissent directement avec les plaquettes, alors que leurs homologues cationiques agissent indirectement par interaction avec les facteurs de coagulation du plasma. L'interaction

directe des liposomes avec des cellules sanguines, y compris des plaquettes, a été observée pour différents types de liposomes et a montré que ce phénomène était dose-dépendant (Constantinescu I *et al.* 2003). La littérature scientifique indique que les interactions entre les liposomes et les plaquettes seraient responsables de thrombocytopenie transitoire observée après administration de liposomes chargés négativement.

Concernant les nanoparticules métalliques, il n'a pas été prouvé que les nanoparticules d'or soient thrombogènes; bien que plusieurs études aient indiqué que les nanoparticules d'or se lient au fibrinogène (Chen G *et al.* 2011 / Dobrovolskaia MA *et al.* 2009) et que les résidus de cystéine du fibrinogène soient responsables de la formation des liaisons entre les atomes de soufre des cystéines et l'or. Le fibrinogène est l'une des protéines les plus abondantes du plasma et de nombreuses autres nanoparticules ont également montré qu'elles interagissent avec cette protéine. La liaison du fibrinogène aux surfaces des nanoparticules augmente la taille des particules, mais ne provoque généralement pas la coagulation (Dobrovolskaia MA *et al.* 2009).

L'activation des plaquettes induite par l'adénosine diphosphate (ADP) potentialisée par les nanoparticules d'or, se produit de manière dépendante de la taille. En d'autres termes, les nanoparticules plus petites (en combinaison avec l'agoniste) ont provoqué une activation plaquettaire plus forte que les nanoparticules de dimensions plus grandes. Cela peut être dû à différentes voies d'entrée cellulaire.

Quelques études ont démontré l'absorption des nanoparticules d'or par les cellules endothéliales (Bartczak D *et al.* 2012 / Alkilany AM, Murphy CJ. 2010). Le « noyau » d'une nanoparticule d'or est considéré comme inerte et, par conséquent, n'entrant pas en compte comme facteur responsable de la cytotoxicité, alors que la taille et la chimie de surface déterminent la réactivité. Il a été de plus démontré que la forme n'était pas en corrélation avec la toxicité des cellules endothéliales.

Les études faisant état de l'interaction des nanoparticules d'argent avec le système de coagulation du sang sont controversées. Plusieurs études utilisant des approches expérimentales similaires ont abouti à des conclusions opposées. Ainsi certaines études ont mis en avant des propriétés antiplaquettaires innées (Ragaseema VM *et al.* 2012 / Shrivastava S *et al.* 2009). Les nanoparticules d'argent « enrobée » PEG (taille du noyau 20 nm) et les nanoparticules d'argent sans coating (taille du noyau 10 à 15 nm), réduisent l'agrégation des plaquettes induite par un agoniste de manière dose-dépendante. Divers agonistes (thrombine, ADP, collagène et acide arachidonique) ont été utilisés pour induire une activation plaquettaire, et l'inhibition de l'activation plaquettaire par les nanoparticules d'argent a été observée dans chaque cas. Cependant, le degré de l'inhibition observée dépendait de l'agoniste utilisé et a culminé lorsque la thrombine et l'acide arachidonique ont été utilisés pour induire une activation plaquettaire (Ragaseema VM *et al.* 2012). La taille et la charge des nanoparticules d'argent, ainsi que la solubilité, la présence ou l'absence de polymères hydrophiles à la surface et diverses impuretés, peuvent contribuer aux différences de résultats rapportés par différents laboratoires.

Des changements dans la coagulation induite par les nanoparticules d'oxyde de fer ont été observés (les altérations sont plus importantes avec les tailles plus faibles). Cela est vraisemblablement lié à une induction de stress oxydatif, d'inflammation (Zhu MT *et al.* 2008). La fonctionnalisation du noyau empêche l'induction d'une réponse inflammatoire aiguë et les particules fonctionnalisées seront donc mieux tolérées.

Les données actuelles suggèrent que les propriétés thrombogènes des nanoparticules sont largement déterminées par des propriétés physico-chimiques: la taille, la charge, la densité des groupes de surface, la présence de fragments de ciblage, la chimie de surface et la composition. Les nanoparticules peuvent interagir et moduler l'activité de diverses composantes du système de coagulation telles que les plaquettes, les cellules endothéliales, les leucocytes et les facteurs de coagulation plasma. Étant donné que la plupart des troubles de la coagulation sont de nature multi-composants, une batterie de tests spécialisés à la fois *in vitro* et *in vivo* est nécessaire pour filtrer les nanomatériaux pour leurs effets et pour identifier les problèmes potentiels. Toutefois, les propriétés physico-chimiques des nanoparticules peuvent être adaptées pour éviter des résultats négatifs tels que thrombogènes.

3.1.2.2 Risques d'hémolyse

L'hémolyse (destruction des globules rouges) *in vivo* peut conduire à une anémie et d'autres pathologies. Ainsi le potentiel hémolytique de tous les produits pharmaceutiques administrés par voie intraveineuse doit être évalué. Les dispositifs dérivés de la nanotechnologie et les nanovecteurs deviennent des alternatives aux médicaments conventionnels à petites molécules, et l'évaluation *in vitro* de leur biocompatibilité avec les composants sanguins est une partie nécessaire du développement préclinique précoce. La petite taille et les propriétés physico-chimiques uniques des nanoparticules peuvent entraîner une différence entre leurs interactions avec les érythrocytes et celles qui sont observées pour les produits pharmaceutiques classiques, et peuvent également causer des interférences avec des tests *in vitro* normalisés.

3.1.2.3 Réactions d'hypersensibilité

Les réactions d'hypersensibilité (HSR) sont des effets secondaires fréquents observés après administration par voie i.v. des nanomédicaments et des produits biologiques. Ces effets secondaires sont généralement assez bien tolérés, mais parfois des réactions allergiques sévères ou mortelles peuvent survenir, représentant une incompatibilité hémohépatique due à l'activation du complément. Les tests d'hémocompatibilité (partie importante des tests de biocompatibilité) correspondent à l'évaluation des interactions des matières étrangères avec le sang pour explorer les effets néfastes possibles liés à l'exposition des matières étrangères aux cellules sanguines et aux protéines. Étant donné que de tels effets indésirables sont fréquents et peuvent représenter de graves risques pour la santé, l'introduction de « matériaux » exposés au sang à des fins cliniques est fortement réglementée. Ainsi, les directives officielles de la Food and Drug Administration (FDA), de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) et d'autres organismes de réglementation sont disponibles, en formulant des recommandations sur les analyses qui doivent être menées par les fabricants. Ces « matières étrangères » exposées au sang peuvent entrer dans les catégories suivantes : dispositifs médicaux, médicaments et agents de diagnostic.

L'ISO au travers de sa norme ISO 10993-4 concernant les dispositifs médicaux, a établi une liste des points à examiner pour évaluer les interactions des dispositifs médicaux avec le sang. Cette liste comporte des essais concernant la thrombose, la coagulation, l'activation plaquettaire, les modifications de la formulation sanguine et activation du complément. Ainsi, les nanomédicaments sont concernés par cette problématique et les tests préconisés peuvent être adaptés aux nanomédicaments. Une caractéristique commune des nanomédicaments et des produits biologiques est qu'ils peuvent stimuler le système immunitaire, conduisant à un syndrome appelé « hypersensibilité avec atteinte de plusieurs organes » (par exemple au niveau du cœur : hypertension, hypotension, tachycardie, fibrillation ventriculaire... / hyperventilation, détresse respiratoire, infiltrats pulmonaire, toux, laryngospasme... / système nerveux central : anxiété, panique, confusion, douleurs dorsales...). L'hypersensibilité est une réponse anormale et excessive vis-à-vis d'une substance étrangère (terme générique = antigène). Selon le mécanisme, on différencie l'allergie ou hypersensibilité allergique, de l'intolérance ou hypersensibilité non allergique. L'allergie est une réponse immunitaire spécifique, anormale et excessive vis-à-vis d'un antigène de l'environnement appelé dans ce cas allergène. On différencie les allergies consécutives à la reconnaissance de l'allergène par des immunoglobulines de type E (allergies IgE-dépendantes), de celles qui ne sont pas liées aux IgE (allergies non-IgE dépendantes). Ces dernières peuvent impliquer des IgG ou des lymphocytes T. L'allergie se traduit par des symptômes multiples non spécifiques mais reproductibles systématiquement après chaque nouvelle exposition. L'hypersensibilité non allergique est une réponse anormale et excessive vis-à-vis d'une substance étrangère mais dont le mécanisme n'est pas lié à la reconnaissance spécifique par le système immunitaire. Les récepteurs de l'immunité innée (TLRs : Toll Like Receptors en anglais) qui reconnaissent cette substance étrangère comme un signal de danger sont très souvent impliqués. Les réactions pseudo-allergiques associées à une activation du système du complément (« C activation-related pseudoallergy » ou « CARPA » en anglais) sont appelées ainsi car elles font intervenir le système du complément. Le système du complément est un groupe de 35 protéines connues du sérum, faisant partie de l'immunité innée et est impliqué dans une gamme de processus immunologiques et inflammatoires. Douze de ces protéines sont directement impliquées dans les mécanismes d'élimination des pathogènes, les autres régulent finement l'activité des premières afin d'éviter une réaction auto-immune. Il y a trois voies qui activent le système du complément: la voie classique du complément, la voie alterne du complément et la voie des lectines liant les résidus mannose des membranes bactériennes. Le complément peut s'activer en l'absence d'anticorps, dans le cas de la voie alterne et de la voie des lectines, c'est pour cela qu'il est uniquement considéré comme faisant partie de l'immunité innée. Néanmoins, la voie dite classique d'activation débute par la reconnaissance d'anticorps et fait à ce titre partie de l'immunité acquise ou adaptative. Par exemple, c'est aux CARPA qu'est due l'incidence élevée de réactions lors de perfusions de MYOCET®.

Plus important encore, les réactions allergiques (IgE médiées) observées lors de perfusions ne sont observées qu'après une exposition répétée du médicament « réactogénique » avec le sang et ces réactions

deviennent plus fortes lors d'une administration répétée, tandis que le CARPA se développe à la première exposition et la réaction perd de la force avec le temps et la répétition.

Ce syndrome CARPA a été observé avec différents produits sur le marché et de différentes natures telles que des liposomes, des anticorps monoclonaux, des protéines conjuguées.

Dans certains cas extrêmes, le dérèglement du système immunitaire engendré par le syndrome CARPA peut aboutir à la survenue du décès. Ainsi, l'exemple le plus représentatif est le cas du nanomédicament SonoVue®. SonoVue (hexafluorure de soufre) est destiné à être utilisé au cours d'un examen échographique, afin d'améliorer l'échogénicité du sang, ce qui permet une amélioration du rapport signal/bruit. Des cas d'hypersensibilité ont été notés chez des patients souffrant d'une pathologie coronarienne sous-jacente, des cas d'ischémie myocardique et/ou d'infarctus du myocarde. Une évolution fatale, comportant un lien chronologique avec l'administration de Sono Vue fut reportée pour quelques cas. A cet effet, l'EMA a indiqué que SonoVue ne devait pas être utilisé chez les patients connus pour avoir des « shunts » de droite à gauche (mouvement anormal du sang dans le cœur), une hypertension pulmonaire sévère, l'hypertension incontrôlée (hypertension artérielle) ou le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (forte accumulation de fluide dans les deux poumons).

Tableau 15 : Liste non-exhaustive de différents produits commercialisés ayant conduit à des réactions d'hypersensibilité après perfusion.

Nom commercial (fabricant)	Substance active	Type de particules (taille)	Symptômes
Doxil®, Caelix® (Johnson & Johnson)	Doxorubicine	Liposomes (80-100 nm)	Flush, maux de crane, douleurs dorsales, hypotension, essoufflement, suées, frissons, sensation d'oppression
Myocet® (Elan)			Flush, suées, fièvre, maux de tête, douleurs dorsales, hypotension, dyspnée, frissons, sensation d'oppression
Abelcet® (Elan)		Microparticules solides (1.6-11mm)	Essoufflement, changement pression artérielle
Ambisome® (Gilead)		Liposomes (45-80 nm)	Frissons, rigidité, fièvre, nausée, vomissements, perturbations cardiovasculaire

Amphotec®, Amphocyl® (Elan)	Amphotéricine B	« disk shape solid » nanoparticuels (115 nm)	Hypotension, tachycardie, bronchospasme, hyperventilation, dyspnée, hypoxie
Daunoxome® (Gilead)	Daunorubicine	Liposomes (45 nm)	sensation d'oppression, douleurs dorsales, flush
Visudyne® (Novartis)	Vertéporfine	Liposomes multilamellaires (multimicron)	Douleurs thoraciques, syncope, transpiration, rash, dyspnée, flush, changement de la pression artérielle et du rythme cardiaque, douleurs dorsales, vertiges
Fasturec® (Sanofi Aventis)	Rasburicase	Micelle Excipient poloxamer 88 (15 nm)	Anaphylaxie, bronchospasme, douleurs thoraciques, diarrhée, dyspnée, fièvre, maux de tête, hypotension, nausée, rash, urticaire, vomissements
Taxol® (Bristol-Myers Squibb)	Pacliatxel	Micelle	Détresse respiratoire aiguë, anaphylaxie, arythmies, bronchospasme, frissons, dyspnée, hypertension, hypotension, fièvre, rash, urticaire, mort subite
Vumon injection ® (Bristol-Myers Squibb)	Téniposide	Excipient Crémophor EL® (8-20 nm)	
Taxotere® (Sanofi Aventis)	Docétaxel	Micelle Excipient Polysorbate 80 □ (8-16nm)	Douleurs dorsales, bronchospasme, frissons, dyspnée, érythème, fièvre, flush, rash étendu, hypotension, choc anaphylactique fatal
Neulasta® (Amgen)	Filgrastim	Protéine conjuguée PEG-filgrastim	Détresse respiratoire aiguë, anaphylaxie, bronchospasme, frissons, dyspnée, érythème, œdème, urticaire, fièvre, flush, arthralgie
Ocaspar® (Enzon)	L-asparaginase	Protéine conjuguée PEG-L-asparaginase	

De nombreux exemples de risques associés à certains types de nanoparticules ont été répertoriés dans la littérature.

3.1.2.4 Exemples de risques associés à certains nanosystèmes

3.1.2.4.1 Liposomes

Certains liposomes sont capables de déclencher la réponse immunitaire innée, un syndrome d'hypersensibilité aigu appelé pseudo-allergie liée à l'activation du Complément (CARPA).

La taille des liposomes, la morphologie, la charge, la composition lipidique, l'emballage bicouche, les caractéristiques de surface et la dose de lipides administrée participent à la régulation de l'activation du complément. Les caractéristiques spécifiques qui augmentent la propension à l'activation du complément comprennent une charge de surface positive ou négative, une taille croissante, un manque d'homogénéité, une contamination par endotoxines, la présence d'agrégats.

Le développement de réactions immunogènes peut conduire à une pharmacocinétique altérée, à une perte d'efficacité et à l'apparition de toxicités potentiellement graves (par exemple l'anaphylaxie).

Un pourcentage relativement élevé de patients (2-45%) a été rapporté pour avoir développé des réactions d'hypersensibilité liées à la perfusion de médicaments sous forme liposomale. Cette réaction est une réaction d'hypersensibilité immédiate non liée aux IgE qui implique des symptômes tels que l'anaphylaxie, des œdèmes au niveau du visage, des maux de tête, des frissons et des crises cardiorespiratoires (Szebeni et Barenholz, 2009), ce qui pourrait limiter l'utilisation clinique de liposomes potentiellement réactogènes chez les patients ayant des atteintes cardiaques. De plus ce syndrome CARPA a été rapporté avec des formulations liposomales expérimentales et cliniquement approuvées (e.g, Doxil®, Ambisome® et DaunoXome®) (Szebeni et Moghimi, 2009). Cela devrait donc être pris en compte dans la conception de la formulation et étroitement surveillé dans la pratique clinique. Ainsi, la recherche en matière de « Drug Delivery » s'oriente de plus en plus vers de nouveaux systèmes, plus stables *in vivo* même si de nombreux produits ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM).

3.1.2.4.2 Dendrimères

La taille et la charge des dendrimères PAMAM influencent leur cytotoxicité. La littérature scientifique a mis en avant une plus faible cytoxicité des dérivés anioniques en comparaison des cationiques. Il a en effet été montré que les dendrimères chargés positivement, introduits dans la circulation systémique, peuvent interagir avec les membranes des cellules sanguines et les déstabiliser, entraînant une lyse de celles-ci (Hong S *et al.* 2004). Les dendrimères peuvent moduler la libération des cytokines et des chimiokines. Bien que cette propriété puisse se révéler utile en thérapeutique, elle peut aussi causer des effets toxiques graves (Duncan R *et* Izzo L 2005).

Les dendrimères PAMAM de 3,5-glucosamine induisent par exemple la production de chimiokines pro-inflammatoires telles que MIP-1a (Macrophage Inflammatory Protein), MIP-1h, et des cytokines TNF- α (tumor necrosis factor), IL-1h (InterLeukine), IL-6, IL-8 dans des cellules dendritiques humaines et les macrophages.

La «PEGylation» des systèmes dendritiques est un moyen d'abaisser leur toxicité générale. Ce processus permet d'une part une circulation sanguine plus longue et d'éviter l'accumulation de dendrimères dans les organes tels que les reins et le foie (Kojima C *et al.* 2010).

3.1.2.4.3 Nanosilice

Des études ont révélé la toxicité *in vitro* et *in vivo*, et certains dangers de l'utilisation de composés sous la forme de nanosilice. La plupart des études *in vitro* de nanoparticules de silice montrent l'effet indésirable dans les cellules étudiées. L'effet décrit dépend du type de cellule et de la taille des nanoparticules. Les nanoparticules de silice ont un impact sur une génération de stress oxydatif dans les cellules via la formation d'espèces oxygénées réactives, la production élevée de «malondialdéhyde» aldéhyde malonique (Lin W *et al.* 2006), la diminution du niveau de glutathion, et l'induction d'enzymes antioxydantes, y compris la superoxyde dismutase (SOD) Oxygénase 1 (OH-1) (Park EJ, Park K: 2009).

Tous ces événements sont responsables de la peroxydation lipidique et des lésions des membranes cellulaires (Lin W *et al.* 2006). Des travaux antérieurs ont montré que l'exposition aux nanoparticules de silice à des concentrations élevées provoquait l'activation de NF-kB dans les cellules endothéliales (Liu X, Sun J: 2010) ou dans la voie de signalisation de la MAP kinase Nrf-2-ERK dans les cellules épithéliales des bronches humaines (Eom HJ, Choi J 2009). La réponse pro-inflammatoire a entraîné l'induction de diverses chimiokines (MCP-1 et MIP-2) (Cho WS *et al.* 2007 / Liu X, Sun J: 2010) et de cytokines, telles que les interleukines IL-1 (Popovici RF *et al.* 2011), IL-8, IL-6 (Cho M *et al.* 2009 / Luo G *et al.* 2010) et TNF- α (Cho WS *et al.* 2007 / Popovici RF *et al.* 2011), CD54 et CD62E (Cho M *et al.* 2009 / Waters KM *et al.* 2009).

3.1.2.4.4 Nanotubes de carbone (NTC ou CNT en anglais)

La toxicité des nanomatériaux de carbone dépend aussi de leur structure géométrique bien définie (Jia G *et al.* 2005). En effet, le potentiel toxique des nanotubes de carbone peut résulter du rapport longueur / diamètre élevé et de la toxicité intrinsèque de la matière moléculaire qui les compose, qui est dans ce cas le carbone graphite. De plus, certaines impuretés, comme du métal résiduel et le carbone amorphe, contribuent à l'augmentation de niveau des espèces réactives d'oxygène (ROS), induisant ainsi un stress oxydatif cellulaire (Di Pasqua AJ *et al.* 2009).

Des études ont mis en évidence la similarité du potentiel cancérigène entre les NTC et l'amiante (Poland CA *et al.* 2008). Ainsi, il a été montré que les nanotubes de carbone pouvaient causer la nécrose ou l'apoptose des lignées cellulaires de macrophages et des changements dans la morphologie cellulaire (Jia G *et al.* 2005). Radomski *et al.* (2005) ont étudié les effets des nanoparticules de carbone (MWCNT et SWCNT) sur l'agrégation plaquettaire humaine *in vitro* et la thrombose vasculaire chez le rat *in vivo*.

L'incubation des cellules épithéliales bronchiques et des kératinocytes à fortes doses de SWCNT a entraîné un stress oxydatif, y compris la production de ROS, la peroxydation lipidique et la dysfonction mitochondriale (Sayes CM *et al.* 2006).

Les études *in vivo* concernant l'administration intratrachéale de nanotubes chez le rat ont révélé l'induction de changements dans les structures pulmonaires, tels que la formation de granulomes et de fibrose interstitielle (Muller J *et al.* 2005 / Lam CW *et al.* 2004).

Il a aussi été mis en avant que les MWCNT non modifiés peuvent induire une réponse pro-inflammatoire dans des lignées cellulaires de kératinocytes, par exemple, en libérant des interleukines 8 et en formant des vacuoles cytoplasmiques (Monteiro-Riviere NA *et al.* 2005).

3.1.2.4.5 Particules métalliques

Des études portant sur la déformation des cellules lors de leur exposition aux nanoparticules ont révélé que la toxicité des nanoparticules magnétiques (MNP) (à la même molarité) augmente dans l'ordre suivant : nanobilles (nanobeads) < « nanoworms » < nanosphères.

Les MNP revêtues de polymères à longue chaîne sont moins toxiques pour les cellules (viabilité cellulaire plus faible par rapport à la sonde témoin dans le test MTT) que les MNP revêtues d'une chaîne polymère plus courte du même type (avec une viabilité cellulaire significativement réduite). Dobrovolskaia (Dobrovolskaia MA, McNeil SE 2007) a mis en évidence que les MNP favorisent l'activation des fonctions phagocytotiques et la libération des cytokines par les macrophages. Karlsson HL *et al.* (2008) ont rapporté que les MNP peuvent provoquer des lésions oxydatives de l'ADN dans les cellules cultivées A549 (la lignée cellulaire épithéliale du poumon humain).

Jain TK *et al.* (2007) ont étudié les effets des nanomédicaments sur certaines enzymes. Celles-ci peuvent induire une augmentation transitoire des taux d'alanine amino transférase (ALAT), d'aspartate amino transférase (AST) et de phosphatase alcaline (ALP).

On sait que les NP d'oxyde de fer peuvent induire un stress oxydatif par excès de production de ROS. La réponse des éléments de défense conduit à une expression accrue d'enzymes antioxydantes, comme l'hème oxygénase-1 et la superoxyde dismutase. Cette étape est suivie d'une réponse pro-inflammatoire, consistant en la libération de cytokines, chimiokines et de la métalloprotéase matricielle (MMP), conduisant à une apoptose et à une mutagenèse. Une augmentation de l'activité de la MMP dans le système nerveux peut augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et causer des dommages neuronaux.

3.2 Les dispositifs médicaux

Les risques peuvent être plus élevés lorsqu'un potentiel d'exposition plus élevé est associé à des dispositifs constitués de nanomatériaux "libres" ou soumis à la libération de nanomatériaux présents comme revêtements à la surface des dispositifs médicaux. (SCENHIR 2015)

En outre, la génération potentielle de particules nanométriques due à l'usure mécanique ou chimique, ou au processus de dégradation doit être considérée pour tous les dispositifs médicaux d'implant. (SCENHIR 2015)

Le degré de toxicité des nanomatériaux dépend de la taille des particules et des caractéristiques spécifiques supplémentaires, dont la plupart sont énumérées dans le Tableau 16.

Les nanomatériaux peuvent acquérir de nouvelles «identités biologiques», c'est-à-dire de nouvelles propriétés via l'adsorption de biomolécules sur leur surface.

Certaines toxicités inattendues peuvent être induites par des nanomatériaux, comme cela a été indiqué par exemple par l'induction de marqueurs d'autophagocytose par des nanofils d'argent (Verma et al.2012 cités par le SCENHIR 2015). Cependant, pour les particules granulaires biodégradables (GBP Granular Biodurable Particles) sans toxicité spécifique connue, il n'y avait aucune indication valable que les nanomatériaux de GBP possèdent de nouvelles propriétés de danger toxicologique (comme examiné par Moreno-Horn et Gebel 2014 cités par le SCENHIR 2015).

La nocivité des nanomatériaux peut provenir de leur capacité à entrer facilement dans les systèmes biologiques et à modifier la structure des protéines par la formation de nouveaux complexes protéiques ou la dégradation accrue des protéines (Lovric et al., 2005 cités par le SCENHIR 2015). Des particules nanométriques sont probablement phagocytées par des cellules inflammatoires, en particulier des macrophages et des neutrophiles polymorphonucléaires.

L'affinité et l'adsorption ultérieure des protéines et des peptides peuvent changer la signification biologique et améliorer le déclenchement des processus humoraux et cellulaires inflammatoires. L'endocytose des nanoparticules sphériques est plus facile et plus rapide par rapport aux nanomatériaux en forme de bâtonnets ou de fibres (Champion et Mitragotri 2006 cités par le SCENHIR 2015). Les nanoparticules en forme de tige ou d'aiguille peuvent avoir une plus grande surface de contact avec les récepteurs membranaires cellulaires que les nanoparticules sphériques lorsque l'axe longitudinal des tiges interagit avec les récepteurs. Ainsi, les extrémités à courbure élevée au moment de l'endocytose sont très susceptibles de provoquer une énergie de surface de membrane plus élevée, entraînant une force élevée de distorsion qui dépasse la force maximale fournie par la polymérisation d'actine. Cet effet stoppe les extrémités croissantes de la coupe phagocytaire et entraîne une phagocytose altérée et le macrophage se propageant sur le matériau plutôt que de l'internaliser (Lu et al.2010 cités par le SCENHIR 2015).

Pour les matériaux de soin des plaies, des considérations spécifiques s'appliquent. Lorsque les nanoparticules d'argent sont utilisées pour leurs activités antibactériennes, le contact direct avec les tissus-

sous cutanés y compris le sang est possible. Lorsqu'il y a une libération importante des nanomatériaux utilisés dans les pansements, une exposition systémique peut également être possible. (SCENHIR 2015)

Les nanoparticules peuvent être générées par abrasion ou broyage d'un matériau (Frogget et al., 2014). Plusieurs scénarios pourraient être identifiés pour la libération des nanoparticules, y compris l'usinage, l'altération, le lavage, le contact et l'incinération (Frogget et al., 2014 cités par le SCENHIR 2015). Les débris peuvent contenir des nanoparticules provenant de la matrice, des nanomatériaux eux-mêmes ou des formes ioniques dissoutes du nanomatériau. Les nanomatériaux libérés ne contiennent pas nécessairement les nanomatériaux originaux présents dans le dispositif médical. Ils peuvent être recouverts de matière de la matrice (Bogdan et al., 2014 cités par le SCENHIR 2015). En outre, lorsqu'elle est incorporée dans une matrice, la toxicité des nanomatériaux peut être différente de la toxicité du nanomatériau primitif original (Smulders et al., 2014). Un exemple, sont les produits dentaires et les ciments osseux non durcis peuvent contenir et même consister en nanoparticules libres. Les ciments et les charges dentaires sont typiquement durcis *in situ*, résultant en une masse solide de biomatériau. Lors de l'application de matériaux dentaires et également pendant le traitement de surface, (ex. polissage), l'exposition aux nanoparticules peut se produire. En fonction du site d'application (utilisation dentaire dans la cavité buccale ou utilisation orthopédique du ciment osseux), une exposition interne aux nanoparticules est possible. Pour les matériaux dentaires, l'exposition pulmonaire doit également être envisagée. Cette exposition potentielle interne spécifique devrait être prise en compte dans l'évaluation des risques de tels matériaux.

Les articulations utilisant des surfaces métal-métal ainsi que métal-sur-polyéthylène produisent des particules d'usure. Pour les débris métalliques, la taille des particules est inférieure à 1 µm pour la plupart (> 90%) des particules, tandis que pour le polyéthylène, la plupart des particules sont supérieures à 1 µm (Lee et al., 1992 cités par le SCENHIR 2015). Notamment, la distribution des particules montre que les nanoparticules sont les plus susceptibles d'être présentes.

Pour les nanomatériaux injectables, il existe un potentiel d'exposition interne qui peut être élevé en fonction de la dose administrée. Pour les injections sous-cutanées, il peut être largement supposé que la distribution des nanoparticules se fasse au-delà du ganglion lymphatique local. Pour d'autres injections, l'exposition systémique peut être probable, ou certaine.

Lorsque les nanomatériaux sont utilisés dans les dispositifs médicaux appliqués dans les voies respiratoires, la possibilité d'exposition pulmonaire existe. Les particules inhalées atteignent différents compartiments cibles des tissus pulmonaires en fonction de leur taille, par exemple. Les particules d'un diamètre inférieur à 50 nm semblent être les plus efficaces pour atteindre les alvéoles pulmonaires (ICRP 1994, Cassee et al., 2002 cités par le SCENHIR 2015). En outre, en ce qui concerne l'exposition pulmonaire des nanomatériaux, les effets sur le système cardio-vasculaire devraient également être pris en considération (Donaldson et al., 2013a cités par le SCENHIR 2015).

Conclusions :

Selon le SCENIHR (2015), « les dispositifs médicaux non invasifs contenant des nanomatériaux dans la plupart des cas, à l'exception des réactions locales sur le site de contact, ne présentent pas de risque supplémentaire par rapport aux dispositifs médicaux non invasifs ne contenant pas de nanomatériaux et peuvent être évalués selon la même méthodologie. »

Pour les dispositifs médicaux invasifs contenant des nanomatériaux, y compris les dispositifs de contact en surface en contact avec la peau ou une muqueuse lésée, les mêmes principes pour les essais de toxicité s'appliquent que pour les dispositifs médicaux qui ne contiennent pas de nanomatériaux. Cependant, les effets biologiques des nanoparticules qui sont introduites ou formées doivent être étudiés à la fois pour les effets locaux sur le site d'application et les organes de distribution possible après la migration, en particulier dans les ganglions lymphatiques drainants. Dans l'évaluation de la sécurité, la libération, l'accumulation et la persistance potentielles des nanomatériaux dans les tissus nécessitent d'autres tests. Dans ce contexte, la possible dissolution / dégradation des nanomatériaux devrait également être envisagée. (SCENHIR 2015)

Toutes les évaluations de la sécurité doivent tenir compte des propriétés physico-chimiques spécifiques potentielles de ces nanomatériaux, en particulier des dispositifs médicaux qui sont constitués de nanomatériaux libres. Les effets biologiques des nanoparticules qui sont introduites doivent être étudiés à la fois sur le site où elles sont déposées et dans les organes cibles potentiels pour la migration, en particulier les ganglions lymphatiques drainants. (SCENHIR 2015)

4 Une réglementation à faire évoluer

4.1 Le médicament

Pour être commercialisé, tout médicament doit, conformément à la directive 2001/83/CE2, obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). Cette AMM est délivrée par une autorité compétente après évaluation d'un dossier portant à la fois sur la qualité du produit, sa sécurité et son efficacité. Ces trois axes permettant de déterminer une balance bénéfices/risques qui, si elle est favorable pour la population et l'indication revendiquée, permet l'obtention de l'AMM.

L'AMM peut être délivrée, pour l'ensemble du territoire de l'Union européenne, par la Commission européenne après avis de l'Agence européenne des médicaments (EMA) ou au niveau national, par l'autorité compétente du pays considéré ; en France, l'ANSM joue ce rôle. Une fois l'AMM obtenue, la mise sur le marché d'un nouveau médicament s'accompagne d'un plan de gestion des risques dont l'objet est la prévention et la surveillance des risques dans le cadre de son utilisation réelle. Ces obligations perdureront tant que le produit sera commercialisé.

Bien qu'un nombre important de nanomédicaments a été approuvé au cours des dernières décennies, l'absence de protocoles généraux spécifiques pour le développement préclinique et de caractérisation de ces produits a entravé leur impact potentiel sur la pratique clinique. Les tendances réglementaires restent encore à définir, malgré les nombreuses tentatives déjà réalisées. C'est pourquoi une étroite collaboration entre les agences réglementaires (EMA, FDA, MHRA, Bfarm, RIVM, PMDA Japon...), des organisations (ICH, OCDE, OMS) est nécessaire même si des mesures importantes ont été prises au cours des cinq dernières années. Les stratégies utilisées pour le développement de produits médicaux «conventionnels» ont été adaptées pour évaluer la sécurité / toxicité et la compatibilité des nanomédecines.

De nouveaux essais de contrôle de qualité et des méthodes d'analyses robustes doivent être développés afin de caractériser efficacement non seulement les propriétés physico-chimiques, la variabilité, la morphologie et la charge, mais aussi d'évaluer les performances dans la libération des médicaments, le potentiel à être métabolisé au sein de l'organisme, la liaison aux protéines et l'absorption cellulaire spécifique.

4.1.1.1 Aux Etats-Unis

Le « Natl. Nanotechnology Initiative» (NNI), programme fédéral de recherche et développement établi par le gouvernement américain pour coordonner les efforts des différentes agences gouvernementales sur la thématique des nanotechnologies, a proposé la définition suivante: « La nanotechnologie est la compréhension et le contrôle de la matière aux dimensions d'environ 1 à 100 nanomètres, permettant de nouvelles applications. Les nanotechnologies englobent aussi bien des techniques d'imagerie, de mesure, de modélisation et de manipulation d'entités à cette échelle de longueur ».

L'EPA, L'agence Américaine de Protection de l'Environnement, a divisé les nanomatériaux en quatre catégories (EPA 2005/ *Nanotechnology White Paper*, EPA Science Policy Council December 2, 2005, <http://www.epa.gov/osa/pdfs/nanotech/epa-nanotechnology-white-paper-final-february-2007.pdf>) :

- matériaux à base de carbone,
- matériaux à base de métal,
- dendrimères,
- composites.

De leur côté « The Natl. Academies » ont subdivisé les nanotechnologies en quatre catégories différentes (Trudy E. Bell, *Understanding Risk Assessment of Biotechnology*, NNI, <http://www.nano.gov/Understanding Risk Assessment.pdf>):

- oxydes métalliques,
- « nanoclays »,
- Nanotubes,
- quantum dots.

Pour autant, la FDA n'a pas développé son propre système de classification concernant cette thématique.

Au regard de la littérature, il est indéniable aux yeux de la communauté scientifique internationale que la taille est un paramètre d'une importance primordiale concernant la toxicité. Cependant, le site Web de la FDA en 2007, affichait des déclarations qui contredisent catégoriquement le consensus scientifique : « FDA considère que la batterie existante de tests de pharmaco-toxicité est probablement adéquate pour la plupart des produits de nanotechnologie que nous réglerons. La taille de particule n'est pas la question (publication). Si de nouveaux risques toxicologiques qui proviennent de nouveaux « matériaux » et/ou de nouvelles conformations de « matériaux » existants sont identifiés, de nouveaux tests toxicologiques seront alors exigés ».

Tandis que cette déclaration semble déconcertante à la lumière du consensus répandu parmi des experts que la taille de particule est la problématique importante, il est à noter que la FDA, en 2006, avait fait des déclarations quelque peu contradictoires au sujet des implications de la taille de particule sur le versant toxicologique : *«Due to their small size and extremely high ratio of surface area to volume, nanotechnology materials often have chemical or physical properties that are different from those of their larger counterparts. Because of some of their special properties, they may pose different safety issues than their larger counterparts.»* 71 Fed. Reg. 46233 (August 11,2006).

La FDA s'est ensuite lancée dans des initiatives pour déterminer quelle devrait être l'attitude réglementaire à choisir pour la gestion de produits nanoparticulaires. Elle n'a toutefois pas encore élaboré de nouveaux règlements ou fourni à l'industrie des normes pour des essais de sécurité destinés aux produits sous forme nanoparticulaire. Cela peut être attribué à un certain nombre de facteurs, y compris le manque de données scientifiques à l'époque sur les propriétés et les impacts des nanomatériaux et le fait que les premières preuves suggèrent qu'il est impossible de généraliser sur les nanomatériaux, étant donné les grandes variations dans les propriétés des différents matériaux ou par les mêmes matériaux à différentes tailles.

Il est à rappeler que tout nouveau médicament, qu'il soit princeps ou générique, doit obtenir l'approbation préalable à la commercialisation de la FDA avant d'entrer sur le marché. Pour obtenir l'approbation de mise sur le marché, le médicament doit prouver sa sécurité d'emploi, ainsi que son efficacité pour l'usage auquel il est destiné. Un nouveau médicament doit être approuvé par le biais du processus NDA (New Drug Application = demande d'AMM), tandis qu'une version générique d'un médicament existant peut être

approuvée en utilisant un NDA abrégé (ANDA). Toutefois, avant que les essais cliniques ne puissent avoir lieu, la compagnie pharmaceutique doit soumettre une « exemption réclamée pour un nouveau médicament expérimental », qui comprend les résultats des recherches précliniques et vise à assurer la sécurité des sujets humains.

Un rapport de janvier 2006 indiquait qu'il y avait environ 130 médicaments à base de nanotechnologies en développement préclinique, clinique ou commercial. Les premiers médicaments « embarquant » des nanotechnologies ayant obtenus l'AMM par la FDA étaient Abraxane®, pour le traitement du cancer du sein métastatique; Doxil®, pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sarcome de Kaposi lié au SIDA; et Emend®, un médicament contre les nausées conçu pour les patients sous chimiothérapie. Étant donné la probabilité que les nanotechnologies puissent créer de nouveaux profils de toxicité pour ces nouveaux médicaments, la FDA n'a pas pour autant publié de nouvelles directives pour l'industrie décrivant les protocoles d'essai les plus appropriés pour les produits « nano ». Cela souligne que la réglementation existante pourrait être appliquée aux médicaments contenant des nanomatériaux ou fabriqués par nanotechnologie sans nécessiter de nouvelle législation ou réglementation.

La FDA a constamment établi une distinction entre les médicaments sur ordonnance et ceux en OTC (Over The Counter) qui sont les médicaments en vente libre. Les amendements aux médicaments de 1962 ont obligé la FDA à examiner l'innocuité et l'efficacité de tous les médicaments approuvés antérieurement, y compris les médicaments OTC. Ainsi, la FDA a promulgué des règlements établissant des procédures pour classer les médicaments OTC comme « généralement reconnus comme sûrs et efficaces » (GRAS / GRAE). La FDA examine l'innocuité et l'efficacité des ingrédients actifs dans les médicaments OTC, détermine s'ils sont GRAS / GRAE et publie une liste de tous les ingrédients qui peuvent être inclus dans les formulations de médicaments OTC. Bien qu'il existe un certain nombre de produits sur le marché qui prétendent contenir des nanomatériaux, il n'y a rien dans la monographie OTC actuelle qui tient compte des variations de la taille des particules. Ainsi, les particules nanométriques des matières énumérées dans la monographie ne sont soumises à aucune exigence d'essai supplémentaire et légalement entrent dans la définition de ces ingrédients GRAS / GRAE. Le contexte des médicaments OTC pourrait conduire à une catégorisation inappropriée des ingrédients de taille nanométrique comme le GRAS. Si, par exemple, la FDA révisé ses monographies actuelles pour indiquer la granulométrie des ingrédients considérés comme GRAS, les produits contenant des versions nanométriques de ces ingrédients seront considérés comme des « nouveaux médicaments » et donc soumis au processus NDA. La FDA a créé un groupe d'intérêt sur les nanotechnologies pour coordonner la réglementation des produits à base de nano dans ses différents centres et bureaux.

En août 2006, la FDA a également formé la Nanotechnology Task Force, chargée de développer des approches réglementaires pour les produits nano qui garantissent la sécurité et l'efficacité tout en facilitant l'innovation technologique bénéfique. En raison des implications potentiellement généralisées des nanotechnologies, la FDA a reconnu la nécessité de coordonner ses actions avec d'autres organismes. Un

des efforts de collaboration les plus importants de la FDA est avec le Natl. Cancer Inst. (NCI) et le NIST. Les efforts conjoints de ces 3 groupes ont conduit à la création du Laboratoire de caractérisation des nanotechnologies (NCL) pour la caractérisation préclinique des nanomatériaux destinés aux applications pour le traitement du cancer. Le NCL a été développé en réponse aux préoccupations nationales exprimées par les chercheurs se plaignant de la difficulté de comparer les résultats entre les laboratoires, la détermination des paramètres de nanoparticules affectant la toxicité, et l'incertitude perçue quant au processus de réglementation.

Il existe un large éventail de possibilités pour le traitement par la FDA des produits à base de nanomatériaux, allant du maintien du statu quo à l'élaboration d'une réglementation entièrement nouvelle. La plupart des intervenants de l'industrie estiment que la réglementation actuelle de la FDA est parfaitement adaptée aux produits nanoparticulaires. Il est vrai qu'il n'existait pas de normes ou de protocoles de recherche ayant fait l'unanimité sur le plan international, peu d'études sur la nanotoxicité, peu d'accord sur les méthodes de caractérisation des nanomatériaux et aucune exigence en matière d'étiquetage. Toutefois, des progrès substantiels ont été enregistrés dans ce domaine. Certains produits peuvent glisser à travers les « mailles du filet » simplement parce qu'ils sont légèrement plus grands que la taille officiellement désignée, malgré le fait que la recherche a montré que les matériaux au-dessus de 200 nm - et certainement ceux au-dessus de la définition du NNI de 100 nm - peuvent prendre des propriétés uniques qui suscitent des inquiétudes.

En Juin 2014, la FDA a publié sur son site internet (<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>) une réflexion sur les produits volontairement manufacturés à l'échelle nanométrique. Cette réflexion est toujours en vigueur fin 2016 et est destinée principalement aux fabricants, fournisseurs, importateurs et autres parties prenantes. La FDA précise que les questions telles que la sécurité, l'efficacité, l'impact sur la santé publique ou le statut réglementaire des produits de la nanotechnologie sont actuellement traitées au cas par cas en utilisant les processus d'examen existants de la FDA. Ces lignes directrices n'établissent pas non plus de définition réglementaire, mais visent plutôt à aider l'industrie notamment à déterminer quand elles devraient envisager les répercussions possibles sur la réglementation, la sécurité, l'efficacité ou l'impact sur la santé publique qui peuvent découler de l'application de la nanotechnologie dans les produits réglementés par la FDA.

Par ailleurs, la FDA conseille à l'industrie de la consulter au début du processus de développement afin de faciliter une compréhension mutuelle des questions scientifiques et réglementaires spécifiques à leurs produits en nanotechnologie. Il faut aussi rappeler que la FDA n'a pas établi de définition réglementaire de la « nanotechnologie » et de « nanomatériaux ». Elle considère néanmoins que les évaluations de la sécurité, l'efficacité, l'impact sur la santé publique ou le statut réglementaire des produits issus des nanotechnologies devraient tenir compte de toutes les propriétés et comportements uniques que l'application de la nanotechnologie peut leur donner. Ainsi, la FDA identifie deux points à considérer qui devraient être utilisés pour évaluer ces produits : les dimensions des particules et les propriétés ou phénomènes dépendants de la dimension.

Les deux points à considérer se définissent ainsi et sont intrinsèquement reliés :

- a) Si un matériau ou un produit final est conçu pour avoir au moins une dimension externe, ou une structure interne ou de surface, à l'échelle nanométrique (environ 1 nm à 100 nm);

Les matériaux ou les produits finis peuvent également présenter des propriétés attribuables à une ou plusieurs dimensions en dehors de l'échelle nanométrique d'environ 1 nm à 100 nm qui sont pertinentes pour les évaluations de la sécurité, de l'efficacité, du rendement, de la qualité, de l'impact sur la santé publique ou du statut réglementaire des produits.

- b) Si un matériau ou un produit fini est conçu pour présenter des propriétés, y compris des propriétés physiques ou chimiques ou des effets biologiques, qui sont attribuables à ses dimensions, même si ces dimensions ne dépassent pas la plage nanométrique, jusqu'à un micromètre 1000 nm.

La FDA précise que l'utilisation de 1 000 nm comme point de référence ne doit pas être interprétée dans le sens où les matériaux ou produits dont les dimensions sont supérieures à 1 000 nm ne peuvent présenter des « effets » importants sur la sécurité, l'efficacité, ou le statut réglementaire du matériau ou produit.

Ces considérations s'appliquent non seulement aux nouveaux produits, mais également lorsque les modifications apportées aux procédés de fabrication modifient les dimensions, les propriétés ou les effets d'un produit réglementé par la FDA ou de l'un de ses composants.

Le terme « ingénierie » est également utilisé pour distinguer les produits qui ont été délibérément manipulés par l'application de la nanotechnologie à partir de produits qui peuvent involontairement inclure des matériaux dans la gamme nanométrique. Toutefois, les évaluations de produits fabriqués de façon conventionnelle peuvent inclure une considération des effets, le cas échéant, de la présence accidentelle de particules à l'échelle nanométrique sur l'impact sur la sécurité, l'efficacité ou la santé publique d'un produit.

Le point a) couvre également tous agrégats ou agglomérats formés par de telles particules primaires à l'échelle nanométrique. En outre, les structures ayant un « coating », fonctionnalisées ou assemblées, qui comprennent des entités à l'échelle nanométrique discrètes et fonctionnelles en interne ou sur la surface sont englobées dans le point a). De telles structures peuvent avoir des propriétés qui peuvent affecter la sécurité ou l'efficacité du produit. L'inclusion de particules, d'objets ou de structures à dimension (s) interne (s), superficielle (s) ou externe (s) à l'échelle nanométrique est conforme aux approches adoptées par d'autres organismes scientifiques et réglementaires. Des considérations telles que les voies d'exposition, la posologie et le comportement dans divers systèmes biologiques (y compris les tissus et les organes spécifiques) sont essentielles pour évaluer l'innocuité, l'efficacité, l'impact sur la santé publique ou le statut réglementaire d'un large éventail de produits sous la juridiction de la FDA. De telles évaluations devraient inclure une considération des tests spécifiques (traditionnels, modifiés ou nouveaux) qui peuvent être

nécessaires pour déterminer les propriétés physico-chimiques et les effets biologiques d'un produit impliquant l'application de la nanotechnologie.

Les produits peuvent également présenter des propriétés attribuables à une ou plusieurs dimensions hors de la plage d'échelle nanométrique d'environ 1 nm à 100 nm. Les propriétés physiques et chimiques et le comportement biologique pertinents aux évaluations de la sécurité, de l'efficacité, de la performance, de la qualité, de l'impact sur la santé publique ou du statut réglementaire des produits ont été observés à des dimensions situées en dehors de l'échelle nanométrique d'environ 1 nm à 100 nm. La FDA juge raisonnable d'envisager l'évaluation de matériaux ou de produits finis conçus pour présenter des propriétés attribuables à des dimensions allant jusqu'à 1 000 nm.

4.1.1.2 Au niveau Européen

Les collaborations avec les institutions européennes telles que les directions de la Commission européenne et ses organes scientifiques (par exemple, le Comité scientifique sur les risques sanitaires émergents et nouvellement identifiés : SCHENIR, le « Centre commun de recherche » (JRC Joint Research Center)) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), ont été très productifs dans l'élaboration d'une approche cohérente des nanomédecines, en soutenant des politiques prenant en compte les progrès et l'expérience accumulés dans d'autres disciplines.

En 2011, la Commission Européenne avait publié une recommandation de définition <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696>) qui définissait un nanomatériau comme :

- ✓ un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé,
- ✓ contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat,
- ✓ dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

Comme pour les substances classiques, il est reconnu que certains nanomatériaux peuvent être dangereux et d'autres non (SCENIHR, 2010). La petite taille peut être accompagnée de propriétés physico-chimiques spécifiques et peut donner lieu à un risque accru de franchissement de barrières biologiques. Cela peut entraîner des différences dans le comportement et l'exposition (interne) au nanomatériau, qui ne se produisent pas avec des matériaux classiques de plus grande taille ou des molécules dissoutes. Ainsi, il est nécessaire de disposer de définitions pour distinguer les nanomatériaux des substances chimiques classiques, en particulier d'autres substances ayant la même composition chimique (par exemple le nano-argent et l'argent métallique). Cette définition est nécessaire pour distinguer quels matériaux nécessitent une surveillance plus étroite du fait de leur petite taille et de leurs différentes caractéristiques. De plus, pour des fins de notification (par exemple, la liste des ingrédients), une définition est nécessaire pour fournir aux

consommateurs suffisamment d'information pour choisir un certain produit, avec ou sans ingrédients issus de nanomatériaux. Il a donc été décidé de définir:

✓ La taille :

La taille d'un nanomatériau est définie comme étant comprise entre 1 nm et 100 nm. Cependant, comme indiqué dans l'avis du SCHEHIR en 2010, il n'existe aucune preuve scientifique qu'il existe un seuil de taille pour les changements dans les propriétés physico-chimiques, de ce fait on peut conclure que ce choix de la valeur de 100 nm est arbitraire plutôt que scientifique. Il existe toutefois un consensus sur la taille des nanomatériaux, qui a abouti à la définition de l'échelle nanométrique par l'ISO: «taille d'environ 1 nm à 100 nm» (ISO, 2012).

✓ Le nombre :

Si plus de 50% des particules sont de taille comprise entre 1-100 nm, alors le matériau est défini comme un nanomatériau. Il est à noter que la définition utilise la distribution en nombre et non en masse.

✓ La surface spécifique :

La Commission a inclus la surface spécifique en volume comme paramètre alternatif. De plus, la surface spécifique du volume peut être utile pour identifier les nanostructures sous des formes fortement agglomérées ou agrégées.

Ces définitions sont reprises par les différentes institutions européennes mais sont aussi complétées par d'autres considérations.

Si on regarde exclusivement le cas du médicament, tout médicament doit, conformément à la directive 2001/83/CE2, obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). Cette AMM est délivrée par une autorité compétente après évaluation d'un dossier portant à la fois sur la qualité du produit, sa sécurité et son efficacité. Ces trois axes permettant de déterminer une balance bénéfices/risques qui, si elle est favorable pour la population et l'indication revendiquée, permet l'obtention de l'AMM.

L'EMA considère que les nanomédecines peuvent présenter une gamme d'incertitudes technologiques, scientifiques, réglementaires et juridiques qui exigent une connaissance précoce, une expertise scientifique et méthodologique appropriée et un consensus sur les exigences réglementaires les plus appropriées. Du point de vue de l'EMA, l'approche actuelle de ses Comités scientifiques est adéquate pour l'évaluation des nanomédecines.

Comme pour tout médicament, les produits de nanomédecine devront être caractérisés. De plus, leur devenir et leur toxicologie devront être établis dans le cadre de l'évaluation de leur qualité, de leur sécurité et de leur efficacité, et la pertinence des méthodes d'essai devra être démontrée. La définition fournie par l'Agence Européenne sur le site Web (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp

&) se lit comme suit: «La nanotechnologie est définie comme l'utilisation de petites structures - de moins de 1000 nanomètres de diamètre - conçues pour avoir des propriétés spécifiques». Dans cette déclaration simple, il y a trois concepts qui constituent la base de la réflexion de l'Agence sur la description des nanomédecines :

- On parle de structures et pas seulement de substances.
- Les structures sont délibérément préparées pour être à l'échelle nanométrique.
- Les structures ont des propriétés spécifiques qui ne peuvent être obtenues avec les composants individuels isolés de la nanostructure.

L'EMA a insisté sur l'importance de développer une politique harmonisée pour l'évaluation de la sécurité des médicaments et dispositifs médicaux sous forme nano-objet, car les cadres réglementaires pour le développement et l'autorisation des dispositifs médicaux et des produits pharmaceutiques en Europe sont très différents et l'incertitude réglementaire est l'un des principaux obstacles pour passer d'un concept scientifique à celui de produit de santé autorisé sur le marché.

En 2011, le Comité pour les médicaments à usage humain de l'EMA (Committee for Medicinal Products for Human Use /CHMP) a chargé un groupe d'experts nommés par l'ITF (Innovation Task Force) de travailler sur la thématique des nanomédecines et d'élaborer des documents de réflexion sur l'expérience actuelle en matière de réglementation des nanomédecines au niveau de l'UE afin de mettre ces informations à la disposition des industriels et de la communauté scientifique. Sur la base de l'expérience acquise dans le contexte de l'avis scientifique et de l'évaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché avec succès, les principes généraux de réglementation ont été abordés pour :

- les formulations liposomales développées en référence à un produit innovateur (*Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf),

- les nanoparticules d'oxyde de fer pour le traitement de l'anémie développées en référence à un produit innovateur [*Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184922.pdf),

- et le « revêtement » de surface (*Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/08/WC500147874.pdf).

Dans le cadre de la collaboration internationale, un document de réflexion sur les micelles de copolymère séquencé a été élaboré conjointement par des experts de l'autorité japonaise de réglementation (Agence pour les produits pharmaceutiques et médicaux PMDA) et le Ministère de la santé, du travail et de la protection sociale (MHLW) et l'EMA (*Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products* http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/01/WC500159411.pdf). Ce document est le premier document de réflexion dans ce domaine abordant un type de composés qui représente la prochaine génération de nanomédecine et qui n'est encore autorisé dans aucune région pour l'instant. Toutefois, ce type de produit est entré en essais cliniques exploratoires en Europe et dans d'autres régions, pour le traitement des tumeurs solides par exemple.

4.1.1.3 Au niveau international

Une préoccupation accrue au niveau européen et américain a été la question de l'harmonisation de la méthodologie essentielle pour caractériser les exigences de qualité. Le Laboratoire de caractérisation des nanotechnologies (NCL) du National Cancer Institute (NCI) aux États-Unis a fourni une contribution majeure à cette question en rassemblant des données avec plusieurs plateformes innovantes pour le développement des nanomédecines en oncologie.

En 2015, le Forum international sur la réglementation pharmaceutique (IPRF) a pris en charge la création et la gouvernance du groupe international d'experts en nanomédecine enrichi avec le soutien de nombreuses autorités régionales, notamment la FDA, Santé Canada, le Japon, le Médecin Suisse, l'Association des Nations de l'Asie du Sud-Est (ANASE) et l'Agence Nationale de Surveillance de la Santé (ANVISA) entre autres (<https://www.i-p-r-f.org/en/working-groups/nanomedicines-working-group/>). Ce groupe de travail à l'IPRF sur les nanomédecines (Working Group13) a reçu le mandat de partager des informations non confidentielles, de promouvoir des conclusions par consensus sur les normes réglementaires et la convergence axée sur les nanomédecines / nanomatériaux dans les produits pharmaceutiques et les produits « frontière » et de combinaison. La coopération en matière de réglementation comprend le partage du travail, dans des domaines spécifiques avec d'autres organismes internationaux connexes, et la collaboration d'organismes de formation. Il est à noter qu'en 2016, pour la première fois, l'information et la cartographie de l'activité sur les nanomédecines dans les régions participantes ont été mises à disposition, ce qui constitue un précieux point de départ pour comprendre la réglementation actuelle et les points de convergence potentielle sur les questions les plus critiques. Les livrables pour le plan de travail 2015/2016 incluent :

Le partage d'information et la cartographie (mises à jour réglementaires annuelles);

- ✓ Compiler, cartographier et discuter de la terminologie et des définitions en se concentrant sur la classification des nanomédecines / nanotechnologies dans les produits pharmaceutiques;

- ✓ Compiler des informations pour la compréhension des synergies entre la sécurité des nanomédicaments et les différentes toxicités ;
- ✓ Compilation des investigations requises pour les nanomédicaments "génériques".

Une des questions cruciales dans les discussions actuelles sur la réglementation est l'accent mis sur les « nanosimilaires », qui combinent les médicaments génériques et les « nanocarrier » comme excipient innovant.

Un rôle essentiel doit être joué par les autorités réglementaires dans le cadre de leurs procédures de conseil scientifique, et une pression accrue devra être exercée pour favoriser un travail plus coopératif entre les différents organismes régionaux de réglementation (EMA, FDA et PDMA / MHL).

4.1.1.4 *Au niveau national*

4.1.1.4.1 Participations de l'ANSM à différents travaux

Pour le médicament, le secteur préclinique de l'ANSM a participé à différents groupes de travail concernant les nanoparticules. Ainsi, une participation active s'est faite pour la rédaction de différents documents mais aussi des communications lors d'interventions à de diverses réunions scientifiques:

- ✓ Evaluation des risques liés aux nanomatériaux : enjeux et mise à jour des connaissances (**ANSES**)
<https://www.anses.fr/fr/system/files/AP2012sa0273Ra.pdf>
- ✓ Mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent » (**ANSES**)
<https://www.anses.fr/fr/system/files/AP2011sa0224Ra.pdf>
- ✓ Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product (**EMA**)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf
- ✓ Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product (**EMA**)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184922.pdf
- ✓ Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products (EMA)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140351.pdf
- ✓ Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products (EMA)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/01/WC500159411.pdf

- ✓ Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23656268>
- ✓ Recommandations de l'ANSM pour l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire

4.1.1.4.2 Recommandations de l'ANSM pour l'évaluation toxicologique des médicaments sous forme nanoparticulaire

L'ANSM, au travers du secteur préclinique, a été une des rares agences à réfléchir sur la méthodologie à appliquer pour évaluer la sécurité des médicaments sous forme nanoparticulaire. Ce travail a été mené conjointement avec les experts externes du groupe de travail non-clinique et a abouti à un document de travail mis en ligne sur le site de l'ANSM dont la seconde version (mise à jour dernièrement) doit faire l'objet d'une publication dans la littérature scientifique. Compte tenu du caractère potentiellement extensif du domaine des médicaments sous forme nanoparticulaire, les recommandations de l'ANSM sont limitées à trois secteurs déjà développés ou en cours de développement :

- ✓ l'utilisation pour l'imagerie médicale (IRM, échographie et TEP),
- ✓ la vectorisation des principes actifs (anticancéreux, antibiotiques, antifongiques, etc.),
- ✓ l'utilisation de nanomédicament par des voies locales (peau, poumon, œil, etc.) dans le but d'obtenir une exposition systémique ou un effet local.

Il est à souligner que compte tenu de la grande variété de structures, des propriétés physicochimiques et biologiques, d'utilisations thérapeutiques, etc., une évaluation au cas par cas du programme d'étude le plus pertinent pour un nanomédicament considéré sera toujours indispensable.

Les données scientifiques générales et/ou réglementaires en rapport avec l'évaluation toxicologique des nanomédicaments 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'intégraient pas de manière adéquate les propriétés des produits sous forme de nanoparticules. La pertinence des tests *in vitro* est également débattue dans la mesure où

la vitesse de sédimentation et la capacité de diffusion des nanoparticules doivent 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.

Comme présenté précédemment dans le document, les recommandations soulignent l'importance de la caractérisation physico-chimique. Du fait de l'extrême variabilité des caractéristiques physico-chimiques des nano-objets selon les conditions, une caractérisation détaillée des nanomédicaments s'avère indispensable pour appréhender à la fois les effets bénéfiques et indésirables de la forme nanoparticulaire. Du fait de l'étendue des paramètres à étudier et de la variété des méthodes utilisées, seule une présentation abrégée est réalisée dans ce document, l'ensemble de la caractérisation étant détaillé en annexe. Dans le cadre du médicament, les nano-objets peuvent être l'entité thérapeutique ou diagnostique par eux-mêmes (exemple des oxydes de fer nanoparticulaires comme agents de contraste en IRM) ou servir de vecteurs à des agents pharmacologiques contenus dans le nano-objet (exemple des nanocapsules et des liposomes). Dans ce dernier cas, il faudra caractériser aussi bien le vecteur vide que le produit final contenant le(s) principe(s) actif(s). Les paramètres à prendre en compte concernent la morphologie et la taille (par microscopie optique, électronique ou de force atomique, Raman), la structure et la composition chimique réelle (techniques généralement basées sur les rayons X), la distribution de taille des objets (diffusion de la lumière, rayons X), la surface spécifique et la charge de surface. Chacune de ces méthodes présentant des biais de mesure, l'usage d'une combinaison d'approches pour appréhender au mieux les caractéristiques du produit est recommandé. Eu égard au devenir complexe des nanomédicaments, ces études de caractérisation doivent porter aussi bien sur les composants élémentaires que sur les nanomédicaments finis, en passant par les intermédiaires éventuels comme les nanovecteurs vides ou les produits de dégradation ou de métabolisation des nanomédicaments dans l'organisme. Dans le cas d'un nanovecteur, le nanovecteur vide (qu'il soit formé de liposomes, polymères, micelles, peptides ou d'une phase minérale) devrait être caractérisé dans les milieux de préparation, de conditionnement mais aussi dans des milieux représentant au mieux les milieux biologiques rencontrés par le nanomédicament. Le nano-objet après chargement doit être à nouveau caractérisé, vu que l'ajout du principe actif peut introduire des modifications importantes en termes de taille (effet de gonflement) ou de chimie de surface. De même, le principe actif peut subir des modifications physiques ou chimiques lors de son incorporation dans le vecteur (par exemple protonation, précipitation, conjugaison chimique). Une détermination de l'efficacité d'encapsulation ou de fixation du principe actif, du taux d'incorporation et de la stabilité doit aussi être menée avec des méthodes appropriées. En plus du vecteur proprement dit et du principe actif, de nombreux nanomédicaments incluent des agents de modification de surface, ce qui impose de caractériser à nouveau le produit (taille, distribution de taille, chimie de surface) après inclusion de ces agents de modification.

La reproductibilité et la comparabilité des lots utilisés dans les études non-cliniques et cliniques devront être démontrées, notamment des paramètres physico-chimiques de base (par exemple taille et distribution de taille, surface spécifique, chimie de surface etc).

Concernant le devenir des nanomédicaments après administration, 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 porter sur le(s) matériau(x) constituant les nanomédicaments sur le(s) principe(s) actif(s) qui leur est (sont) associé(s), ainsi que sur les différents assemblages présents dans l'organisme, que ce soit le médicament nanoparticulaire complet ou ses produits de dégradation totale ou partielle. Il faudra utiliser une méthode de marquage et s'assurer que le marqueur utilisé ne modifie pas de façon substantielle 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 marquage multiple et de vérifier comment les marqueurs restent associés tout au long du suivi de la biodistribution. Les méthodes de marquage classiques, marquage fluorescent ou radioactif, sont utilisables. Les techniques d'imagerie scintigraphique, de TEP (PET en anglais) ou d'imagerie en fluorescence ne donnent pas de résultats quantitatifs mais sont néanmoins adaptées à l'étude de la biodistribution des nanomédicaments administrés par voie parentérale et pulmonaire, voire entérale, ainsi qu'à la détermination des sites de séquestration et des phénomènes de translocation.

Dans l'état actuel des connaissances, si l'on met à part le cas des nanomédicaments 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 produits de dégradation.

Enfin, 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.

Pour les études de pharmacologie de sécurité, l'utilisation de la batterie de tests préconisés 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 HEK293 est pertinent et applicable aux formes nanoparticulaires.

Les études d'évaluation du potentiel toxique des nanomédicaments doivent se faire au moyen d'études *in vitro* et *in vivo*. Il est fortement recommandé de mettre au point et de valider des méthodes *in vitro* permettant dès le stade des prérequis d'obtenir des informations sur la cytotoxicité, la capacité phagocytaire et l'activation des macrophages, l'activation de la voie du complément, les relargages cytokiniques (relargages de cytokines), la biopersistance, la génération d'espèces radicalaires toxiques, la tolérance locale cutanée, pulmonaire et oculaire (si ces voies sont utilisées) etc.

In vivo, la toxicité par administration unique qui avait perdu de sa légitimité dans le développement d'un médicament ces dernières années, devrait retrouver un second souffle avec le développement des nanomédicaments. L'évaluation de la toxicité par administration unique apporte beaucoup d'informations sur les effets indésirables des nanomédicaments également administrés à dose unique chez l'Homme (par exemple les produits d'imagerie). On recommandera de concevoir ces études non pas comme des études de toxicité aiguë dont le « end point » est la mort de l'animal, mais comme des études complètes de toxicité incluant l'évaluation de paramètres biologiques, hématologiques et anatomopathologiques comme dans les études par administration répétée (« extended single dose study »). En effet, les études classiques de toxicité aiguë étaient conduites pour déterminer des doses létales tuant 50% de l'effectif considéré (LD50). Ainsi, ce nouveau design d'études à administration unique pourrait également s'avérer utile pour comparer dans des délais brefs des principes actifs sous forme nanoparticulaire et conventionnelle, destinés à être administrés de façon répétée à l'Homme (par exemple les médicaments anticancéreux). Il en sera de même pour les utilisations locales.

Comme pour tout autre médicament, les études par administrations répétées sont importantes. Toutefois, leur évaluation ne peut obéir à des schémas d'étude standard en raison des différences ayant trait à la structure et à la physicochimie des particules, aux espèces animales utilisées, aux indications et aux conditions d'administration en thérapeutique, etc. Il sera donc recommandé d'une part d'utiliser des protocoles dessinés au cas par cas, adaptés aux caractéristiques ci-dessus évoquées, se rapprochant le plus possible des conditions d'exposition humaines ; les protocoles caricaturaux conduisant à des expositions massives des animaux, et en conséquence à des effets indésirables inexploitablement devront être bannis. De plus, il est recommandé de s'attacher à l'investigation d'organes ou de systèmes cibles potentiels :

- ✓ le foie et les organes du système réticuloendothélial (capture, stockage et élimination),
- ✓ 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 hématoencéphalique, 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 (p. ex. atteinte potentielle de la fertilité),
- ✓ le système cardiovasculaire (p. ex : formation d'agrégats),
- ✓ la crase sanguine et les cellules sanguines en général
- ✓ 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 lié à la formation d'agglomérats est un risque classique, identifié dès l'utilisation des premiers nanomédicaments sous forme de liposomes. La formation d'agglomérats peut affecter divers territoires dans l'organisme, notamment au niveau des plus petits vaisseaux (microcirculation périphérique, vaisseaux cérébraux, etc.) en provoquant des phénomènes emboliques. Ce potentiel devra être évalué par des techniques appropriées, notamment histologiques. De même, une attention particulière devra être apportée à d'éventuelles perturbations de l'hémostase et de la coagulation sanguine.

Bien qu'il y ait très peu de publications relatives aux effets potentiels des nanoparticules sur la reproduction, la fertilité et le développement embryo-foetal, ceux-ci doivent être évalués en accord avec les lignes directrices en vigueur. Dans tous les cas, 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 aux nanomédicaments.

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 pour ces 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 physicochimiques 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 de ne pas suivre formellement pour les nanomédicaments la batterie de tests 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 (test d'Ames), 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 pharmaco/toxicocinétique). Quelles que soient les cellules utilisées (prioritairement primaires et d'origine humaine), un certain nombre d'informations concernant l'expression phénotypique de celles-ci doit être documenté, en particulier son statut p53 (préférentiellement efficient) et sa capacité à prendre en charge les formes réactives de l'oxygène (activités 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, l'efficacité et la cinétique d'absorption de nanomédicaments dans le type de cellule sélectionné devraient être documentées pour toutes les lignées cellulaires mises en œuvre. 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.

Lorsque des tests pour étudier la génotoxicité *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 pharmaco/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 devront être 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 répétées à court terme.

L'ANSM propose donc que la batterie de tests de base pour la détermination du potentiel génotoxique d'un nanomédicament comporte au moins un test *in vitro* du micronucleus, un test *in vitro* des comètes sur cellules en culture et un test *in vivo*.

- ✓ 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*.

- ✓ 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.
- ✓ 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.

L'évaluation du potentiel cancérigène expérimental des nanomédicaments est actuellement un débat ouvert. D'une part, il n'est pas exclu que les nanomédicaments puissent induire des processus tumoraux, en raison de leur structure, des dommages potentiels qu'ils peuvent causer à l'ADN, des processus inflammatoires qu'ils peuvent développer et de leur bioaccumulation. 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, leurs 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 nanomédicament 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 inadaptées. 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. 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 aussi évident que, dans ce contexte, une évaluation particulièrement pertinente du potentiel génotoxique sera d'une aide précieuse dans l'évaluation du risque.

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 nanomédicaments suggèrent que ces produits sont capables de modifier ces deux types de réponse. Par ailleurs, la matière sous forme particulière 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.

L'effet délétère qui est le seul bien identifié est le syndrome CARPA, 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 nanomédicaments 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. Actuellement, 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. 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 possibles. En conséquence, il est donc recommandé de procéder à une évaluation du potentiel immunotoxique des nanomédicaments en particulier pour les médicaments administrés par inhalation et ceux administrés par voie injectable (SC, IM, IV). Cette évaluation doit faire appel à des méthodes adaptées et validées.

Dans le cas de la détection d'un potentiel immunosuppresseur, la mise en œuvre de la méthodologie développée dans la ligne directrice ICHS8 s'applique tout en 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-dépendant. Dans le cas des nanomédicaments, la mise en œuvre d'un test fonctionnel mesurant les effets des nanoparticules 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 nanoparticules 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 cutanée 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 nanomédicaments destinés à être administrés par d'autres voies que l'application cutanée. Les limites sont aussi l'absence de validation du LLNA pour les produits particuliers et l'absence de protocoles établis pour évaluer les effets adjuvants potentiels des nanoparticules.

Concernant les effets sur l'Environnement, et bien que le nombre de publications d'études sur les nanomatériaux augmente, il demeure de nombreuses inconnues sur leurs effets et leur transfert dans les différents maillons de la chaîne alimentaire. Des travaux ont néanmoins montré des risques potentiels pour les invertébrés et les poissons, y compris des effets sur le comportement, la reproduction et le développement. Il convient donc de prendre en compte le fait que les nanomédicaments sont susceptibles d'affecter les différents compartiments physiques (atmosphère, eau, sols, sédiments) ou biologiques de l'environnement. Il convient d'évaluer la biodégradabilité et la bioaccumulation des nanomédicaments afin d'estimer leur persistance dans l'environnement. Cette approche peut être réalisée en appliquant les tests

usuels préconisés dans le document guide EMEA/CHMP/SWP/4447/00 sur l'évaluation du risque environnemental des médicaments en s'appuyant sur un contrôle des propriétés physico-chimiques des nanomédicaments. Les travaux disponibles montrent en effet une pertinence écologique élevée au regard des propriétés d'agrégation et d'agglomération puis de sédimentation des nanomatériaux dans les milieux aquatiques. L'étude du devenir et du comportement des nanomédicaments, leur interaction avec les différents compartiments environnementaux, avec les organismes vivants, leur biodisponibilité, leur bioaccumulation, leur biodégradation, comme la modification de leurs propriétés physico-chimiques sont importantes à considérer. Dans l'absolu, il faudrait évaluer le devenir, le comportement et les impacts des nanomédicaments au niveau d'un écosystème dans son ensemble. Pour ce faire, les expérimentations en mésocosmes aquatique et terrestre pourraient constituer une approche intéressante, comme cela a été fait par exemple pour les pesticides, afin d'étudier le transfert trophique des nanomatériaux et des substances véhiculées à leur surface dans les chaînes alimentaires et leurs effets écotoxiques sur les différents maillons.

4.1.1.5 Conclusion et enjeux

Différentes opinions se sont manifestées pour estimer que les méthodes d'évaluation expérimentales existantes n'intégraient pas de manière adéquate les propriétés des produits sous forme de nanoparticules. En conséquence, on peut être amené à préconiser le développement d'une réglementation totalement nouvelle, basée sur des tests « adaptés » d'évaluation de la sécurité, pour les produits nanoparticulaires, incluant les nanomédicaments. Cette proposition maximaliste paraît idéaliste selon la très grande majorité de la communauté scientifique. Combien d'années de mise au point et de validation seraient nécessaires pour arriver à ce résultat ? Par ailleurs les données scientifiques existantes ne paraissent pas justifier une telle révision. Les recommandations de l'ANSM sont fondées sur le concept suivant : l'évaluation de la sécurité des nanomédicaments, 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.

Bien qu'il n'y ait pas jusqu'à présent de réglementation particulière concernant les nanomédicaments, il ne faut pas perdre de vue que dans le cas d'un produit princeps (médicament d'origine), ce produit sera soumis à une évaluation de sa sécurité pour le patient en conformité avec la réglementation : développement préclinique complet, développement clinique etc. C'est pourquoi l'enjeu prioritaire est de définir des lignes directrices communes pour assurer la sécurité des produits pouvant devenir des « génériques ».

En effet Le médicament générique est défini par le code de la santé publique (CSP) à l'article L. 5121-1 5° a) qui précise notamment qu'une « spécialité générique d'une spécialité de référence, a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique et dont la

bioéquivalence avec la spécialité de référence est démontrée par des études de biodisponibilité appropriées ». Le médicament générique contient donc le même principe actif que le médicament original et obligatoirement en même quantité. En revanche, les autres composants du médicament dépourvus d'activité (les excipients), peuvent être différents dès lors que la biodisponibilité du médicament n'est pas remise en cause. Le dossier pharmaceutique d'un médicament générique doit réunir tous les éléments permettant de justifier de :

- La qualité du médicament (origine et spécifications des matières premières des excipients, caractérisation des impuretés de synthèse et de dégradation, méthodes de fabrication et de contrôle du produit fini),
- La reproductibilité de cette qualité d'un lot à l'autre (validation des méthodes de fabrication et de contrôle) du maintien de cette qualité (études de stabilité),
- La similarité du médicament générique au médicament d'origine.

Les études précliniques (toxicologiques) et cliniques ne sont pas exigées car le principe actif a déjà fait l'objet de ces études lors de la demande d'AMM du médicament d'origine. L'absence d'étude doit toujours être justifiée dans le dossier de demande d'AMM générique.

Peut-on alors utiliser la même démarche que pour l'évaluation médicaments génériques pour des produits nanoparticulaires ? Dans le cadre d'une SA ou principe actif « classique », la synthèse peut se faire selon différentes voies qui au final n'a pas d'effet sur le médicament du moment que la composition qualitative et quantitative demeurent les mêmes. Toute variation du processus de fabrication et de formulation peut entraîner un produit présentant des propriétés physico-chimiques différentes (par exemple, la taille, la distribution en taille, les propriétés de la surface, le « chargement » du médicament au sein de la nanostructure, le profil de libération, l'état de l'agrégation et la stabilité), ce qui pourrait conduire à un produit avec une profile biopharmaceutique différent ayant un impact significatif sur la sécurité et l'efficacité pour le patient. Ainsi, les différentes propriétés physico-chimiques peuvent entraîner des différences au niveau des effets pharmacologiques, des interactions cellules-nanoparticules, de la distribution, de l'absorption par les organes cibles, d'effets immunologiques... Si de telles différences existent, la réglementation des génériques ne peut donc pas s'appliquer pour les produits nanoparticulaires. En effet des approches plus complexes que des études de bioéquivalence sont nécessaires.

On parlera alors de produit nanosimilaire et non de générique. Cette notion a d'ailleurs été reprise dans les travaux de l'EMA auxquels l'ANSM a participé. Ainsi, à l'instar de la FDA, l'EMA reconnaît que les nanosimilaires nécessitent des évaluations au cas par cas en raison de la complexité du produit et que la sécurité des nanomédicaments qui seraient une « copie » d'un princeps, peut être différente des médicaments génériques traditionnels. En particulier, les propriétés de la surface telles que l'orientation du ligand (à la surface de la nanoparticule) peuvent régir la cinétique, la biodistribution, la stabilité et le devenir intracellulaire des nanomédicaments, et ont donc un impact essentiel à leur sécurité et à leur efficacité.

En outre, les propriétés physico-chimiques des nanomédicaments sont sensibles aux procédés de fabrication (c'est-à-dire que le procédé est le produit) par conséquent, les tests de bioéquivalence conventionnels peuvent ne pas être suffisants et la détermination du nombre de données cliniques requises pour les « nanosimilaires » par rapport au princeps, est un défi.

Pour illustrer les défis et la complexité de la réglementation concernant les nanosimilaires, le Doxil® et l'Abraxane® peuvent être utilisés comme exemples. Dans le document de la FDA concernant le médicament Doxil® (<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM199635.pdf>) il est indiqué qu'un médicament nanosimilaire devrait avoir la même composition en substance active et des caractéristiques équivalentes concernant la partie liposomale, et que le processus de fabrication est un élément critique influençant la bioéquivalence pharmacocinétique.

Contrairement au Doxil®, qui utilise des phospholipides bien définis comme vecteur et qui circule dans le corps en tant que particules liposomales intactes, l'Abraxane contient® un composant biologique, l'albumine et les nanoparticules sont conçues pour se dissocier rapidement permettant une libération et une distribution rapide de la substance active. En plus des études cliniques de PK mesurant la fraction libre/totale en paclitaxel et la distribution granulométriques des particules, les recommandations de la FDA pour les produits nanosimilaires de l'Abraxane® insiste sur la nécessité de procéder *in vitro* à une caractérisation exhaustive des nanoparticules et d'étudier la morphologie des particules, la taille, le potentiel de surface, la cristallinité du paclitaxel, de mesurer les quantités de paclitaxel ou l'albumine libre et consolidé dans la suspension reconstituée, de déterminer la nature de la liaison entre le paclitaxel et l'albumine, la cinétique de libération *in vitro* et le statut oligomère de l'albumine dans l'excipient et le médicament. Par ailleurs, La composante albumine de l'Abraxane® soulève également les problèmes de tests liés aux produits biologiques et aux biosimilaires, tels que l'immunogénicité.

Les nanoparticules d'Abraxane sont des structures tridimensionnelles complexes avec de multiples composants et des variations dans le processus de fabrication peuvent créer des changements dans les caractéristiques critiques des particules ainsi que sur le profil de sécurité et d'efficacité du produit. Par conséquent, des études cliniques supplémentaires peuvent être nécessaires pour assurer l'innocuité et l'efficacité d'un médicament nanosimilaire, car les méthodes de test classiques peuvent ne pas pouvoir détecter de tels changements subtils.

Un autre exemple concerne les solutions colloïdales nanométriques de Fer administrées par voie i.v. Ces produits ont des structures complexes composées d'un noyau de Fer (III) enveloppé par un polymère carbohydaté tel que des dextrans, des sucroses, des gluconates et de carboxymaltoses. Tous ces produits sont susceptibles d'engendrer des réactions d'hypersensibilité ou d'autres types de réactions secondaires qui peuvent dans certains cas être très sévères. Une autre inquiétude est liée à la possibilité pour la libération de Fer non lié et donc libre, ce qui peut entraîner des effets toxiques à court ou long terme, induits par un stress oxydatif. Ainsi, le document de l'EMA « nanosized colloid iron-based preparations developed with

reference to an innovator product » écrit en partenariat avec l'ANSM, présente les points nécessaires à étudier pour ce type de produits. Il existe un produit princeps et des produits qui lui sont similaires et non des génériques du produit princeps. Par exemple, Venofer® est le produit princeps et les produits nanosimilaires sont : Fer Mylan®, Fer panpharma®, Fer Sandoz® et Fer Arrow®. Ceci est en adéquation avec le fait que la méthode de fabrication supplante la notion de l'identité de la composition qualitative et quantitative. Certaines études cliniques remettent en cause une non équivalence de l'efficacité clinique.

Les exemples du Doxil®, de l'Abraxane® et des solutions colloïdales nanométriques d'oxyde de Fer, mettent en avant qu'il est crucial de pouvoir bénéficier d'outils de traçabilité pour recenser les produits sous forme nanoparticulaire aux différents stades de leur développement pharmaceutique mais aussi d'anticiper pour les produits ayant déjà obtenus une AMM, les exigences réglementaires pour les produits qui revendiqueraient une similarité. Cela ne peut se faire que par une connaissance détaillée des caractéristiques physico-chimiques, des données de sécurité et d'efficacité. Ces nanosimilaires ne peuvent pas et ne doivent pas être traités comme des produits génériques et par conséquent une position adaptée quant à l'enregistrement et l'évaluation de tels produits doit être prise.

Comme indiqué auparavant une traçabilité est nécessaire concernant les produits nanoparticulaires d'autant que le sujet des nanotechnologies est un débat médiatique et très passionné comme ce fut le cas lors du Débat du public. Les articles L.5231-1 à L.523-3 du code de l'environnement prévoient l'obligation de déclarer les quantités et les usages de substances à l'état nanoparticulaire produites, distribuées ou importées en France. Les déclarations et les données qu'elles contiennent sont gérées ensuite par l'ANSES et contenues dans la base R-nano. Le décret n°2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire précise le champ de la déclaration :

- la nature des déclarants concernés (fabricant, importateur, distributeur) ;
- la définition retenue de la substance à l'état nanoparticulaire (qui repose sur la recommandation de la commission européenne) ;
- le seuil minimum de la déclaration qui est fixé à 100 grammes par an ;
- la possibilité d'effectuer des demandes de confidentialité.

L'arrêté du 6 août 2012 relatif au contenu et aux conditions de présentation de la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire précise les informations à déclarer :

- l'identité du déclarant ;
- l'identité de la substance à l'état nanoparticulaire ;
- la quantité de la substance à l'état nanoparticulaire produite, distribuée ou importée au cours de l'année relative à la déclaration ;

- les usages de la substance à l'état nanoparticulaire ;
- l'identité des utilisateurs professionnels à qui le déclarant a cédé la substance à l'état nanoparticulaire.

Ainsi, ce type de déclaration concerne bien évidemment les laboratoires pharmaceutiques, les laboratoires universitaires... Néanmoins, l'utilisation en tant que tel de cette base ne semble pas pouvoir apporter des réponses assez robustes pour la traçabilité de l'utilisation des nanoparticules dans le médicament. En effet, il y a une confusion entre « substance » (qui peut être active ou qui peut être un excipient) et la formulation globale du produit fini. De plus, sachant que la déclaration se limite aux particules ayant une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1nm et 100 nm, cela signifie qu'un nombre conséquent de particules ayant des dimensions comprises entre 100-999 nm. Il serait par conséquent souhaité soit :

- de préciser au déclarant qu'il faut différencier substance et produit fini ;
- de ne pas limiter la taille maximale à 100 nm ;
- d'inclure les codes correspondant aux codes utilisés pour une substance dans les essais cliniques ;
- d'inclure une rubrique produit fini.

4.2 Les dispositifs médicaux

4.2.1 Au niveau européen

4.2.1.1 Concernant le prochain règlement relatif aux dispositifs médicaux

La réglementation relative aux dispositifs médicaux sur le sujet précis des nanomatériaux est totalement inexistante à ce jour.

La directive 93/42/CEE consolidée définit un « dispositif médical comme tout instrument, appareil, équipement, logiciel, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, ainsi que tout accessoire, y compris le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques, et nécessaire pour le bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins de :

- Diagnostic, prévention, contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie
- Diagnostic, contrôle, traitement, atténuation ou compensation d'une blessure ou d'un handicap
- Etude ou remplacement ou modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique
- Maîtrise de la conception
- Et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens ».

La directive ne définit pas le terme nanomatériaux. Néanmoins, selon l'Annexe I « Exigences essentielles », Partie II « Exigences relatives à la conception et à la construction », 7, « Propriétés chimiques, physiques et biologiques », au point 7.6 il est indiqué une exigence pouvant se rattacher aux nanomatériaux « Les dispositifs doivent être conçus et fabriqués de manière à minimiser autant que possible les risques dus à la pénétration non intentionnelle de substances dans le dispositif, en tenant compte du dispositif et de la nature du milieu dans lequel il est destiné à être utilisé. »

C'est dans le règlement du (UE) 2017/745 du Parlement européen et du Conseil du 5 Avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux, et modifiant la directive 2001/83/CE, le règlement (CE) n°178/2002 et le règlement (CE) n°1223/2009 et abrogeant les directives du Conseil 90/385/CEE et 93/42/CEE, applicable à partir du 26 mai 2020, que la notion de nanomatériaux dans les dispositifs médicaux apparaît.

Le considérant (15) indique :

« Il n'existe pas de certitude scientifique quant aux risques et aux avantages des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux. Il est nécessaire, pour garantir un niveau élevé de protection de la santé, la libre circulation des marchandises et la sécurité juridique pour les fabricants, d'introduire une définition homogène des nanomatériaux fondée sur la recommandation 2011/696/UE de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux, et de prévoir la marge nécessaire pour adapter cette définition aux progrès scientifiques et techniques et à l'évolution de la réglementation de l'Union et de la réglementation internationale qui s'ensuit. Les fabricants de dispositifs médicaux qui utilisent, pour la conception et la fabrication de ceux-ci, des nanoparticules présentant un potentiel d'exposition interne moyen ou élevé, devraient prendre des précautions particulières et ces dispositifs devraient être soumis à la procédure d'évaluation de la conformité la plus stricte. Lors de l'élaboration des actes d'exécution réglementant l'application pratique et uniforme des prescriptions correspondantes, il y a lieu de tenir compte des avis scientifiques pertinents des comités scientifiques concernés. »

L'article 2 définit le terme nanomatériaux à l'entrée 18 :

On entend par nanomatériau : « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.

Les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm sont considérés comme des nanomatériaux; Entrée 19) : "particule", aux fins de la définition de nanomatériau au paragraphe 1, point 15), un minuscule fragment de matière possédant des contours physiques bien définis; Entrée 20) : "agglomérat", aux fins de la définition de nanomatériau au point 15), un amas friable de particules ou d'agrégats dont la surface externe globale

correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels; Entrée 21) : "agrégat", aux fins de la définition de nanomatériau au point 15), une particule constituée de particules soudées ou fusionnées; »

Selon l'Annexe I relative aux exigences générales en matière de sécurité et de performances, Chapitre II concernant les exigences relatives à la conception et à la fabrication, 10. Propriétés chimiques, physiques et biologiques : 10.6. Les dispositifs sont conçus et fabriqués de façon à réduire autant que possible les risques associés à la taille et aux propriétés des particules qui sont libérées dans le corps du patient ou de l'utilisateur, ou sont susceptibles de l'être, sauf si elles entrent en contact uniquement avec une peau intacte. Une attention particulière est accordée aux nanomatériaux.

Selon l'Annexe VIII relatives aux règles de classification, Chapitre III Règles de classification, 7. Règles particulières, 7.6. Règle 19 :

Tous les dispositifs qui incorporent un nanomatériau ou qui en sont constitués relèvent:

- de la classe III s'ils présentent un potentiel d'exposition interne moyen ou élevé;
- de la classe IIb s'ils présentent un faible potentiel d'exposition interne;
- de la classe IIa s'ils présentent un potentiel d'exposition interne négligeable.

Par ailleurs, le SCENHIR en 2015 a publié un document guide et propose une démarche d'évaluation du risque des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Ce référentiel, publié au niveau européen a été repris par le RIVM en 2015. La démarche d'évaluation du risque proposée par le SCENIHR est actuellement la seule existante. Les principes retenus par le SCENIHR sont repris dans les paragraphes suivants.

4.2.1.2 Concernant la démarche d'évaluation des risques proposée par le SCENHIR (2015)

Le SCENIHR (2015) propose la stratégie d'évaluation du risque suivant, basée sur le relargage des particules :

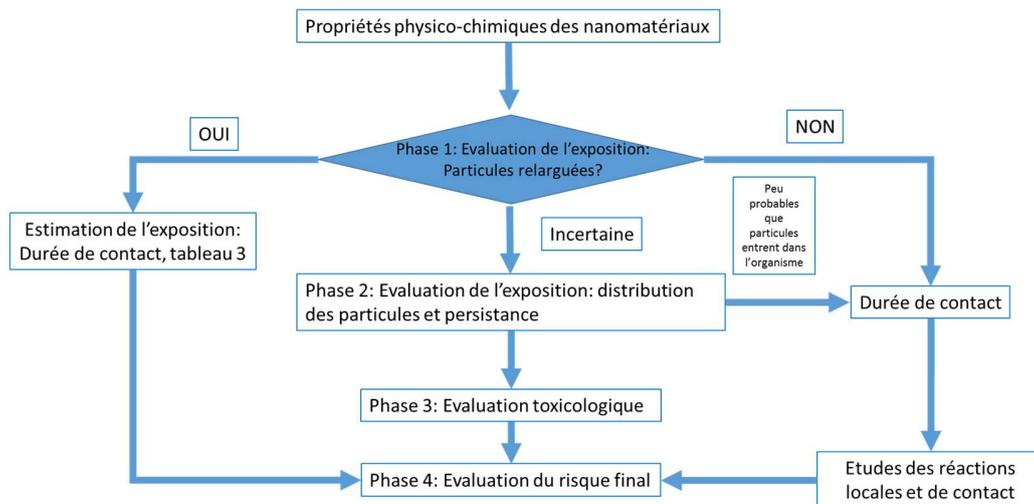


Figure 9: Evaluation du risque des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux invasifs, selon le SCENIHR (2015)

Dans les paragraphes suivants chaque phase du logigramme du SCENIHR est détaillée :

Propriétés physico-chimiques des nanomatériaux

Caractérisation des matériaux

Selon la norme ISO 10993-1, la caractérisation des matériaux est une étape préliminaire essentielle du processus d'évaluation biologique.

Les nanomatériaux présentent des propriétés uniques en fonction de leur taille, de leur forme et de leur morphologie, qui dépendent souvent du temps. Par conséquent, les nanomatériaux nécessitent une caractérisation et une identification précises à tous les stades de la conception, du développement et de la production finale de dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux (SCENIHR 2010, Afssaps 2011, EFSA 2011, SCCS 2012 cités par le SCENHIR 2015). Pour l'évaluation des risques, ces informations sont essentielles pour l'identification des espèces chimiques en cours d'évaluation et pour l'identification de l'exposition. L'identification est également nécessaire pour montrer que les nanomatériaux sur lesquels les études toxicologiques ont été réalisées ont les mêmes caractéristiques / similaires que celles utilisées dans le dispositif médical.

Caractérisation physico-chimique

La première étape dans l'évaluation des risques posés par les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux est d'identifier chimiquement et de caractériser les nanomatériaux utilisés comme matériaux de départ pour la production d'un dispositif médical, y compris l'identification d'éventuelles impuretés. Il est essentiel de prouver que les données de caractérisation se rapportent au même nanomatériau utilisé dans le produit final.

Les paramètres les plus importants des nanomatériaux destinés à être utilisés dans les dispositifs médicaux sont présentés dans le Tableau 16, ainsi que des méthodes de caractérisation et de mesure appropriées. Il est important de noter que les nanomatériaux peuvent modifier leur chimie de surface pendant le traitement, par exemple en acquérant des molécules de surface nouvelles ou additionnelles qui peuvent agir comme des revêtements. En particulier dans les systèmes d'essais biologiques, on sait que diverses protéines adhèrent au nanomatériau formant une «couronne protéique» (Maiorano et al., 2010, Lesniak et al., 2012 cités par le SCENHIR 2015). La couronne de protéines n'est pas statique car la composition des protéines adhérant à la surface sur le nanomatériau change pendant le contact.

Compte tenu de ces changements de surface potentiels, il est important que l'état physico-chimique d'un nanomatériau soit déterminé à différents stades de l'essai et / ou de l'utilisation, y compris la stérilisation des dispositifs médicaux invasifs (Lawrence, 1998). Comme la liste du Tableau 16 n'est pas exhaustive, les fabricants devraient être prêts à fournir des informations supplémentaires sur d'autres paramètres, le cas échéant, pour l'évaluation des risques.

Tableau 16: Paramètres pour la caractérisation et l'identification des nanomatériaux pour une utilisation prévue dans les dispositifs médicaux (selon le SCENIHR 2015)

Paramètres	description	Méthodes
Composition chimique / Identité	Information sur la composition chimique du nanomatériau incluant la pureté, la nature des impuretés, les revêtements (coatings), les matériaux encapsulants, traitement chimique, agents dispersants et/ou autres formulants (ex : stabilisants, information sur la formule structurale des constituants du nanomatériau doivent être fournis	MS, AAS, ICP-MS, FTIR, NMR UVVis, HPLC, GC/LC-MS, XRD Raman spectroscopy
Taille des particules (Primaire/Secondaire)	Informations sur la taille des particules primaires, la gamme de taille et la distribution en nombre de la taille (indiquant les variations lot par lot, le cas échéant). La même information serait nécessaire pour les particules secondaires (par exemple, les agglomérats et les agrégats) si présents. Au moins deux méthodes, une étant la microscopie électronique, devraient être utilisées	FFF, HDC, HPLC, AUC, CLS disc centrifugation, TEM, SEM, STEM, HRTEM, STM, AFM, DLS, DMA, NTA
Forme physique et morphologie	Informations sur la forme physique et la forme cristalline. L'information devrait indiquer si le nanomatériau est présent sous forme de particules, de sphères, de flocons, de tubes, de tiges ou de fibres, le rapport d'aspect, le cristal ou la forme amorphe, et qu'il soit sous forme de particules libres ou dans un état aggloméré / agrégé ainsi que si la préparation se présente sous la forme d'une poudre, d'une solution, d'une suspension ou d'une dispersion.	AFM, TEM, HRTEM, SEM, STEM, STM, NMR, XRD

Concentration de particules en masse	Informations sur la concentration en du nombre de particules et en masse de particules par volume en dispersion et en masse lorsque les particules sont présentes sous forme de poudre sèche.	Un large éventail de méthodes analytiques incluant UV-Vis, HPLC, GC/LC-MS, AAS, ICP-MS
Aire de surface spécifique	Informations sur la surface spécifique des nanomatériaux. Pour le moment, cela ne s'applique qu'aux poudres sèches	BET
Chimie de surface	Informations sur la surface des nanomatériaux - y compris les modifications chimiques / biochimiques qui pourraient modifier la réactivité de surface, ou ajouter une nouvelle fonctionnalité.	LDE, SPM, XPS, MS, RS, FTIR, NMR, AUC (pour la composition de surface), GE, SPM, LDE, Nano SIMS, SERS
Charge de surface	Information sur le potentiel zéta des nanomatériaux	PALS (pour le potentiel zéta)
Potentiel rédox	Informations sur le potentiel redox, en particulier pour les nanomatériaux inorganiques. Les conditions sous lesquelles le potentiel redox a été mesuré doivent également être documentées.	Méthodes potentiométriques, Spectroscopie d'absorption aux rayons X
Propriétés de solubilité et de partition	Informations sur la solubilité du nanomatériau dans les solvants pertinents et leur répartition entre la phase aqueuse et la phase organique (par exemple, comme log Kow le cas échéant).	Solubilité/taux de dissolution dans l'eau et les autres solvants
pH	pH de la suspension aqueuse	pH dans les milieux aqueux
Viscosité	Information sur la viscosité des dispersions liquides	OCDE 114
Densité et densité des pores	Pour les matériaux granulaires, informations sur la densité / porosité du nanomatériau non formé et la densité des pores.	DIN ISO 697, EN/ISO 60

Poussière (dustiness)	Informations sur la poussière des produits en poudre sèche - tels que les ciments et les alginates	EN 15051:2006, DIN 33897-2.
Réactivité chimique / activité catalytique	Informations sur l'activité photocatalytique des matériaux pertinents utilisés (par exemple, revêtements, matériaux dentaires)	TEM, UV, X-ray topography

Méthodes de caractérisation

Au cours des dernières décennies, diverses techniques de mesure à l'échelle nanométrique ont été développées, qui reposaient pour la plupart sur des phénomènes physiques observés dans les interactions de particules ou les forces à l'échelle nanométrique. Certaines des techniques les plus couramment utilisées sont la microscopie de force atomique (AFM), la diffraction des rayons X, la diffusion de rayons X à petits angles (SAXS), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA) et diverses techniques de microscopie électronique (TEM, SEM, STEM, HRTEM).

La mesure de la taille d'une matière particulaire devrait utiliser des techniques différentes selon que les nanoparticules se présentent sous forme de poudre, sont dispersées dans un liquide, possèdent un revêtement ou sont intégrées dans un matériau solide. Toutes les méthodes ne mesurent pas la même taille, par exemple. TEM et AFM mesurent la taille sans les revêtements organiques, tandis que la taille déterminée par DLS ou NTA inclut le revêtement organique dans la mesure. Chaque méthode a ses limites spécifiques et sa taille optimale. La nanométrie est définie comme la science des mesures à l'échelle nanométrique et fournit des mesures d'étalonnage. (SCENHIR 2015)

Des procédés pertinents pour la caractérisation de nanomatériaux peuvent comprendre une séparation de taille et une extraction (par exemple une ultracentrifugation, FFF, HDC) et une analyse / détection chimique par spectroscopie ou par spectrométrie de masse, (par exemple ICP-MS, spectroscopie UV, AAS, détermination de surface (BET) et des variantes). Des procédés d'imagerie in situ de nanomatériaux, (par exemple, l'imagerie par particules magnétiques (MPI) et la tomographie par émission de positons (PET) sont actuellement en cours de développement. (SCENHIR 2015)

La microscopie électronique est la méthode la plus généralement applicable pour la caractérisation des nanomatériaux. La taille et la morphologie sont facilement caractérisées dans la microscopie électronique à balayage par émission de champ (FESEM), FEG-SEM, TEM, STEM et FIB / SEM (cf. Tableau 17). HRTEM permet une information structurale sur les particules et sur les groupes atomiques de sous-résolution de 0,2 nm, tandis que l'analyse EELS et EDX dans le STEM permettent l'analyse chimique des particules jusqu'à des diamètres nanométriques. La combinaison de plusieurs méthodes permet d'étudier simultanément la taille, la forme, la structure, la composition et les propriétés de surface des particules. (SCENHIR 2015)

Tableau 17: Exemples de méthodes pour la détermination de la taille (d'après le SCENHIR 2015)

Méthodes	Limitations dans les gammes de mesure	Phase (liquide, solide, gaz) et sensibilité	Distribution des particules
SEM (STEM)	Au-dessus de 50-100 nm	Résolution 0,4 nm	non
TEM	Quelques nm	Résolution 0,05 nm	oui
STM		Résolution 0,01 nm à 0,1 nm	
HRTEM	En-dessous de 0,2 nm	Résolution 0,05 nm à 0,1 nm	oui
AFM	Zone balayée limitée	Résolution atomique mais la sensibilité diminue dans le temps	oui
SAXS	5-25 nm	Résolution 0,1 à 0,2 nm	oui
DLS & NTA	(1-2000 nm) & (10-15000 nm)	Fluides complexes	oui

L'EFSA et le SCCS exigent au moins deux méthodes pour la détermination de la taille, l'une d'entre elles étant une méthode de microscopie électronique. Le SCENIHR considère que suivant ce principe, ces mêmes exigences s'appliquent à la caractérisation des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux.

Phase 1 : Evaluation de l'exposition : Relargage des particules

Le but de la phase 1 est d'examiner la probabilité que des nanoparticules soient libérées pour estimer l'exposition potentielle, soit comme propriété intrinsèque du dispositif, soit en raison de l'usure une fois implanté. S'il existe des preuves substantielles que les nanomatériaux sont incorporés dans le dispositif ou sont bien fixés de telle façon qu'ils seront retenus dans le dispositif pendant l'insertion, lors de la période d'utilisation et d'explantation, et que les particules ne sont pas relarguées des suites d'une usure, aucune autre évaluation spécifique des risques concernant la nanoparticule n'est requise. Il est toutefois important que les données pertinentes concernant la non-libération soient obtenues dans des conditions les plus défavorables.

Evaluation de l'exposition :

L'exposition peut être considérée comme le résultat de la libération potentielle du dispositif médical dans les conditions d'utilisation réelles (scénario d'exposition) et la toxicocinétique du nanomatériau (indiquant l'exposition interne possible).

Sur la base de l'exposition potentielle aux nanomatériaux dans les dispositifs médicaux, une estimation peut être faite de l'exposition en utilisant les temps d'exposition et les catégories d'exposition utilisés dans l'évaluation des risques et la gestion des risques des dispositifs médicaux indiqués dans ISO 10993-1: 2009 et ISO 14971: 2007 (cf.

Tableau 18).

Trois catégories d'exposition de dispositifs sont considérées en fonction du site d'application d'un dispositif médical:

- dispositif en contact avec une surface;
- dispositif communiquant avec l'extérieur;
- dispositif implantable.

Les types de contact tissulaire pris en compte dans l'évaluation des risques comprennent les catégories suivantes:

- peau;
- membrane muqueuse;
- surface brisée ou compromise;
- du sang;
- tissu;
- os;
- dentine.

Les temps de contact qui doivent être considérés:

- contact limité (≤ 24 heures);
- contact prolongé (> 24 heures à 30 jours);
- contact permanent > 30 jours.
-

Outre la propriété (bio) dégradable potentielle d'un matériau, la «qualité» du matériau utilisé pour fabriquer un dispositif médical doit être considérée en termes de résistance possible à l'usure.

Il est important de noter que mesurer la libération de nanomatériaux à partir d'un dispositif médical peut poser des problèmes d'analyse. Actuellement, une méthodologie robuste, particulièrement pour les mesures de la libération de nanomatériaux à faible niveau, fait défaut. Pour les nanomatériaux de métal et d'oxyde métallique, l'analyse élémentaire peut être utilisée comme substitut à la libération des nanoparticules et / ou des ions.

Ainsi, pour l'évaluation de l'exposition les données du

Tableau 18 ci-dessous peuvent être utilisées :

Tableau 18: Une estimation de l'exposition potentielle externe et interne comme point de départ pour une évaluation des risques pour les dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux, selon le SCENIHR (2015)

			Type of application of nanomaterials External exposure/internal exposure				
			Free	Fixed (coating) Weak (physisor b)	Fixed (coating) Strong (chemisor b)	Embedded In degradable materials*	Embedded In non-degradable materials
Type of device	Type of contact	Duration of contact					
Surface device	Intact skin	≤ 24 h	H/N	M/N	M/N	L/N	N/N
		>24 h to 30 d	H/N	M/N	M/N	M/N	N/N
		>30 d	H/N	M/N	M/N	H/N	N/N
	Intact mucosal membrane	≤ 24 h	H/L	M/L	M/N	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	H/M	M/M	M/L	M/M	N/N
		>30 d	H/M	M/M	M/L	H/M	N/N
	Breached or compromised surface	≤ 24 h	H/H	M/M	M/L	L/M	N/N
		24 h to 30 d	H/H	M/M	M/L	M/M	N/N
		>30 d	H/H	M/M	M/L	H/M	N/N
External Communicating device	Blood path, indirect **	≤ 24 h	na	M/M	M/L	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	na	M/M	M/L	M/M	N/N
		>30 d	na	M/M	M/L	H/M	N/N
	Tissue/bone/dentin	≤ 24 h	H/H	M/M	M/L	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	H/H	M/M	M/L	M/M	N/N
		>30 d	H/H	M/M	M/L	H/H	N/N
	Circulating blood***	≤ 24 h	na	H/H	H/H	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	na	H/H	H/H	M/M	N/N
		>30 d	na	H/H	H/H	H/H	N/N
Implant device	Tissue/bone	≤ 24 h	H/H	H/H	H/L	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	H/H	H/H	H/L	M/M	N/N
		>30 d	H/H	H/H	H/L	H/H	N/N
	Blood	≤ 24 h	H/H	H/H	H/L	L/L	N/N
		>24 h to 30 d	H/H	H/H	H/L	M/M	N/N
		>30 d	H/H	H/H	H/L	H/H	N/N

H=high, M=medium, L=low, N=negligible, na= not applicable

H/L means high potential contact and/or external exposure to the nanomaterial / low potential for internal systemic exposure of all organ systems

* the exposure will depend on the degradation time of the medical device

** contacting the blood path at one point. Examples of these types of devices are solution administration sets, transfer sets and blood administration sets (ISO 10993-4:2002)

*** Examples of these types of devices are: intravascular catheters, extracorporeal oxygenating tubing and dialysers (ISO 10993-4:2002).

Lorsqu'il peut y avoir une libération de nanomatériaux en quantité suffisante pour susciter des inquiétudes ou lorsqu'une telle quantité est inconnue, l'évaluation des propriétés physico-chimiques des particules

libérées est nécessaire. Il est essentiel que les particules étudiées dans les essais pour l'évaluation des risques soient équivalentes, en termes de propriétés physiques et chimiques, à celles qui peuvent être libérées in situ. Plusieurs scénarios pourraient être identifiés pour la libération des nanoparticules, y compris l'usinage, l'altération, le lavage, le contact et l'incinération (Frogget et al., 2014 cités par le SCENIHR 2015). Les débris identifiés étaient constitués de particules provenant de la seule matrice, de particules de matrice avec le nanomatériau incorporé, de nanomatériaux eux-mêmes ou de formes ioniques dissoutes du nanomatériau ajouté.

Les propriétés physicochimiques qui doivent être considérées comprennent:

- Solubilité dans l'eau. Si la solubilité dans l'eau est rapide, aucune autre considération n'est nécessaire en ce qui concerne la nature particulaire de la matière libérée, bien que les effets défavorables potentiels de la matière solubilisée doivent être considérés.
- Répartition et forme des particules. La mobilité des particules et l'efficacité des mécanismes de défense biologique pour y faire face sont affectées à la fois par la taille et la forme des particules.
- Capacité d'agglomération et de désagglomération. La capacité des particules à se combiner et à se dissocier est également un facteur qui affecte la taille des particules. Plus grande est la taille des particules dans les milieux biologiques, moins il y aura de rétention des propriétés tensio-actives associées aux nanoparticules.
- D'autres caractéristiques dépendent du nanomatériau utilisé comme chimie / composition de surface.

Les conditions les plus défavorables pour l'identification de la quantité, du taux estimé et du nombre de nanomatériaux libérés doivent tenir compte de la durée potentielle du contact du dispositif médical avec le corps. Lorsque l'exposition est attendue / estimée en raison de la libération des nanoparticules, des investigations plus poussées sont nécessaires.

Si la libération des particules ne se produit pas, une évaluation plus poussée peut être limitée principalement pour étudier les réactions locales. S'il existe une incertitude quant à la libération potentielle de nanoparticules, la phase 2 doit être effectuée.

Phase 2 : Evaluation de l'exposition : Répartition des particules et persistance

j) distribution des particules

Le but principal de cette phase est d'identifier la cinétique des particules afin de répondre aux tests de toxicité nécessaires à la phase 3, en fonction des scénarios d'exposition potentielle indiqués ci-dessus. Il est évident que l'absorption de particules libérées par des dispositifs médicaux non invasifs dans la circulation systémique et / ou l'emplacement du dispositif invasif sur / dans le corps et la durée du contact auront une influence majeure sur le potentiel de distribution des particules aux autres organes. Une autre

considération est la persistance / stabilité des particules dans le milieu biologique dans lequel elles sont libérées.

a) Non invasive (peau)

La question clé est d'identifier la probabilité de pénétration de la barrière cutanée. Si elle est négligeable, considérer uniquement le potentiel d'effets sur le site topique d'application qui doit être examiné dans la phase 3.

b) Invasif

L'absorption de particules du poumon dans la circulation systémique est plus probable qu'avec d'autres sites d'exposition. Par conséquent, le potentiel de particules libérées pour atteindre la région alvéolaire du poumon et la traversée dans la circulation systémique doit être estimé. En outre, les effets locaux dans le poumon devraient être pris en compte parce que la plupart, sinon toutes les particules, induisent une inflammation pulmonaire.

En outre, pour d'autres dispositifs invasifs, la distribution des particules libérées doit être estimée, en particulier, si elles restent sur le site d'application du dispositif (si cela peut être démontré, il faut alors accorder une attention particulière au potentiel d'accumulation, mais en principe, seules les réactions toxiques locales doivent être prises en compte dans la phase suivante). S'il existe une possibilité de distribution plus générale ou si cette possibilité ne peut pas être exclue, une évaluation plus approfondie de la toxicocinétique est nécessaire.

Pour des dispositifs de communication externes (par exemple : dialyse), la libération de particules entrant dans la circulation systémique doit être suivie d'études toxicocinétiques appropriées.

ij) Persistance des particules

Le nombre et la durée de la présence de particules dans un tissu spécifique sont des considérations importantes qui affectent la probabilité d'effets indésirables. L'exposition prolongée d'un tissu aux particules libérées peut se produire pour deux raisons:

- libération continue depuis le dispositif ;
- stabilité des particules et leur piégeage dans un tissu ou défaillance des mécanismes de clairance.

La libération due à l'utilisation du dispositif peut être estimée sur la base d'études physico-chimiques à court terme. Lorsque la libération est vraisemblable, des études animales *in vivo* peuvent être nécessaires pour obtenir une caractérisation adéquate de l'exposition interne.

Toxicocinétique :

Les propriétés toxicocinétiques des nanomatériaux, comme d'autres substances, peuvent être décrites par quatre processus: l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME). La nature des nanomatériaux peut altérer la toxicocinétique et la distribution tissulaire par rapport aux formes non nano. Pour les certains nanomatériaux solides, il peut être douteux voir incertain que la phase de métabolisme se produise réellement. La distribution tissulaire, l'accumulation et l'élimination des tissus sont considérées comme plus pertinentes que les concentrations plasmatiques sanguines. Il est particulièrement important d'évaluer la présence de nanomatériaux dans des organes de distribution qui ont une capacité accrue d'absorption de particules (par exemple : le foie, la rate et les poumons). En outre, le rein est un organe important en raison de l'excrétion possible des nanomatériaux. (SCENIHR, 2015)

La voie d'entrée est importante car elle peut affecter la cinétique des nanomatériaux. Par exemple, les nanoparticules d'or (1,4 nm) ont montré une plus forte absorption dans le rein par rapport au foie après une administration intratrachéale. En revanche, le foie était l'organe cible prédominant après une administration intraveineuse, suggérant une altération des nanoparticules au cours du passage de la barrière air / sang dans le poumon. Selon le site d'application, les cinétiques de relargage des nanomatériaux libérés peuvent être affectées par l'adhérence de molécules à la surface d'un nanomatériau. A cet égard, la formation d'une protéine de sérum "corona" peut améliorer la reconnaissance et l'absorption par les cellules du système de phagocytes mononucléaires est bien connue. Les cellules impliquées sont principalement des monocytes et des macrophages présents dans divers organes du système immunitaire comme la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. De plus, les macrophages tissulaires comme les cellules de Langerhans dans la peau, les cellules de Kupffer dans le foie et les macrophages alvéolaires dans le poumon font partie du MPS. En général, la clairance des nanoparticules provenant du sang se fait principalement par le foie et la rate. (SCENIHR, 2015)

Les nanoparticules relarguées localement dans les tissus peuvent migrer ou être transportées dans la circulation systémique. Le système de transport primaire est lymphatique permettant le transport des particules, mais aussi des particules qui ont été phagocytées par des macrophages tissulaires et / ou des cellules inflammatoires. Les ganglions lymphatiques régionaux sont les principaux lieux de ces particules. Cependant, en fonction de la localisation primaire, et lors de l'entrée dans la circulation sanguine, les nanoparticules peuvent se retrouver dans d'autres organes tels que la rate et le foie. Les nanomatériaux libérés d'un dispositif médical peuvent se translocaliser de leur site d'origine dans le corps. (SCENIHR, 2015)

La voie d'exposition dépend du dispositif médical utilisé. Potentiellement, toutes les voies d'exposition sont possibles. Indépendamment de la voie d'exposition des dispositifs médicaux, l'absorption et la

biodisponibilité de nanomatériaux potentiellement libérés à partir d'un dispositif médical ou la génération de nanoparticules par l'usure sont les points de départ pour l'évaluation de la toxicocinétique des nanomatériaux. (SCENIHR, 2015)

Méthodologie de la toxicocinétique :

La conception et la performance des études toxicocinétiques est décrite dans ISO 10993-16: 2010. Il est à noter que les produits de dégradation qui peuvent être considérés comme des nanoparticules ne sont pas mentionnés dans cette norme. La ligne directrice OCDE 417 décrit les études toxicocinétiques réalisées pour les substances chimiques et indique explicitement qu'elle n'est pas destinée aux essais toxicocinétiques des nanomatériaux. De manière analogue, les lignes directrices 427 et 428 de l'OCDE *in vivo* et *in vitro* pour l'absorption cutanée, respectivement, ont été élaborées pour des produits chimiques et ne se sont applicables pour les nanoparticules. Par conséquent, l'utilisation de ces méthodes devrait être évaluée au cas par cas.

Pour un produit chimique dissous, l'absorption et la libération du tissu dépendent généralement de la concentration sanguine (en excluant le transport actif spécifique, l'effet de premier passage hépatique et les produits chimiques fortement bioaccumulables dans le tissu adipeux) et un équilibre entre la concentration du sang et l'organe est généralement obtenu. L'absorption de nanoparticules dans les organes se produit rapidement et l'administration répétée entraîne une augmentation des nanomatériaux, principalement dans le foie et la rate après administration intraveineuse. La biodistribution des nanoparticules est influencée par un certain nombre de facteurs, dont la taille, la charge de surface et la composition de surface, comme la liaison et le revêtement des protéines. Il n'y a pas de concentration d'équilibre entre le tissu et le sang. L'absorption dans les organes peut se produire indépendamment de la concentration sanguine, c'est-à-dire même avec une faible concentration sanguine et une concentration élevée d'organe, l'absorption par les organes peut se produire. Il en résulte la persistance de nanomatériaux dans les organes pendant de longues périodes: l'argent pourrait encore être détecté dans divers organes au jour 17 après l'administration intraveineuse de nanoparticules d'argent chez le rat (Fabian et al., 2008 cités par le SCENIHR 2015). Les nanoparticules de titane sont encore détectables jusqu'à 90 jours après une administration intraveineuse unique et répétée (Nanogenotox 2013, Geraets et al., 2014 cités par le SCENIHR 2015). Afin d'identifier la distribution tissulaire et le potentiel d'accumulation tissulaire et de persistance d'un nanomatériau, il est nécessaire de concevoir des études cinétiques simples et répétées avec une période de suivi représentative. Cette information est utile pour extrapoler adéquatement la demi-vie. Dans la ligne directrice OCDE 417 sur les essais toxicocinétiques, la période de suivi est généralement de 7 jours, ce qui peut être une période trop courte pour les nanomatériaux en raison de leur persistance potentielle dans les organes.

La libération / élimination depuis les organes semble être associée à une éventuelle dissolution ou dégradation des nanomatériaux. Pour certains nanomatériaux, l'excrétion (nanoparticules de polystyrène,

MWCNT) a été démontrée par le rein et / ou le foie. La persistance potentielle se produit surtout pour les nanomatériaux solides non dégradables. (SCENIHR 2015)

Pour mener des études de toxicocinétiques avec des nanomatériaux, en adaptant les tests connus généralement utilisés pour les produits chimiques, le point critique concerne les systèmes de mesure pour la détection des nanomatériaux. La détection des nanoparticules dans les tissus et les organes est complexe. La microscopie électronique ne s'applique ni aux mesures quantitatives, ni à tous les nanomatériaux. À ce jour, la plupart des études sur la toxicocinétique des nanomatériaux utilisent l'analyse élémentaire des composants des nanomatériaux (par exemple Zn pour ZnO, Ti pour TiO₂, Ag pour nanoparticules Ag). L'analyse pourrait être effectuée en utilisant la spectroscopie de masse à plasma couplé inductivement (ICP-MS) ou la spectroscopie de masse par absorption atomique (AA-MS). Bien que cela fournisse une bonne indication de la répartition possible des tissus, la limitation est que les nanoparticules elles-mêmes ne sont pas détectées ou mesurées. En combinaison avec des techniques de séparation telles que le fractionnement par écoulement de champ (FFF), il est possible d'évaluer la présence de particules en utilisant la MS ICP à particule unique (Van Der Zande et al., 2012 cités par SCENIHR 2015). (SCENIHR 2015)

Le marquage spécifique des nanomatériaux peut être réalisé en utilisant des isotopes radioactifs comme radiomarqueurs ou colorants fluorescents. Un inconvénient est que le marqueur peut se détacher du nanomatériau (Geiser et Kreyling 2010 cités par SCENIHR 2015). La mesure ou l'imagerie identifiera alors le marqueur, mais pas la distribution des nanoparticules. En variante, on peut utiliser des isotopes radioactifs qui sont des isotopes d'un métal faisant partie du nanomatériau (par exemple l'or ou l'argent). Avec cette approche, il est certain que les nanoparticules elles-mêmes sont détectées, bien que pour les nanoparticules d'argent il y ait encore une incertitude concernant la libération des ions d'argent. De plus, des isotopes naturels stables comme le ⁶⁸Zn peuvent être utilisés pour démontrer l'absorption à partir du site d'application (Gulson et al., 2010 cités par SCENIHR 2015).

Les traitements de surface peuvent avoir un effet énorme sur la toxicocinétique des nanomatériaux. La PEGylation (revêtement d'un nanomatériau avec du polyéthylèneglycol) diminue la clairance sanguine des tiges nano d'or administrés par voie intraveineuse (Niidome et al., 2006, Lankveld et al., 2011 cités par SCENIHR 2015). De plus, le ciblage spécifique des organes peut être réalisé par le revêtement de nanomatériaux.

Phase 3 : Evaluation toxicologique

Si la libération des particules n'est pas identifiée dans la phase 1 et / ou la phase 2, les effets locaux des dispositifs médicaux sont supposés être adéquatement couverts par le schéma de tests existant tel qu'indiqué dans ISO 10993-1: 2009. Des études supplémentaires sont nécessaires s'il y a libération de particules.

a) Caractérisation des effets locaux

Le potentiel pour:

- Irritation ;
- Réaction immunitaire ;
- Cytotoxicité ;
- Génotoxicité ;
- Promotion de la division cellulaire.

En principe, certains de ces effets (par exemple, la génotoxicité) peuvent être évalués initialement dans des systèmes *in vitro*, à condition que ces systèmes d'essai permettent la pénétration des nanoparticules dans les systèmes cellulaires.

b) Caractérisation des effets systémiques

Lorsqu'il y a exposition à des particules dans un ou plusieurs tissus, une approche au cas par cas doit être adoptée pour laquelle l'approche du tableau 19 peut être utile. Des tests de toxicité standard sont appropriés pour évaluer le danger, bien qu'une attention particulière soit accordée à la capacité des particules à se concentrer dans les ganglions lymphatiques drainants et d'autres organes du système de phagocytes mononucléaires. Cela peut nécessiter une certaine adaptation des protocoles traditionnels d'évaluation de la toxicité.

Pour les expositions aiguës, seule la portée des tests se limiterait aux études aiguës, à moins qu'il soit probable qu'un dispositif similaire soit utilisé chez un même patient à plusieurs reprises.

Evaluation des risques des substances relargables :

L'évaluation du risque des substances relargables d'un dispositif médical est décrite dans la norme EN ISO 10993-17: 2002. La méthodologie d'évaluation des limites admissibles pour les produits chimiques peut également s'appliquer aux nanomatériaux. Dans cette norme, l'exposition estimée doit être comparée avec des données sur la toxicité.

En plus de la sélection des tests d'évaluation de la sécurité présentés pour les dispositifs médicaux dans la norme ISO 10993-1: 2009, des essais spécifiques pour les nanomatériaux utilisés dans un dispositif médical peuvent être nécessaires. Les tests à effectuer sont déterminés de la même manière que l'ISO 10993-1 mais reposent sur le potentiel de libération des nanomatériaux du dispositif et sur la durée de l'exposition. La stratégie des tests est proposée dans le

Tableau 19.

Tableau 19: Cadre pour des tests spécifiques de toxicité des nanomatériaux en fonction de la libération potentielle, selon le SCENIHR (2015)

Testing proposed	Non-invasive short term use	Non-invasive long term use	Invasive short term use	Invasive long term use
Low exposure	Phys: chem data	Phys: chem data	Phys: chem data	Phys: chem data
	Cytotoxicity <i>in vitro</i>	Cytotoxicity <i>in vitro</i>	Cytotoxicity <i>in vitro</i>	Cytotoxicity <i>in vitro</i>
	Irritancy <i>in vitro</i>	Irritancy <i>in vitro</i>	Irritancy <i>in vitro</i>	Irritancy <i>in vitro</i>
	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity	Hypersensitivity
		Genotoxicity <i>in vitro</i>		Genotoxicity <i>in vitro</i>
Medium exposure Additional tests		Genotoxicity <i>in vivo</i>	Other <i>in vitro</i> plus <i>in silico</i> testing*	28/90 day <i>in vivo</i> toxicity test
		Immuno toxicity at location site	Genotoxicity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (repeated dose) genotoxicity testing
		Persistence /accumulation studies at location site only		ADME including persistence /accumulation studies
High exposure Additional tests	Selected <i>in vivo</i> acute toxicity tests focussed on location site(s)	Selected <i>in vivo</i> chronic toxicity tests focussed on location site(s)	<i>In vivo</i> acute toxicity tests	<i>In vivo</i> chronic toxicity tests may include reprotox depending on patient group.

*See also EURL-ECVAM database (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/)

Phys: chem indicates data from physicochemical characterisation of the nanomaterials.

Le

Tableau 19 ne doit pas être considéré comme une liste d'essais à réaliser, mais il doit être considéré comme un guide concernant les essais qui doivent être considérés (conformément à ISO 10993-1: 2009) pour l'évaluation biologique dispositif médical contenant des nanomatériaux. Dans certains cas, des études spécifiques peuvent ne pas être nécessaires, mais une justification scientifiquement fondée doit être fournie.

Tests de biocompatibilité :

Les essais de biocompatibilité doivent être effectués selon les bonnes pratiques de laboratoire et de qualité reconnues, comme par exemple les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) ou ISO / CEI 17025, le cas échéant, et les données doivent être évaluées par des professionnels compétents (ISO 10993-1). Les études de toxicité nécessaires doivent être effectuées conformément aux normes internationales ISO 10993 (ISO 10993-1, 3-6, 10-12, 17, 19). Des études *in vivo* doivent être effectuées en utilisant une voie d'administration qui est pertinente pour la voie d'exposition humaine au dispositif médical et / ou aux nanomatériaux. Cependant, il convient de souligner qu'aucune des méthodes d'essai actuellement disponibles, tant *in vitro* qu'*in vivo*, n'a été validée spécifiquement pour les nanomatériaux. Les matériaux sous forme nano présentent de nombreux défis lorsqu'ils sont testés. Contrairement aux produits chimiques solubilisés, les nanomatériaux existent généralement sous forme de suspension / dispersion de nanoparticules insolubles ou partiellement solubles et / ou d'agglomérats et d'agrégats de plus grande taille, ce qui peut affecter le système d'essai. (SCENIHR, 2015)

Comme le degré de toxicité des nanomatériaux dépend de la taille des particules et des caractéristiques spécifiques supplémentaires, dont la plupart sont énumérées dans le Tableau 16, il est donc essentiel que les essais soient effectués en utilisant le même nanomatériau avec la même composition chimique la même taille et distribution de taille, les mêmes propriétés de surface et le même profil de pureté / impureté que la substance présente dans le dispositif médical. Ainsi, l'information sur la nature et la stabilité de la substance d'essai dans des conditions expérimentales est d'une importance primordiale pour l'interprétation de n'importe quel résultat d'essais. Si un matériau (nano) comparable / similaire est utilisé, cela devrait être justifié et documenté. (SCENIHR, 2015)

Il existe actuellement des progrès dans les méthodes *in vitro*, mais il n'existe actuellement aucune méthode *in vitro* validée pour l'évaluation des risques des nanomatériaux. Cependant, des tests *in vitro* peuvent être utiles pour le dépistage et pour élucider un mode d'action possible, mais leur utilisation doit être évaluée au cas par cas. (SCENIHR, 2015)

Alors que les approches de modélisation *in silico* avancent pour les produits chimiques classiques, une relation entre les diverses propriétés physico-chimiques et les effets toxicologiques des nanomatériaux n'a pas encore été étudiée et établie pour permettre le développement de modèles fiables pour les nanomatériaux. En conséquence, seuls quelques modèles rudimentaires *in silico* sont actuellement disponibles pour les nanomatériaux. Des limitations ont été identifiées pour l'utilisation des techniques QSAR en nanotoxicologie. En outre, les techniques «omics» semblent prometteuses comme une approche

alternative pour les tests de sécurité des dispositifs médicaux et / ou des nanomatériaux à l'avenir. (SCENIHR, 2015)

Cytotoxicité :

L'ISO 10993-5: 2009 décrit les méthodes d'essai pour évaluer la cytotoxicité *in vitro* des dispositifs médicaux. En outre, une norme est actuellement en cours de préparation pour un test de cytotoxicité *in vitro* spécifiquement dédié aux nanomatériaux (ISO / AWI 19007 MTS modifié pour mesurer l'effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire, ISO, Genève, Suisse).

Les tests *in vitro* peuvent indiquer la probabilité de génération d'espèces réactives d'oxygène (Xia et al.2008), ce qui peut fournir une alerte pour les effets toxiques potentiels par l'induction du stress oxydatif et l'activation de voies inflammatoires et prolifératives (Unfried et al .2008, Donaldson et al.2010, 2013b).

Selon le rapport de l'Afssaps (2011), il a été montré que les nanomatériaux à base de carbone pouvaient absorber les molécules du colorant rouge neutre et donner des faux positifs. Dans le test de cytotoxicité au MTT des discordances ont été observées entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par d'autres techniques.

Lors de la réalisation des essais de cytotoxicité, des précautions devront être prises concernant d'éventuelles interférences des nanomatériaux avec les agents colorimétriques et fluorescents.

Toxicité aiguë :

Les tests de toxicité aiguë pour les dispositifs médicaux font partie de la norme ISO 10993-11: 2006 traitant de la détermination de la toxicité systémique des dispositifs médicaux (ISO 2006). D'autres informations sur l'exécution d'un test de toxicité aiguë en plus de ISO 10993-11: 2006 peuvent être trouvées comme suit: pour les tests de toxicité aiguë par voie orale en utilisant la méthode de dose fixe [CE B.1 bis, OCDE 420], la classe de toxicité aiguë Méthode [EC B.1 tris, OCDE 423], ou la procédure ascendante et descendante [OCDE 425]. La méthode de classe toxique aiguë par voie d'inhalation est décrite dans OECD 403 et 436, et le test de toxicité cutanée aiguë *in vivo* est décrit dans EC B.3 et OECD 402 and 404.

Irritation :

L'ISO-10993-10: 2010 décrit les méthodes d'essai pour évaluer le risque d'irritation (et une hypersensibilité de type retardé) des dispositifs médicaux par voie topique. En outre, ISO 10993-10: 2010 décrit les tests d'irritation intradermique pour les dispositifs médicaux utilisés comme implants ou par voie transdermique. Des tests d'irritation spécifiques sont décrits à l'annexe B, y compris un test d'irritation des yeux, un test d'irritation de la muqueuse buccale et des tests d'irritation rectale, pénienne et vaginale.

Pour les produits chimiques, la détermination de l'irritation / corrosivité et de la méthode *in vivo* est utilisée en fonction du test de Draize tel que décrit dans EC B.5 et OECD 405.

Les méthodes alternatives *in vitro* validées suivantes sont disponibles (règlement (CE) no 440/2008) pour l'évaluation de la corrosion cutanée des produits chimiques:

A) Test TER (test de résistance électrique transcutané de peau de rat) [EC B.40, OCDE 430]

B) EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, EST-1000 [CE B.40bis, OCDE 431]

Trois d'entre eux, à savoir EpiSkin™, le test d'irritation de la peau Epiderm™ modifié (SIT) et l'épiderme humain reconstitué SkinEthic™ (RHE) sont validés pour l'évaluation de l'irritation de la peau pour les produits chimiques (OCDE 439).

Aucune validation spécifique des tests alternatifs *in vitro* n'a été effectuée pour les dispositifs médicaux et / ou les nanomatériaux, bien qu'il n'existe aucune base scientifique claire contre l'utilisation de ces méthodes pour les nanomatériaux.

L'évaluation *in vivo* de l'irritation des yeux ou de la corrosivité sur les substances est basée sur le résultat du test d'irritation des yeux classique de Draize *in vivo* sur les lapins selon EC B.5 et la ligne directrice d'essai de l'OCDE 405. Il existe d'autres méthodes disponibles pour remplacer ce test: la perméabilité à l'opacité de la cornée bovine (BCOP – Bovine Cornea Opacity Permeability Test) [OCDE 437], l'œil de poulet isolé (ICE – Isolated Chicken Eye Method) [OCDE 438] et un test cellulaire *in vitro* [OCDE 460]. Ces méthodes sont en mesure de discriminer les irritants et corrosifs, mais ne permettent pas de distinguer les légers des non-irritants.

Ces tests ont été élaborés pour évaluer l'irritation cutanée des substances chimiques. On ignore encore s'ils peuvent également être utilisés pour tester les nanomatériaux. Le test ICE ne convient pas aux échantillons solides. Ces tests peuvent probablement également être utilisées pour les nanomatériaux, mais il n'y a pas de validation à ce jour: ils peuvent fournir des preuves à l'appui.

Il est possible que certains matériaux insolubles sous forme de particules puissent induire une irritation des yeux non seulement chimiquement, mais aussi mécaniquement avec le tissu oculaire ou la cellule.

Hypersensibilité retardée :

L'ISO - 10993-10: 2010 décrit les méthodes d'essai pour évaluer le potentiel d'induire une hypersensibilité de type retardé pour les dispositifs médicaux et leurs composants. Trois méthodes *in vivo* sont décrites, deux utilisant des cobayes et une souris utilisant, pour évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée. Le dosage murin des ganglions lymphatiques locaux (LLNA – Local Lymph Node Assay) dans ses trois versions est la méthode privilégiée concernant le bien-être animal (OCDE 429, 442A et 442B). Les deux autres tests, le test de maximisation de Magnusson Kligman chez le cobaye (GPMT – Guinea Pig Maximisation Test), tel que décrit dans EC B.6, OECD 406 et ISO 10993-10: 2010, et le test Buehler (EC B.6, OECD 406, ISO 10993-10: 2010).

En raison de la surface plus grande des particules, les nanomatériaux peuvent être considérés comme des produits chimiques allergiques potentiels grâce à leur capacité d'adjuvant et à leur formation complexe avec des protéines cellulaires (Larsen et al.2010, Lee et al.2011).

Les tests standards décrits ci-dessus pour la sensibilisation cutanée n'ont pas été spécifiquement évalués pour les nanomatériaux. Il existe une différence significative entre le test LLNA et celui de Buehler qui implique tous deux l'application des composés d'essai (par exemple, les nanomatériaux) à la surface de la peau et le GPMT impliquant une application intradermique. Actuellement, des données expérimentales limitées sont disponibles sur les nanomatériaux testés à l'aide de GPMT. Des résultats négatifs ont été signalés pour le ZnO en utilisant un GPMT modifié avec une application topique sur une peau traitée par FCA (Jang et al.2012, Park et al.2013).

Sur la base des connaissances actuelles, il n'est pas possible de s'appuyer sur l'utilisation d'une méthode d'essai spécifique pour les nanomatériaux. L'utilisation du test LLNA et / ou de Buehler n'entraînera probablement pas de sensibilisation, en raison de la faible pénétration cutanée des nanomatériaux. Compte tenu de l'application intradermique, le GPMT est actuellement le test le plus pertinent pour détecter une éventuelle activité de sensibilisation des nanomatériaux, bien que la phase d'induction intradermique soit suivie d'une phase d'induction topique suivi d'un challenge par voie topique sur peau intacte.

Il est important de noter que ces tests n'indiquent que le risque d'hypersensibilité retardée. Pour une hypersensibilité aiguë médiée par l'immunoglobuline-E, aucun dosage n'est actuellement disponible. Pour certaines nanoformulations en fer après administration intraveineuse, des réponses allergiques systémiques ont été observées comme indiqué dans un rapport d'évaluation par EMA (EMA 2013).

Génotoxicité :

L'ISO 10993-3: 2003 décrit des tests de génotoxicité (de cancérogénicité et de toxicologie de la reproduction). Il convient de noter que pour tous les essais de génotoxicité, il est important d'établir l'exposition des cellules cibles et / ou des organes aux nanomatériaux testés. De plus, outre la génotoxicité directe, d'autres mécanismes de toxicité peuvent également entraîner des dommages à l'ADN et induire indirectement une génotoxicité, notamment une inflammation chronique (Kundu et Surh 2008. Donaldson et al.2011).

Tests de génotoxicité in vitro :

En sélectionnant une batterie appropriée de tests de génotoxicité *in vitro*, les trois paramètres critiques de génotoxicité (mutation du gène, aberrations chromosomiques structurelles et numériques) devraient également être pris en considération pour les nanomatériaux.

Bien qu'un test de mutation inverse bactérienne (test Ames, OCDE 471) soit un test de génotoxicité fiable pour l'analyse de produits chimiques, il ne semble pas être approprié pour l'évaluation des nanomatériaux. Cela pourrait être lié au degré d'absorption par les cellules bactériennes, qui est susceptible d'être inférieur

à celui des cellules humaines pour deux raisons. Tout d'abord, les procaryotes ne peuvent pas effectuer l'endocytose et, d'autre part, leur paroi cellulaire constitue une barrière contre la diffusion simple de nanomatériaux (en particulier ceux sous forme agglomérée) dans la cellule bactérienne - ce manque d'absorption pourrait conduire à des résultats faussement négatifs. Par conséquent, le test d'Ames est peu susceptible d'être un test de dépistage génotoxicité général *in vitro* approprié pour les nanomatériaux. De plus, des modifications devraient être apportées à la technique pour favoriser l'absorption des nanomatériaux par les bactéries du test d'Ames afin de réduire le potentiel de résultats faussement négatifs (Landsiedel et al. 2009, Doak et al., 2012, Magdalenova et al., 2012, 2014).

Les tests *in vitro* suivants semblent être les meilleures options pour tester les nanomatériaux:

- un test d'induction de mutations génique dans des cellules de mammifères (par exemple, le test de lymphome de souris tk et / ou le test de mutation CHO / HGPRT) (OECD 476).
- un test de micronoyau *in vitro* (OCDE 487) ou un test d'aberration chromosomique (OCDE 473).
- un essai de comète *in vitro*.

Il peut y avoir des circonstances dans lesquelles il peut être justifié de s'écarter des tests mentionnés ci-dessus, par exemple lorsqu'il est nécessaire de tester des nanomatériaux dans une matrice qui ne peut pas être ajoutée *in vitro*. Dans de tels cas, une justification scientifique devrait être fournie et/ou des études *in vivo* pourront être nécessaires. Dans certains cas, par exemple un test de mutation inverse bactérienne pourrait encore être informatif pour des nanomatériaux solubles, très petits, induisant des espèces réactives de l'oxygène.

Pour tous les tests *in vitro*, l'absorption du nanomatériau dans les bactéries et les cellules devrait être démontrée pour indiquer une exposition potentielle de l'ADN aux nanomatériaux.

Une précaution est nécessaire avec le test du micronoyau lorsque les nanomatériaux sont testés. La cytochalasine B, qui est souvent utilisée pour inhiber la cytokinèse, peut également inhiber l'endocytose et, par conséquent, peut conduire à des résultats faussement négatifs avec des nanoparticules (Landsiedel et al. 2009 cités par le SCENIHR 2015). Surtout quand la cytochalasine B et les nanomatériaux sont ajoutés simultanément au système de test au début de l'expérience. Cela pourrait être évité en n'ajoutant pas la cytochalasine B simultanément avec les nanomatériaux, mais après le début de l'incubation (par exemple, à 6 heures après l'ajout des nanomatériaux aux cellules).

En outre, pour plusieurs types de nanoparticules (par exemple, le dioxyde de titane, les nanotubes de carbone à paroi multiple), l'évaluation microscopique de l'indice de prolifération des cytokinèses et de l'identification par le micronoyau était assez difficile à des concentrations élevées en raison de la présence abondante de nanomatériaux dans les cellules (Corradi et al. 2012 cités par le SCENIHR 2015). Ce problème pourrait être (en partie) résolu, par exemple, par coloration histologique avec des sondes d'ADN marquées par fluorescence, ce qui réduit le risque d'identifier de faux négatifs des agrégats de nanoparticules sous forme de fragments de micronoyaux dans le test du micronoyau (Magdolenova et

al.2014 cités par le SCENIHR 2015). Dans le test de la comète, il a été démontré que les nanomatériaux testés n'intervenaient pas avec les endonucléases utilisées pour la détection des ruptures d'ADN (Magdolenova et al., 2012 cités par le SCENIHR 2015).

Par ailleurs, il est souvent nécessaire que se produise l'internalisation des nanomatériaux dans les cellules pour observer un effet toxique. La vitesse d'internalisation est très variable, dépendant de la nature du processus et du nanomatériau. S'il faut parfois attendre plusieurs cycles cellulaires, il a été montré que des nanoparticules de nature polysaccharidique pénètrent dans les cellules épithéliales bronchiques humaines en 3 minutes et atteignent un équilibre au bout de 40 minutes. Les protocoles devront donc être adaptés aux cinétiques d'endo et d'exocytose des nano-objets dans le type cellulaire retenu. (Afssaps, 2011).

Tests de génotoxicité in vivo :

À moins qu'il puisse être démontré de manière adéquate que les résultats positifs *in vitro* ne soient pas pertinents pour la situation *in vivo* ou s'il est impossible de tester les nanomatériaux *in vitro*, des tests *in vivo* sont nécessaires (Eastmond et al.2009 cités par le SCENIHR 2015). Des données pertinentes sur la substance sont à prendre en considération, telles que des informations sur la réactivité chimique (qui pourrait prédisposer le site des effets de contact), la biodisponibilité, le métabolisme, la toxicocinétique et toute spécificité d'organe cible.

L'un des tests *in vivo* suivants peut être approprié :

- un test de micronoyau *in vivo* (OCDE 474).
- un test d'aberration chromosomique de moelle osseuse *in vivo* (OCDE 475)
- un test d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifères *in vivo* (OCDE 483)
- essai de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques (OCDE 488)
- test ds comètes *in vivo* (OCDE 489)

Cependant, ces lignes directrices ont été élaborées pour tester les produits chimiques et leur application aux nanomatériaux de part leurs propriétés physico-chimiques distinctes peuvent influencer sérieusement leurs interactions avec l'ADN (Dusinska et al. 2009; Warheit et Donner 2010, Magdalenova et al. 2012, 2014 cités par le SCENIHR 2015). En outre, le test de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales des rongeurs transgéniques a été identifié comme étant adéquat pour détecter des mutations de gènes chimiquement induites avec certaines limitations dans tous les tissus, mais il peut y avoir des limites pratiques lors de l'analyse (ECHA 2012 cités par le SCENIHR 2015).

Hémocompatibilité :

La norme ISO 10993-4: 2002 (et ses amendements 10993-4: 2002 / Amd 1: 2006) s'applique aux dispositifs qui entrent en contact avec le sang circulant. Les dispositifs médicaux qui doivent être évalués pour leur compatibilité avec le sang comprennent des dispositifs de communication externes qui ont un contact indirect avec le sang, des dispositifs communicants directement avec l'extérieur en contact avec le sang circulant et des dispositifs implantés en grande partie ou entièrement dans le système vasculaire.

La plupart des tests d'hémocompatibilité selon ISO 10993-4: 2002 sont basés sur le contact direct entre une surface et un sang total ou des composants du sang. Ainsi, les matériaux avec des nano-structures à leur surface peuvent être évalués directement en utilisant les mêmes méthodes décrites dans la norme ISO 10993-4.

Pour les nanomatériaux en général, il n'existe actuellement aucun test établi. L'un des tests dans la norme ISO 10993-4, le test d'hémolyse, est basé sur le test d'extraits et une suspension de nanoparticules pourrait ainsi être utilisée pour les tests.

Lorsque le contact avec le sang est possible, en particulier pour les nanomatériaux / nanoparticules libres, une interaction potentielle avec des cellules phagocytaires, par exemple, les cellules polymorphonucléaires et les monocytes, doivent être soigneusement étudiés. Les nanoparticules peuvent présenter des propriétés de surface différentes et sous différentes formes agrégées selon le milieu où elles sont suspendues. Ces facteurs sont essentiels pour l'interaction avec les cellules phagocytaires.

Aucune norme n'est actuellement disponible pour l'évaluation de l'interaction des particules et surtout des nanoparticules avec les cellules phagocytaires. Bien que dans de nombreux tests *in vitro*, les macrophages phagocytaires sont utilisés comme cellules cibles. Une façon possible d'évaluer indirectement l'hémocompatibilité des nanomatériaux particuliers consiste à injecter une suspension de nanoparticules dans le système vasculaire et à évaluer la distribution ainsi que les signes locaux et systémiques d'événements indésirables comme les dommages vasculaires, l'activation du complément, l'activation de la coagulation en cascade ou l'activation des plaquettes. Les méthodes pour tester l'activation du complément, la cascade de coagulation et l'activation des plaquettes sont décrites dans la norme ISO 10993-4.

En outre, de nouvelles techniques (par exemple, la microfluidique) peuvent être nécessaires pour évaluer l'interaction des nanoparticules avec des cellules endothéliales et / ou le système vasculaire (Santos-Martinez et al., 2011, Samuel et al., 2012 cités par le SCENIHR 2015).

Toxicité à doses répétées :

L'ISO 10993-11: 2006 concerne les tests relatifs à la toxicité à doses répétées pour les dispositifs médicaux. Les tests de toxicité à doses répétées pour les produits chimiques sont décrits dans diverses lignes directrices de l'OCDE (407, 408, 409, 411, 412, 413, 415, 416, 422, 443, 451, 452, 453).

L'ISO 10993-11: 2006 traite de l'évaluation de la toxicité systémique généralisée, de la toxicité spécifique des organes cibles, même si ces effets peuvent résulter de l'absorption systémique et de la distribution des

substances relarguées par des dispositifs médicaux. Une conception appropriée de l'étude pour l'évaluation des nanomatériaux doit être spécialement adaptée à la nature des nanomatériaux présents dans un dispositif médical et à son application ou à son utilisation clinique.

Dans la mesure du possible, les nanomatériaux dans les dispositifs médicaux devraient être testés sous une forme représentative de leur état "prêt à l'emploi" et appliqués dans les conditions les plus adéquates dans lesquelles ils doivent être utilisés. Les essais devraient être effectués sur les nanomatériaux obtenus à partir du produit final et / ou des composants représentatifs du produit final.

De préférence, les études de toxicité à doses répétées devraient être effectuées en fonction de la localisation de l'exposition potentielle, c'est-à-dire du site de l'utilisation du dispositif médical, et des connaissances sur la toxicocinétique des nanomatériaux libérés. Cependant, pour des raisons pratiques, la plupart des tests de toxicité à doses répétées sont effectués par voie orale. L'administration du matériel d'essai dans les études de toxicité orale *in vivo* pourrait être effectuée en ajoutant les nanomatériaux à l'alimentation animale, à l'eau potable ou par gavage. Dans ce cas, des informations devraient être disponibles sur l'apparition de différences potentielles dans la biodisponibilité du nanomatériau en fonction de la voie d'exposition comme cela a été démontré pour les nanoparticules d'or pour l'administration intratrachéale et intraveineuse (Oberdörster 2010, Semmler-Behnke et al., 2008 cités par le SCENIHR 2015).

Pour l'administration, le nanomatériau doit idéalement être homogénéisé dans la matrice d'alimentation ou dispersé de manière stable et uniforme dans l'eau potable ou dans le véhicule de gavage. La stabilité et les caractéristiques physico-chimiques du nanomatériau dans le véhicule devraient être déterminées. Les interactions possibles avec le véhicule d'administration devraient également être déterminées à l'avance avant de choisir la manière d'exposer les nanomatériaux.

Il peut y avoir des limites sur les quantités de nanomatériaux qui peuvent être administrées, car elles peuvent s'agglomérer dans l'eau potable ou dans le véhicule de gavage, ou elles peuvent déjà être mélangées sous forme de poudre agglomérée dans l'alimentation. L'administration du matériel d'essai nécessite un contrôle minutieux et une caractérisation dynamique des nanomatériaux testés dans le liquide ou dans la matrice d'alimentation. Par exemple, un nanomatériau dans un liquide peut être adsorbé par les parois du récipient de boisson et n'est donc plus disponible.

Pour surmonter certains des obstacles mentionnés ci-dessus, un nanomatériau peut être appliqué par gavage, afin que le nanomatériau soit dispersé, caractérisé et administré dans des conditions bien définies. Cependant, l'application par gavage n'est pas susceptible d'être représentative des concentrations délivrées dans le temps à partir de nanomatériaux administrés via les aliments. Le gavage fournit un bolus du matériel à un moment donné qui peut ou non se mélanger avec les fluides gastro-intestinaux, ce qui pourrait entraîner une concentration locale plus élevée et une quantité accrue de matière absorbée en raison du

nanomatériau sous la forme d'une dose unique et élevée et le manque de co-ingestion de composants alimentaires auxquels le nanomatériau peut facilement se lier.

Dans l'une des administrations orales mentionnées ci-dessus, le passage à travers l'environnement acide de l'estomac et le mélange avec le chyme dans l'intestin peuvent affecter le nanomatériau. La prise en compte du potentiel de dissolution / dégradation dépendante du temps est essentielle, ainsi que des modifications physicochimiques des nanomatériaux telles que l'agglomération et les modifications de surface par les protéines et les biomolécules. Le sort des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal peut être étudié dans des modèles *in vitro* utilisant des fluides simulés ou des systèmes plus complexes (Minekus et al., 1999, Oomen et al., 2004 cités par le SCENIHR 2015) et a également été appliqué aux nanoparticules (Rogers et al., 2012, Peters et al. 2012, Mwilu et al. 2013 cités par le SCENIHR 2015).

Cependant, la disponibilité systémique des nanomatériaux après administration orale peut être limitée. Les études de toxicocinétique initiales pourraient indiquer si l'administration par voie orale est une méthode appropriée pour identifier une toxicité systémique potentielle. D'autres voies pour évaluer la toxicité systémique peuvent également être envisagées (par exemple, administration par voie intraveineuse, sous-cutanée) en fonction de l'utilisation du dispositif médical.

Implantation :

À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes acceptées ou validées pour l'évaluation biologique des nanomatériaux implantés. Cependant, certains conseils peuvent être trouvés dans ISO 19003-6: 2007. Les méthodes d'essai s'appliquent à une large gamme de matériaux tels que les solides non absorbables, absorbables, les non solides tels que des matériaux poreux, des liquides, des gels, des pâtes et des particules.

Les méthodes d'essai peuvent également être appliquées à des dispositifs médicaux qui sont destinés à être utilisés par voie topique dans des indications cliniques lorsque la surface peut avoir été lésée afin d'évaluer les réponses locales aux tissus.

Les effets locaux sont évalués par une comparaison de la réponse tissulaire causée par l'élément d'essai versus par les matériaux de contrôle utilisés dans les dispositifs médicaux dont les caractéristiques d'acceptabilité clinique et de biocompatibilité ont été établies. L'objectif des méthodes d'essai est de caractériser l'évolution de la réponse tissulaire après l'implantation d'un dispositif médical / biomatériau, y compris l'intégration finale ou l'absorption du matériau. En particulier pour les matériaux absorbables, les caractéristiques de dégradation du matériau et la réponse tissulaire résultante devraient être déterminées. Tous les matériaux provoqueront une réponse inflammatoire lorsqu'ils seront implantés. C'est l'étendue et le sérieux de cette réaction inflammatoire locale qui indique si cette réaction doit être considérée comme défavorable. Pour les matériaux non dégradables, un état stable sur la réponse tissulaire est généralement obtenu après 12 semaines, alors que pour les matériaux absorbables cela dépend de la vitesse d'absorption qui peut être plus courte ou bien plus longue que 12 semaines.

L'ISO 10993-6: 2007 relative aux tests d'implantation ne traite pas de la toxicité systémique, de la cancérogénicité, de la tératogénicité ou de la mutagénicité. Cependant, les études d'implantation à long terme destinées à l'évaluation des effets biologiques locaux peuvent donner un aperçu de certaines de ces propriétés. Les études de toxicité systémique menées par implantation (ISO 10993-11: 2006) peuvent satisfaire aux exigences de cette partie de l'ISO 10993-6. Lors de la réalisation d'études combinées pour évaluer les effets locaux et les effets systémiques, les exigences des deux normes doivent être remplies.

On peut raisonnablement s'attendre à ce que la réponse tissulaire aux matériaux d'implants absorbables soit différente de la réponse tissulaire trouvée dans les implants non absorbables (durables). L'hypothèse devrait être celle de l'interaction continue du matériau se dégradant avec le tissu environnant, accompagnée d'une présence continue d'une réponse tissulaire dépendant de la dégradation. Une telle réponse peut varier avec le temps et peut (ou ne pas) être histologiquement détectable en fonction de la composition et de la fabrication des matériaux, du taux de dégradation, du temps après l'implantation et du tissu dans lequel réside l'implant. Cette réponse tissulaire devrait être résolue et la morphologie normale doit être restaurée lorsque le matériau se dégradant est absorbé dans le tissu environnant.

Pour évaluer correctement un implant absorbable et ses produits de dégradation, les réponses tissulaires locales peuvent être évaluées à des intervalles d'étude plus importants et différents que ceux typiques pour les matériaux non absorbables. Les dispositions de l'ISO 10993-6 (Annexe A, Considérations générales concernant les périodes d'implantation et les réponses tissulaires aux matériaux absorbables) s'appliquent également à l'évaluation des effets locaux des matériaux absorbables utilisés comme supports pour la libération de médicaments, échafaudages pour produits médicaux tissés, ou des revêtements de surface pour des implants non absorbables.

Les particules peuvent avoir un effet local sur le site de l'implant mais peuvent également montrer une migration par exemple aux ganglions lymphatiques drainants. Les effets locaux sont limités au site de l'implantation (ou à l'utilisation du dispositif médical) et dépendent de cette localisation. Un exemple d'un tel effet local est l'usure des prothèses articulaires conduisant à une accumulation de particules dans le liquide synovial et les tissus synoviaux. Les effets biologiques sont fortement influencés, que les particules soient déposées dans le tissu sous-cutané, par voie intrapéritonéale ou dans le sang.

Toxicité chronique / cancérogénicité :

L'ISO 10993-3: 2003 décrit des tests de génotoxicité, de cancérogénicité et de toxicité pour la reproduction. La décision d'effectuer un test de cancérogénicité d'une durée de deux ans devrait être justifiée sur la base de l'exposition potentielle résultant de l'utilisation du dispositif médical, des nanomatériaux et / ou de leurs extraits. Les tests *in vivo* pour évaluer le potentiel cancérogène des produits chimiques sont les suivants:

- Test de cancérogénicité [EC B.32, OCDE 451] ;
- Test combiné de toxicité chronique / cancérogénicité [EC B.33, OCDE 453] ;

Cependant aucune indication sur leur adéquation pour les nanoparticules n'a été fournie jusqu'à présent. Par conséquent, l'utilisation de ces tests devrait être évaluée au cas par cas.

Toxicité de la reproduction et de du développement :

Avant de prendre une décision d'effectuer des tests de toxicité pour la reproduction et le développement, les normes ISO 10993-1: 2009 et ISO 10993-3: 2003 devraient être pris en considération.

Il n'y a pas besoin de tests de toxicité pour la reproduction des dispositifs médicaux résorbables ou des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux / nanoparticules libérées s'il existe des données adéquates et rassurantes des études d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME) indiquant que ni l'élément de test ni ses métabolites ne sont distribués et n'atteignent donc pas les organes / les cibles de la reproduction, ou s'il n'y a pas de toxicité pour la reproduction de tous les composants dans des extraits de dispositifs médicaux.

En l'absence de preuve pour exclure les risques de reproduction / développement, les tests devraient être pris en considération. Cela peut inclure des tests sur les dispositifs médicaux suivants contenant des nanomatériaux:

- des dispositifs médicaux à contact prolongé ou permanent susceptibles d'entrer en contact direct avec les tissus reproducteurs, les embryons ou le fœtus ;
- dispositifs médicaux de dépôt d'énergie ;
- résorbable ou contenant des nanomatériaux / nanoparticules relargables.

Si des tests sont nécessaires, il faudrait commencer par l'OCDE 421 (Test de dépistage de la toxicité pour la reproduction / développement) pour fournir des informations initiales sur les effets possibles sur la reproduction et / ou le développement. Si des tests supplémentaires sont jugés nécessaires, ils devraient être effectués conformément à l'OCDE 414 (Étude de toxicité pour le développement prénatal), OCDE 415 (Étude de la toxicité de la reproduction à une génération), OCDE 416 (Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations) ou OCDE 422 (Étude combinée de la toxicité à la dose répétée avec le test de dépistage de la toxicité pour la reproduction / développement), selon le cas. Aucune indication n'est disponible sur l'adéquation de ces tests conçus pour les produits chimiques afin d'évaluer le potentiel de toxicité pour la reproduction des nanoparticules. Par conséquent, l'utilisation de telles méthodologies devrait être évaluée au cas par cas.

Plus récemment, la méthodologie de test OCDE 443 a été publiée sur l'étude de toxicité reproductive dite étendue d'une génération, qui combine plusieurs paramètres, y compris les paramètres de la reproduction et du développement, les paramètres neurodéveloppemental et immunitaire.

Les méthodes d'essais d'embryotoxicité sont susceptibles d'être applicables aux nanomatériaux, à condition que des problèmes spécifiques liés aux nanomatériaux tels que la dispersion / agrégation, l'adsorption, la stabilité et la distribution dans le tissu soient pris en compte. Dans un essai de cellules souches embryonnaires *in vitro*, qui a été utilisé uniquement à des fins de recherche, des effets sur le développement de cardiomyocytes ont été observés pour les nanoparticules de silice (Park et al., 2009).

L'évaluation des effets sur la première génération (F1) ou même la deuxième génération (F2) devrait être effectuée conformément aux normes OCDE 414, OCDE 415, OCDE 416, OCDE 421, OCDE 422 ou OCDE 443. Comme les lignes directrices de l'OCDE n'étaient pas destinées aux nanomatériaux / nanoparticules dans les dispositifs médicaux, les modifications suivantes doivent être envisagées: la dose (dans le cas des dispositifs de dépôt d'énergie), la voie d'application (implant, parentérale, autre), les milieux d'extraction (extraits aqueux et non aqueux) ou le temps d'exposition.

Il n'est pas recommandé d'utiliser des méthodes d'exposition qui, pour une raison quelconque, pourraient affecter le développement prénatal. Par exemple, l'administration intrapéritonéale peut provoquer l'injection directe des nanomatériaux / nanoparticules testés dans l'utérus lui-même ou traverser la paroi de l'utérus et affecter directement les embryons / fœtus en développement. L'exposition par inhalation ne semble pas appropriée pour les femelles gestantes du fait que l'animal est présent dans des conditions contraintes et stressantes, avec un dispositif de retenue assez serré pendant environ 6h / jour sans accès à l'alimentation et à l'eau.

Dans l'étude sur la toxicité pour le développement, il faut prendre conscience de l'exposition possible à la progéniture par le lait maternel (Melnik et al., 2013). La présence et la concentration de nanomatériaux / nanoparticules dans le lait d'animaux en lactation doivent être mesurées.

Phase 4 : Evaluation des risques

Sur la base des expositions possibles, la catégorisation suivante (qui n'est pas destinée à être quantitative) de l'évaluation des risques nécessaire peut être réalisée (

Tableau 20) :

Tableau 20: Cadre pour l'évaluation des risques des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux, selon le SCENIHR (2015)

Release of nanoparticles	Non-invasive		Invasive Lung		Invasive Other	
	Short exposure	Long exposure	Short exposure	Long exposure	Short exposure	Long exposure
Low/insignificant	N/VL*	L/F**	L	F	L	F
Medium	L/F	L/F	L/F	F	L/F	F
High	L/F	L/F	F	F	F	F

*F=full assessment L=limited assessment VL =very limited or N= no further assessment *=limited assessment if it can be shown that penetration/distribution is very limited.*

*** Full assessment when absorption is indicated in toxicokinetic studies*

Dans les cas où la toxicité est induite par le nanomatériau utilisé, une attention particulière doit être accordée à la relation dose-réponse. Les résultats doivent être comparés aux niveaux de particules trouvées dans les organes cibles (exposition interne) pour évaluer le risque. Le risque estimé peut être comparé au risque lié à l'utilisation de dispositifs comparables n'incorporant pas de nanomatériaux et évalué selon la norme ISO 14971: 2007. En plus du risque potentiel estimé, en fin de compte, les avantages potentiels pour le patient devraient être pris en compte dans l'évaluation du risque final.

4.2.2 Au niveau national

4.2.2.1 Base R-Nano :

Un dispositif de déclaration des substances à l'état nanoparticulaire (R-NANO) est entré en vigueur depuis le 1^{er} janvier 2013. Il s'agit d'une spécificité française.

Ce dispositif est applicable à tous les secteurs de l'industrie.

Il permet de déclarer les substances à l'état nanoparticulaire produits, importées, distribuées ou formulées, et ce, conformément aux articles L.523-1 à L.523-5 du Code de l'environnement.

On entend par « substance à l'état nanoparticulaire: substance telle que définie à l'article 3 du règlement (CE) N°1907/2006, fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique, contenant des particules, non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm. »

Chaque fabricant, importateur et distributeur d'une substance à l'état nanoparticulaire, en l'état ou contenue dans un mélange sans y être liée, ou de matériaux destinés à rejeter cette substance dans des conditions

normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation effectuent la déclaration. Le seuil à partir duquel la déclaration est obligatoire sur le site R-NANO concerne une quantité supérieure à 100 grammes/an/substance

4.2.2.2 Au niveau normatif :

Il est noté qu'au niveau normatif, l'AFNOR est en train de réaliser une consultation sur l'ISO/DTR 10993-22 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux sur un guide concernant les nanomatériaux.

L'ISO/TC 194 « Evaluation biologique et clinique des dispositifs médicaux » est en train de préparer un document sur l'évaluation de la sécurité des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux (ISO/TC 10993-22). Ce document, sera un guide pour expliquer comment appliquer la batterie des normes ISO 10993 pour les dispositifs médicaux contenant, générant ou composés de nanomatériaux. (RIVM 2015)

4.2.2.3 Pistes d'amélioration

A ce jour, les autorités compétentes ne disposent pas d'outils adaptés à la surveillance de marché des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux en Europe et en France. En effet, suite à l'interrogation de la fédération des dispositifs médicaux en France (SNITEM), les réponses apportées sont très succinctes.

Concernant la nomenclature des dispositifs médicaux :

Au niveau international, il existe une nomenclature officielle des dispositifs médicaux. Cette nomenclature est gérée par l'agence GMDN (Global Medical Device Nomenclature). Cette nomenclature propose une liste de noms génériques utilisés pour identifier tous les dispositifs médicaux. Elle est utilisée pour faciliter les échanges de données réglementaires entre les autorités compétentes, les organismes notifiés et les fabricants.

Actuellement, après vérification le 10 février 2017 dans la base GMDN, aucun dispositif médical sous forme nanoparticulaire ou comportant des nanomatériaux n'est identifié. La base GMDN est mise à jour en cas de demandes de modifications de la part de ses membres. Ainsi, à titre d'exemple, il existe uniquement dans les « termes proposés » disponibles pour commentaires des membres de la communauté GMDN un terme en cours de commentaires « nanofiber wound dressing, antimicrobial ».

Aussi, l'ANSM précise qu'il est nécessaire de préciser la nomenclature GMDN en ajoutant chaque type de dispositif médical avec des nanomatériaux C'est pourquoi, l'ANSM devrait participer aux travaux du GMDN afin de s'assurer de la création des noms dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux.

Concernant la base R-Nano :

En l'état actuel, les résultats fournis par l'ANSES sur l'extraction de la base R-Nano, n'ont pas pu être exploités. En effet, l'entité déclarante est référencée par son code d'activité économique (code NACE),

sachant qu'une entité peut avoir plusieurs codes. Les activités économiques se réfèrent à l'activité de l'entreprise déclarante et ne correspondent pas nécessairement à l'usage qui est fait de la substance à l'état nanoparticulaire qui fait l'objet de la déclaration. L'usage prévu de la substance est décrit par les descripteurs d'usage.

La description de l'utilisation des substances à l'état nanoparticulaire se base sur 6 types de descripteurs d'utilisation (définis par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) et notamment utilisés dans le cadre de REACH) :

- La catégorie de secteur d'utilisation (SU) ;
- La catégorie de produit chimique (PC) ;
- La catégorie d'article (AC) ;
- La catégorie de processus (PROC) ;
- La catégorie de rejet dans l'environnement (ERC).

Les codes NACE et descripteurs utilisés pour cibler les nanomatériaux pouvant être utilisés pour les médicaments et les dispositifs médicaux, sont les suivants :

- NACE 21.1 : Fabrication de produits pharmaceutiques de bas ;
- NACE 21.2 : Fabrication de préparations pharmaceutiques ;
- NACE 46.6 : Commerce de gros de produits pharmaceutiques ;
- NACE 47.73 : Commerce de détail de produits pharmaceutiques en magasin spécialisés ;
- SU9 : Fabrication de substances chimiques fines ;
- SU10 : Formulation de préparations et/ou reconditionnement ;
- PC29 : Produits pharmaceutiques.

Il est à noter que même si certains fabricants de DM peuvent utiliser le code 21, il n'est pas impossible que de nombreux fabricants de DM se positionnent sur d'autres codes, tels que les codes suivants :

- NACE 20 : industrie chimique ;
- NACE 22 : fabrication de produits en caoutchouc et en plastique ;
- NACE 26 : fabrication de produits informatiques, électronique et optiques ;
- NACE 25 : fabrication de produits métalliques, à l'exception des machines et des équipements ;
- NACE 13 : fabrication de textiles ;
- NACE 86 : Activités pour la santé humaine.

Il ressort que le domaine des dispositifs médicaux est extrêmement mal identifié. Il n'existe pas de code NACE regroupant les dispositifs médicaux.

L'ANSM considère qu'il conviendrait d'améliorer les modalités de déclaration dans la base R-Nano soit en ajoutant un code NACE spécifiques aux dispositifs médicaux, soit en identifiant exactement les catégories

des dispositifs médicaux. Cette mise en oeuvre pourrait se faire sur la nomenclature GMDN afin d'avoir une nomenclature des dispositifs médicaux harmonisée.

Concernant la réglementation :

Le règlement relatif aux dispositifs médicaux prévoit à l'Annexe I « Exigences générales en matière de sécurité et de performances », Chapitre III « Exigences relatives aux informations fournies avec le dispositif », partie 23.2 r) un étiquetage qualitatif et quantitatif des composants principaux « dans le cas des dispositifs qui sont composés de substances ou de combinaisons de substances qui sont destinées à être introduites dans le corps humain par un orifice du corps ou par application sur la peau et qui sont absorbées par le corps humain ou dispersées localement dans celui-ci, la composition qualitative globale du dispositif et des informations quantitatives sur le ou les composants principaux permettant d'obtenir l'action principale voulue ».

Enfin, le règlement (UE) n° 2017/745 relatif aux dispositifs médicaux adopté le 05 avril 2017 prévoit un étiquetage qualitatif et quantitatif des composants principaux. Plusieurs dispositions, à l'annexe I du présent règlement, visent notamment à diminuer les risques liés à la présence de certaines substances ou particules lors de la conception ou la fabrication des dispositifs médicaux. En outre, des conditions particulières d'étiquetage sont également prévues (annexe I. 10.4.1). En complément, l'ANSM recommande à la commission européenne de les compléter afin de pouvoir identifier sur l'étiquetage, les nanomatériaux utilisés dans tous les types de dispositifs médicaux, en lien avec les orientations du comité scientifique auquel elle a donné mandat.

Concernant les outils techniques pour évaluer la sécurité des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux :

Seul le SCENIHR (2015) propose un document guide relatif à l'évaluation du risque des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Cependant, cette démarche présentée précédemment appelle certaines remarques.

Il est en effet indispensable comme le préconise le SCENIHR de réaliser une caractérisation physico-chimique du ou des nanomatériaux ou nanoparticules contenus dans le dispositif médical en identifiant chacun des paramètres énoncés au Tableau 16.

Phase 1 : L'évaluation du relargage des nanomatériaux relargués soit directement par le dispositif médical, soit en raison de l'usure du dispositif lors de son utilisation, afin de caractériser l'exposition systémique de l'homme doit être réalisée. Le

Tableau 18 du SCENIHR indique l'estimation de l'exposition aux nanomatériaux en fonction du type de dispositif médical et de son temps de contact pour 4 types d'application pour les nanomatériaux :

- libre,
- fixés faiblement,

- fixés fortement,
- intégrés dans du matériel dégradable,
- intégrés dans du matériel non dégradable.

L'estimation de l'exposition propose les niveaux suivants :

- H : élevé (high) ;
- M : moyen (medium) ;
- L : faible (low) ;
- N : négligeable (negligible) ;
- NA : non applicable (not applicable).

Dans le cas où le nanomatériau est complètement intégré à un dispositif non dégradable, il sera probablement nécessaire d'envisager une usure potentielle résultant de la libération de particules. Les effets locaux potentiels du dispositif incorporant des nanomatériaux devraient être pris en considération.

Pour les nanoparticules relarguées, il est nécessaire d'identifier leurs quantités et leurs natures, leurs taux de libération et les facteurs susceptibles d'influencer leur libération. Il est à noter que les essais de relargage sont à réaliser dans les conditions les plus défavorables possibles.

Le SCENIHR propose que si à la suite de ces études, il est conclu que, même dans les conditions d'utilisation les plus défavorables réalistes, la libération des particules ne se produit pas ou sera négligeable, une évaluation ultérieure peut être limitée principalement à l'étude des réactions locales. Dans le cas présent, l'ANSM, souhaite plutôt retenir uniquement le cas où la libération des nanoparticules est inexistante, en effet, le SCENIHR ne fournit aucune indication permettant d'estimer quantitativement une libération négligeable.

Il est à noter que le raisonnement permettant d'établir les doubles expositions proposées n'est pas fourni (exemple : H/N, M/L, H/H, ...). De plus, aucune estimation quantitative des nanomatériaux relargués n'est proposée. En conséquence, comparer un niveau négligeable *versus* faible *versus* moyen *versus* élevé est très approximatif, évaluateur dépendant et pouvant susciter des débats entre fabricants et autorités de contrôle par exemple, dans le cadre d'une surveillance de marché.

En l'espèce, l'ANSM estime que l'utilisation du tableau 18 n'est pas adaptée à une évaluation biologique des risques des nanomatériaux relargués. Néanmoins les paramètres concernant les types de dispositifs médicaux, de type et de durée de contact ainsi que les 4 applications possibles des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux peuvent être conservés pour une description adaptée de l'exposition. L'ANSM souhaite intituler cette phase 1 « Estimation des nanomatériaux libérés ».

L'objectif de la phase 2 est de déterminer la répartition des nanomatériaux libérés et leur potentiel de persistance. Pour toutes les nanoparticules ou nanomatériaux relargués, des études de toxicocinétique

préconisées par le SCENIHR devraient être réalisées. Cependant, comme indiqué précédemment, les essais existant notamment à l'OCDE ou dans les normes ISO 10993, ne sont pas forcément validés pour les nanomatériaux. Une évaluation au cas par cas est à réaliser.

Selon le SCENIHR, s'il est conclu qu'il est peu probable que les particules puissent entrer dans la circulation systémique, même dans des conditions réalistes d'utilisation, alors seul un protocole de test de toxicité très limité est nécessaire, et se limiterait aux effets locaux au niveau du site de contact. L'ANSM souhaite attirer l'attention que ce cas ne pourrait s'appliquer uniquement si aucune distribution des particules n'est identifiée.

L'ANSM souhaite intituler cette phase 2 « Toxicocinétique des nanoparticules et persistance ».

Phase 3 : Le SCENIHR fournit un

Tableau 19 fixant le cadre d'évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Les tests proposés sont fonction d'une part de l'estimation du niveau d'exposition des nanomatériaux libérés du dispositif : faible exposition, exposition moyenne, exposition élevée et d'autre part du temps de contact (court terme / long terme) et de l'invasivité du dispositif.

Ce tableau se base sur l'estimation du taux de nanoparticules libéré. Comme indiqué précédemment, le SCENIHR ne fournit aucune estimation quantitative des nanomatériaux relargués, en proposant des taux précisant ce qui est sous-entendu entre exposition faible, moyenne ou élevée. En conséquence, estimer un niveau d'exposition des particules est très approximatif, évaluateur dépendant et peut susciter des débats entre fabricants et autorités de contrôle par exemple, dans le cadre d'une surveillance de marché.

De plus, dans la phase 1, il était indiqué que l'exposition s'articulait notamment autour de différents types de contact tissulaire et 3 temps de contact (limitée, prolongée et permanent), comme indiqué par la norme ISO 10993-1. Ici, le

Tableau **19** ne reprend que deux types de temps de contact (court terme, long terme) et deux types de contact (invasif, non invasif). Bien que le SCENIHR indique que ce

Tableau **19** ne doit pas être considéré comme une liste d'essais à réaliser mais doit être considéré comme un guide conformément à l'ISO 10993-1, il n'est pas fourni d'explication par le SCENIHR indiquant une possible articulation entre le tableau de l'Annexe A de l'ISO 10933-1 et ce

Tableau 19.

Par ailleurs, actuellement au niveau normatif il existe des travaux sur l'ISO 10993-22 concernant l'évaluation biologique des dispositifs médicaux – guide sur les nanomatériaux, lancée par l'ISO/TC 194 sur l'évaluation biologique et clinique des dispositifs médicaux. Cependant l'ANSM ne possède aucune visibilité sur les textes en cours de l'élaboration car l'ANSM ne participe plus aux travaux normatifs.

Concernant les tests de biocompatibilité existant, ils sont à considérer au cas par cas car ils ne sont pas forcément adaptés à l'évaluation des nanomatériaux. À l'avenir, à mesure que la connaissance des propriétés des nanomatériaux s'améliorera, il sera possible de prédire la nature, la distribution, les niveaux tissulaires et la persistance potentielle des particules, mais il est peu probable que cela soit possible dans un proche avenir.

L'utilisation du

Tableau **19** en tant qu'outil d'évaluation du risque mériterait des explications plus poussées de la part du SCENIHR pour savoir si ce tableau se substitue ou non au tableau de l'Annexe A de l'ISO 10993-1.

L'établissement de ce nouveau cadre d'élaboration des essais de biocompatibilité ne peut se faire qu'au niveau normatif international ou européen. Au niveau national, ce travail devrait se réaliser au sein d'un groupe d'experts pour produire de façon collégiale un programme d'évaluation de la biocompatibilité spécifique aux dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.

L'ANSM souhaite intituler cette phase 3 « Essais de biocompatibilité ».

Phase 4 : Le

Tableau **20** du SCENIHR fournit un cadre concernant l'évaluation des risques des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux. Cette évaluation des risques est réalisée d'une part en fonction du taux de libération des nanoparticules (faible/insignifiant, moyen, élevé) et d'autre part en fonction du site et du temps de contact. Ici dans tableau, à la différence du

Tableau 19, trois sites de contact sont indiqués : non invasif, invasif poumon, invasif autre. Comme précédemment, deux temps de contact sont indiqués : exposition courte terme ou long terme. Enfin, l'évaluation du risque est définie de la sorte :

- F : évaluation complète (full assessment) ;
- VL : très limité (very limited) ;
- N : aucune autre évaluation (no further assessment).

Ce

Tableau 20 fournit une nouvelle dichotomie du niveau d'exposition en différenciant les poumons des autres organes. Il est légitime de s'interroger pourquoi cette différence est réalisée à ce niveau de l'arbre décisionnel et n'est pas proposée depuis de le début de la phase 1.

En outre, le SCENIHR ne fournit aucune explication pour déterminer ce qu'il sous-entend derrière une évaluation complète, très limitée ou aucune évaluation. Par conséquent l'utilisation de ce tableau reste à ce jour assez flou.

Le SCENIHR indique que le risque estimé devrait être comparé au risque résultant de l'utilisation de dispositifs comparables qui ne contiennent pas de nanomatériaux pour juger l'acceptabilité du risque. En plus du risque potentiel estimé, le bénéfice potentiel pour le patient devrait également être pris en compte dans l'évaluation finale des risques.

L'utilisation du

Tableau 20 en tant qu'outil pour évaluer le risque final mériterait des explications plus poussées de la part du SCENIHR pour connaître :

- d'une part l'articulation entre les 3 sites d'exposition exprimés dans le tableau 5 *versus* les autres niveaux d'exposition précédemment exprimés,
- d'autre part, sa définition d'une évaluation complète, très limitée ou aucune évaluation.

4.2.3 Conclusion sur les pistes d'amélioration

En conclusion, au vu des commentaires suscités, le logigramme proposé par le SCENIHR et repris dans ce rapport pourrait être ajusté et modifié de la façon suivante :

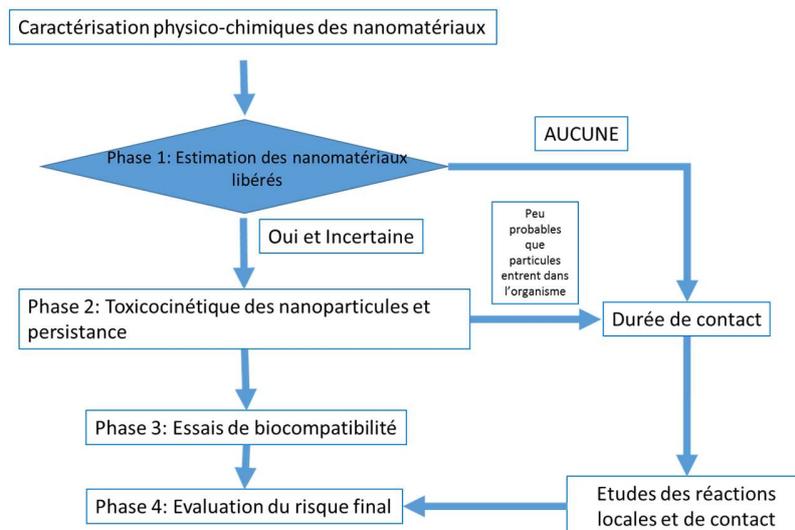


Figure 10: Proposition d'évaluation du risque des nanomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux suite à la lecture critique de l'avis du SCENIHR (2015) par l'ANSM

Le risque potentiel dû à l'utilisation de nanomatériaux dans les dispositifs médicaux est principalement associé à la possibilité de libérer des nanoparticules libres du dispositif et à la durée de l'exposition. La libération potentielle dépend de la méthode d'utilisation des nanomatériaux, en tant que nanomatériaux libres, nanomatériaux fixés sur des surfaces ou des nanomatériaux intégrés dans une matrice. En plus de la libération de particules et des effets potentiels de ces particules, les effets locaux possibles sur le site d'application devraient également être pris en considération. Il est important de noter que l'usure d'un dispositif médical peut entraîner la génération de nanoparticules même lorsque le dispositif médical ne contient pas de nanomatériaux.

De nombreuses informations sont déjà disponibles, en particulier sur les problèmes potentiels associés aux tests de sécurité des nanomatériaux. L'utilisation de nanomatériaux nécessite des considérations spécifiques. Cependant, actuellement, il est noté un manque de recul pour juger du bénéfice accru par l'apport des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux au regard des risques encourus.

Ainsi, à la lumière des connaissances actuelles, une approche cas par cas est nécessaire pour l'évaluation des risques des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. En effet, aucune méthode d'essai actuellement disponible n'a été validée spécifiquement pour les nanomatériaux. L'application de tels tests devra se faire au cas par cas avec une adaptation particulière aux spécificités des nanomatériaux.

Les outils proposés par le SCENIHR (2015) mériteraient des explications complémentaires sur leur utilisation et leur articulation avec la norme ISO 10993-1. Un positionnement de l'ANSM sur l'évaluation du risque des dispositifs contenant des nanomatériaux devra être tout d'abord défini comme un sujet prioritaire et réalisé au sein d'un groupe d'experts spécialisés. Ces experts devront être spécialisés en nanomatériaux et toxicologie afin de pouvoir échanger sur la lecture critique de l'ANSM sur l'avis du SCENIHR et d'établir un document guide pour l'évaluation des risques des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux.

Il est noté un fort besoin de normalisation internationale des méthodes d'évaluation du risque potentiel des nanomatériaux dans les dispositifs médicaux. La présence de l'ANSM à l'ISO/ AFNOR dans l'élaboration des normes de biocompatibilité en général et notamment de la norme relative aux nanomatériaux devrait être envisagée.

L'ANSM indique qu'il est nécessaire de préciser la nomenclature GMDN en ajoutant chaque type de dispositif médical avec des nanomatériaux. C'est pourquoi, l'ANSM devrait participer aux travaux du GMDN afin de s'assurer de la création des noms dispositifs médicaux incorporant des nanomatériaux. L'ANSM considère que soit améliorer les modalités de déclaration dans la base R-Nano soit en ajoutant un code NACE spécifiques aux dispositifs médicaux, soit en identifiant exactement les catégories des dispositifs médicaux. Cette implémentation pourrait se faire sur la nomenclature GMDN afin d'avoir une nomenclature des dispositifs médicaux harmonisée.

A ce jour, le document du SCENIHR a le mérite d'identifier les risques liés aux nanomatériaux et de sensibiliser les différentes parties prenantes telles que les fabricants et les autorités compétentes. Cependant, la plupart des outils proposés dans ce document guide ne sont pas à ce jour exploitables pratiquement par les opérateurs.

5 Bibliographie

Afssaps Evaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux – Rapport Scientifique. Agence Française de Sécurité Sanitaires des Produits de Santé. (2011)

Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S. & Khuller, G. K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 409–416 (2006).

Ahmad, Z., Zahoor, A., Sharma, S. & Khuller, G. K. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 298–303 (2005).

Ahola, M. S. et al. In vitro release of heparin from silica xerogels. *Biomaterials* 22, 2163–2170 (2001).

Ai, J. et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine* 6, 1117–1127 (2011).

Aillon, K. L. et al. Iodinated NanoClusters as an inhaled CT contrast agent for lung visualization. *Mol Pharm* 7, 1274–1282 (2010).

Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 12, 2313–2333 (2010).

Amato, G. Silica-Encapsulated Efficient and Stable Si Quantum Dots with High Biocompatibility. *Nanoscale Res Lett* 5, 1156–1160 (2010).

Annaka, M. et al. Fluorescence Study on the Swelling Behavior of Comb-Type Grafted Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels. *Macromolecules* 35, 8173–8179 (2002).

Anses. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux Enjeux et mise à jour des connaissances. (2014).

Anses. Mise à jour des connaissances sur « l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux nanoparticules d'argent ». (2015).

Arsawang, U. et al. How do carbon nanotubes serve as carriers for gemcitabine transport in a drug delivery system? *J. Mol. Graph. Model.* 29, 591–596 (2011).

Ashok, B., Arleth, L., Hjelm, R. P., Rubinstein, I. & Onyüksel, H. In vitro characterization of PEGylated phospholipid micelles for improved drug solubilization: effects of PEG chain length and PC incorporation. *J Pharm Sci* 93, 2476–2487 (2004).

Aynié, I., Vauthier, C., Chacun, H., Fattal, E. & Couvreur, P. Spongelike alginate nanoparticles as a new

potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9, 301–312 (1999).

Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S. & Kankane, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 33, 1088–1118 (2008).

Balogh, L. et al. Significant effect of size on the *in vivo* biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. *Nanomedicine* 3, 281–296 (2007).

Bartczak, D. et al. Interactions of Human Endothelial Cells with Gold Nanoparticles of Different Morphologies. *Small* 8, 122–130 (2012).

Beg, S. et al. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 141–163 (2011).

Bhirde, A. A. et al. Distribution and clearance of PEG-single-walled carbon nanotube cancer drug delivery vehicles in mice. *Nanomedicine (Lond)* 5, 1535–1546 (2010).

Cai, W. & Chen, X. Nanoplatforms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small* 3, 1840–1854 (2007).

Cai, W. et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* 6, 669–676 (2006).

Carrié, D. Évolution technologique des stents coronaires : où en est-on ? *AMC Pratique* n°230 (2014)

Chen, F., Zhou, J., Luo, F., Mohammed, A.-B. & Zhang, X.-L. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 743–748 (2007).

Chen, G. et al. Fibrinogen clot induced by gold-nanoparticle *in vitro*. *J Nanosci Nanotechnol* 11, 74–81 (2011).

Chen, J.-P., Yang, P.-C., Ma, Y.-H. & Wu, T. Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for *in situ* delivery of tissue plasminogen activator. *Carbohydrate Polymers* 84, 364–372 (2011).

Chen, Z. et al. Adsorption behavior of epirubicin hydrochloride on carboxylated carbon nanotubes. *Int J Pharm* 405, 153–161 (2011).

Cho, M. et al. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 189, 177–183 (2009).

- Cho, W.-S.** et al. *Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles.* *Toxicol. Lett.* 175, 24–33 (2007).
- Choi, K. H.** et al. *Photosensitizer and vancomycin-conjugated novel multifunctional magnetic particles as photoinactivation agents for selective killing of pathogenic bacteria.* *Chemical communications (Cambridge, England)* 48, 4591–4593 (2012).
- Choi, S. K.** et al. *Dendrimer-based multivalent vancomycin nanoplatfor for targeting the drug-resistant bacterial surface.* *ACS Nano* 7, 214–228 (2013).
- Chomoucka, J.** et al. *Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering.* *Pharmacol. Res.* 62, 144–149 (2010).
- Chrai, S. S.,** Murari, R. & Ahmad, I. *Liposomes (a review)--part two: Drug delivery systems.* *Biopharm International* (2002).
- Chrastina, A.** & Schnitzer, J. E. *Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging.* *Int J Nanomedicine* 5, 653–659 (2010).
- Constantinescu, I.,** Levin, E. & Gyongyossy-Issa, M. *Liposomes and blood cells: a flow cytometric study.* *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31, 395–424 (2003).
- Cullis, Chonn,** & Semple, *Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo.* *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32, 3–17 (1998).
- Czarnobaj, K.** *Preparation and characterization of silica xerogels as carriers for drugs.* *Drug Deliv* 15, 485–492 (2008).
- Czarnobaj, K.** & Czarnobaj, J. *Sol-gel processed porous silica carriers for the controlled release of diclofenac diethylamine.* *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 87, 114–120 (2008).
- Czarnobaj, K.** & Lukasiak, J. *In vitro release of cisplatin from sol-gel processed organically modified silica xerogels.* *J Mater Sci Mater Med* 18, 2041–2044 (2007).
- Dams, E. T.** et al. *Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 1071–1079 (2000).
- deKrafft, K. E.** et al. *Iodinated nanoscale coordination polymers as potential contrast agents for computed tomography.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 9901–9904 (2009).
- Di Crescenzo, A.,** Velluto, D., Hubbell, J. A. & Fontana, A. *Biocompatible dispersions of carbon nanotubes:*

- a potential tool for intracellular transport of anticancer drugs. *Nanoscale* 3, 925–928 (2011).
- Dillen, K. et al.** Adhesion of PLGA or Eudragit/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. *Int J Pharm* 349, 234–240 (2008).
- Di Pasqua, A. J., Wallner, S., Kerwood, D. J. & Dabrowiak, J. C.** Adsorption of the Pt(II) anticancer drug carboplatin by mesoporous silica. *Chem. Biodivers.* 6, 1343–1349 (2009).
- Díez-Peña, E., Quijada-Garrido, I. & Barrales-Rienda, J. M.** On the water swelling behaviour of poly(*N*-isopropylacrylamide) [P(*N*-iPAAm)], poly(methacrylic acid) [P(MAA)], their random copolymers and sequential interpenetrating polymer networks (IPNs). *Polymer* 43, 4341–4348 (2002).
- Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E.** Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2, 469–478 (2007).
- Dobrovolskaia, M. A. et al.** Dendrimer-induced leukocyte procoagulant activity depends on particle size and surface charge. *Nanomedicine (Lond)* 7, 245–256 (2012).
- Dobrovolskaia, M. A. et al.** Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets *in vitro*. *Mol. Pharm.* 9, 382–393 (2012).
- Dobrovolskaia, M. A. et al.** Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine* 5, 106–117 (2009).
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A. & Tabrizian, M.** Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 115, 354–361 (2006).
- Duan, N. et al.** Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). *J. Agric. Food Chem.* 61, 3229–3234 (2013).
- Duncan, R. & Izzo, L.** Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2215–2237 (2005).
- Dung, T. H. et al.** Chitosan-TPP nanoparticle as a release system of antisense oligonucleotide in the oral environment. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 3695–3699 (2007).
- Durán, N. et al.** Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine* 12, 789–799 (2016).
- Duvvuri, S., Majumdar, S. & Mitra, A. K.** Drug delivery to the retina: challenges and opportunities. *Expert Opin Biol Ther* 3, 45–56 (2003).

- Eckelman, W. C., Reba, R. C. & Kelloff, G. J.** Targeted imaging: an important biomarker for understanding disease progression in the era of personalized medicine. *Drug Discov. Today* 13, 748–759 (2008).
- Ehmann, F. et al.** Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond)* 8, 849–856 (2013).
- Elrod, D. B., Partha, R., Danila, D., Casscells, S. W. & Conyers, J. L.** An iodinated liposomal computed tomographic contrast agent prepared from a diiodophosphatidylcholine lipid. *Nanomedicine* 5, 42–45 (2009).
- EMA.** REFLECTION PAPER ON NANOTECHNOLOGY-BASED MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. *Nanotechnology Commercialization for Managers and Scientists* 237 (2012).
- EMA.** Data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001408.jsp&mid=WC0b01ac05806403e0.
- EMA.** Data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001410.jsp&mid=WC0b01ac05806403e0.
- EMA.** Development of block-copolymer-micelle medicinal products. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001411.jsp&mid=WC0b01ac05806403e0.
- EMA.** European Medicines Agency - Medicines and emerging science - Nanotechnology. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&.
- EMA.** Surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001409.jsp&mid=WC0b01ac05806403e0.
- Eom, H.-J. & Choi, J.** Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B.

Toxicol In Vitro 23, 1326–1332 (2009).

Fan, Y. F., Wang, Y. N., Fan, Y. G. & Ma, J. B. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *International Journal of Pharmaceutics* 324, 158–167 (2006).

Farokhzad, O. C. et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6315–6320 (2006).

FDA. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Available at: <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>.

Fidalgo, A., Lopez, T. M. & Ilharco, L. M. Wet sol–gel silica matrices as delivery devices for phenytoin. *J Sol-Gel Sci Technol* 49, 320–328 (2009).

Figuerola, A., Di Corato, R., Manna, L. & Pellegrino, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol. Res.* 62, 126–143 (2010).

Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44, 65–73 (2005).

Geroski, D. H. & Edelhauser, H. F. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 961–964 (2000).

Greish, K. et al. Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology* 6, 713–723 (2012).

Gu, H., Ho, P. L., Tong, E., Wang, L. & Xu, B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett.* 3, 1261–1263 (2003).

Guan, J., Hong, Y., Ma, Z. & Wagner, W. R. Protein-Reactive, Thermoresponsive Copolymers with High Flexibility and Biodegradability. *Biomacromolecules* 9, 1283–1292 (2008).

Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995–4021 (2005).

Gupta, S., Samanta, M. K. & Raichur, A. M. Dual-drug delivery system based on in situ gel-forming nanosuspension of forskolin to enhance antiglaucoma efficacy. *AAPS PharmSciTech* 11, 322–335

(2010).

Gutermann, L., Roy, S. & Bégué, T. *Substituts osseux synthétiques : quelles spécificités ? Journal de Pharmacie Clinique* 32, 79–87 (2013).

Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. *Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. Br J Radiol* 79, 248–253 (2006).

HAS Révision de Catégories homogènes de dispositifs médicaux – Substituts osseux- Rapport d'évaluation. Haute Autorité de Santé (Mai 2013)

Hasan, A. et al. *Micro and nanotechnologies in heart valve tissue engineering. Biomaterials* 103, 278–292 (2016).

Hashizume, H. et al. *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am. J. Pathol.* 156, 1363–1380 (2000).

Hatefi, A. & Amsden, B. *Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. J Control Release* 80, 9–28 (2002).

He, Q. et al. *A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug delivery system for overcoming multi-drug resistance. Biomaterials* 32, 7711–7720 (2011).

Herold, D. M., Das, I. J., Stobbe, C. C., Iyer, R. V. & Chapman, J. D. *Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. Int. J. Radiat. Biol.* 76, 1357–1364 (2000).

Herth, M. M. et al. *Radioactive labeling of defined HPMA-based polymeric structures using [18F]FETos for in vivo imaging by positron emission tomography. Biomacromolecules* 10, 1697–1703 (2009).

Holopainen, J., Santala, E., Heikkilä, M. & Ritala, M. *Electrospinning of calcium carbonate fibers and their conversion to nanocrystalline hydroxyapatite. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 45, 469–476 (2014).

Hong, H., Zhang, Y., Sun, J. & Cai, W. *Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. Nano Today* 4, 399–413 (2009).

Hong, S. et al. *Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. Bioconjug. Chem.* 15, 774–782 (2004).

Hyafil, F. et al. *Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. Nat Med* 13, 636–641 (2007).

ICPEES, Institut de chimie et de Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé :
<http://icpees.unistra.fr>

Inserm, Fiche thématique « Réparer l'os » (**Novembre 2016**)

Ishida, T., Harashima, H. & Kiwada, H. Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. *Curr. Drug Metab.* 2, 397–409 (**2001**).

Ishida, T. et al. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 112, 15–25 (**2006**).

Ishida, T. & Kiwada, H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm* 354, 56–62 (**2008**).

Ishida, T. et al. Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int J Pharm* 255, 167–174 (**2003**).

Jacobs, C. & Müller, R. H. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm. Res.* 19, 189–194 (**2002**).

Jagetia, G. C. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 301–320 (**2007**).

Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L. & Labhasetwar, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.* 5, 316–327 (**2008**).

Jeong, B., Bae, Y. H., Lee, D. S. & Kim, S. W. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 388, 860–862 (**1997**).

Jia, G. et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1378–1383 (**2005**).

Jones, C. F. et al. Cationic PAMAM dendrimers disrupt key platelet functions. *Mol. Pharm.* 9, 1599–1611 (**2012**).

Juliano, R. L., Hsu, M. J., Peterson, D., Regen, S. L. & Singh, A. Interactions of conventional or photopolymerized liposomes with platelets in vitro. *Exp. Cell Res.* 146, 422–427 (**1983**).

Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. & Alakhov, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 82, 189–212 (**2002**).

Kakizawa, Y., Harada, A. & Kataoka, K. Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles

composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA. *Biomacromolecules* 2, 491–497 (2001).

Kale, S. N. et al. Characterization of biocompatible NiCo₂O₄ nanoparticles for applications in hyperthermia and drug delivery. *Nanomedicine* 8, 452–459 (2012).

Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. & Möller, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1726–1732 (2008).

Kassem, M. A., Abdel Rahman, A. A., Ghorab, M. M., Ahmed, M. B. & Khalil, R. M. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm* 340, 126–133 (2007).

Kattumuri, V. et al. Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies. *Small* 3, 333–341 (2007).

Kaur, I. P. & Kanwar, M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Dev Ind Pharm* 28, 473–493 (2002).

Keister, J. C., Cooper, E. R., Missel, P. J., Lang, J. C. & Hager, D. F. Limits on Optimizing Ocular Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 80, 50–53 (1991).

Kempe, M. et al. The use of magnetite nanoparticles for implant-assisted magnetic drug targeting in thrombolytic therapy. *Biomaterials* 31, 9499–9510 (2010).

Kenawy, E.-R., Worley, S. D. & Broughton, R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 8, 1359–1384 (2007).

Kim, D., Park, S., Lee, J. H., Jeong, Y. Y. & Jon, S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7661–7665 (2007).

Kim, S. C. et al. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J Control Release* 72, 191–202 (2001).

Kim, S., Kim, J.-H., Jeon, O., Kwon, I. C. & Park, K. Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 71, 420–430 (2009).

Kim, T.-W., Slowing, I. I., Chung, P.-W. & Lin, V. S.-Y. Ordered mesoporous polymer-silica hybrid nanoparticles as vehicles for the intracellular controlled release of macromolecules. *ACS Nano* 5,

360–366 (2011).

Kobayashi, H. & Brechbiel, M. W. Dendrimer-based nanosized MRI contrast agents. *Curr Pharm Biotechnol* 5, 539–549 (2004).

Koevary, S. B. Pharmacokinetics of topical ocular drug delivery: potential uses for the treatment of diseases of the posterior segment and beyond. *Curr. Drug Metab.* 4, 213–222 (2003).

Kojima, C., Regino, C., Umeda, Y., Kobayashi, H. & Kono, K. Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics* 383, 293–296 (2010).

Koo, O. M., Rubinstein, I. & Onyuksel, H. Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: a novel nanomedicine. *Nanomedicine* 1, 77–84 (2005).

Kweon, S. et al. Liposomes coloaded with iopamidol/lipiodol as a RES-targeted contrast agent for computed tomography imaging. *Pharm. Res.* 27, 1408–1415 (2010).

Kwon, G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 20, 357–403 (2003).

Lam, C.-W., James, J. T., McCluskey, R. & Hunter, R. L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77, 126–134 (2004).

Laurent, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 108, 2064–2110 (2008).

Laverman, et al. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 37, 225–235 (1999).

Leaper, D. Appropriate use of silver dressings in wounds: international consensus document. *Int Wound J* 9, 461–464 (2012).

Lee, E. S., Na, K. & Bae, Y. H. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J Control Release* 91, 103–113 (2003).

Lehr, C.-M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. & Junginger, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 78, 43–48 (1992).

Li, H. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control*

Release 133, 238–244 (2009).

Li, Y. et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation* 3, 95–104 (2015).

Li, Z., Su, K., Cheng, B. & Deng, Y. Organically modified MCM-type material preparation and its usage in controlled amoxicillin delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* 342, 607–613 (2010).

Lin, H.-H. & Cheng, Y.-L. In-Situ Thermoreversible Gelation of Block and Star Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(N-isopropylacrylamide) of Varying Architectures. *Macromolecules* 34, 3710–3715 (2001).

Lin, W., Huang, Y., Zhou, X.-D. & Ma, Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 252–259 (2006).

Liu, L. et al. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nat Nano* 4, 457–463 (2009).

Liu, T. et al. Surface biomimetic modification with laminin-loaded heparin/poly-L-lysine nanoparticles for improving the biocompatibility. *Materials Science and Engineering: C* 71, 929–936 (2017).

Liu, X. & Sun, J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kappaB pathways. *Biomaterials* 31, 8198–8209 (2010).

Liu, Z. et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nano* 2, 47–52 (2007).

Luo, G. et al. LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors. *Int J Pharm* 385, 150–156 (2010).

Maîtrise orthopédique : <http://www.maitrise-orthopedique.com/articles/tout-ce-que-vous-vouliez-savoir-sur-les-substituts-osseux-175>

Malik, N. et al. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release* 65, 133–148 (2000).

Mathur, V., Satrawala, Y. & Rajput, M. S. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm* 4, (2014).

Maurel B. Resténose intra-stent : évaluation de nouvelles thérapeutiques in vivo et élaboration d'un modèle in vivo hémodynamique. HAL Archives ouvertes. (2012).

Maurici, D. et al. Amifostine (WR2721) restores transcriptional activity of specific p53 mutant proteins in a yeast functional assay. *Oncogene* 20, 3533–3540 (2001).

Mayer, A. et al. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology* 258, 139–147 (2009).

McDowell, G., Slevin, M. & Krupinski, J. Nanotechnology for the treatment of coronary in stent restenosis: a clinical perspective. *Vasc Cell* 3, 8 (2011).

McGinty, S., Vo, T. T. N., Meere, M., McKee, S. & McCormick, C. Some design considerations for polymer-free drug-eluting stents: a mathematical approach. *Acta Biomater* 18, 213–225 (2015).

Meng, X. et al. Magnetic CoPt nanoparticles as MRI contrast agent for transplanted neural stem cells detection. *Nanoscale* 3, 977–984 (2011).

Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53, 283–318 (2001).

Moghimi, S. M. & Szabeni, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* 42, 463–478 (2003).

Monteiro-Riviere, N. A., Nemanich, R. J., Inman, A. O., Wang, Y. Y. & Riviere, J. E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 155, 377–384 (2005).

Mukundan, S. et al. A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice. *AJR Am J Roentgenol* 186, 300–307 (2006).

Muller, J. et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221–231 (2005).

Müller, R. H., Gohla, S. & Keck, C. M. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 78, 1–9 (2011).

Nehoff, H., Parayath, N. N., Domanovitch, L., Taurin, S. & Greish, K. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int J Nanomedicine* 9, 2539–2555 (2014).

Nel, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater* 8, 543–

557 (2009).

Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M. & von Rechenberg, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293, 483–496 (2005).

Nune, S. K. et al. Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin Drug Deliv* 6, 1175–1194 (2009).

Ohya, Y., Takei, T., Kobayashi, H. & Ouchi, T. Release behaviour of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition. *J Microencapsul* 10, 1–9 (1993).

Oku, N. & Namba, Y. Long-circulating liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11, 231–270 (1994).

Önyüksel, H., Ikezaki, H., Patel, M., Gao, X. & Rubinstein, I. A Novel Formulation of VIP in Sterically Stabilized Micelles Amplifies Vasodilation In Vivo. *Pharm Res* 16, 155–160 (1999).

Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307, 93–102 (2006).

Pamujula, S. et al. Radioprotection in mice following oral delivery of amifostine nanoparticles. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 251–257 (2005).

Pan, D. et al. Detecting vascular biosignatures with a colloidal, radio-opaque polymeric nanoparticle. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15522–15527 (2009).

Pan, Y. et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* 249, 139–147 (2002).

Pandey, R., Ahmad, Z., Sharma, S. & Khuller, G. K. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. *Int J Pharm* 301, 268–276 (2005).

Pandey, R. & Khuller, G. K. Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. *Indian J. Exp. Biol.* 44, 357–366 (2006).

Park, E.-J. & Park, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* 184, 18–25 (2009).

Pawar, V. K., Singh, Y., Meher, J. G., Gupta, S. & Chourasia, M. K. Engineered nanocrystal technology: in-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release* 183, 51–66 (2014).

Poland, C. A. et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like

pathogenicity in a pilot study. *Nat Nano* 3, 423–428 (2008).

Popovici, R. F., Seftel, E. M., Mihai, G. D., Popovici, E. & Voicu, V. A. Controlled drug delivery system based on ordered mesoporous silica matrices of captopril as angiotensin-converting enzyme inhibitor drug. *J Pharm Sci* 100, 704–714 (2011).

Poste, G., Papahadjopoulos, D. & Vail, W. J. Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. *Methods Cell Biol.* 14, 33–71 (1976).

Prokopowicz, M. Synthesis and in vitro characterization of freeze-dried doxorubicin-loaded silica xerogels. *J Sol-Gel Sci Technol* 53, 525–533 (2010).

Qi, G., Li, L., Yu, F. & Wang, H. Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 5, 10874–10881 (2013).

Qiao, R., Yang, C. & Gao, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.* 19, 6274–6293 (2009).

Rabin, O., Manuel Perez, J., Grimm, J., Wojtkiewicz, G. & Weissleder, R. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat Mater* 5, 118–122 (2006).

Radomski, A. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 146, 882–893 (2005).

Ragaseema, V. M., Unnikrishnan, S., Kalliyana Krishnan, V. & Krishnan, L. K. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-protected silver nanoparticle coated surfaces. *Biomaterials* 33, 3083–3092 (2012).

Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F. & Couvreur, P. Development of a new drug carrier made from alginate. *J Pharm Sci* 82, 912–917 (1993).

Reis, C. P., Ribeiro, A. J., Houg, S., Veiga, F. & Neufeld, R. J. Nanoparticulate delivery system for, insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30, 392–397 (2007).

RIVM Nanotechnologies in medical devices. RIVM report 2015-0149, R.E. Geertsma et al. National Institute for Public Health and the Environment. (2015)

Sapra, P. & Allen, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* 42, 439–462 (2003).

Sarmiento, B., Ribeiro, A. J., Veiga, F., Ferreira, D. C. & Neufeld, R. J. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J Nanosci Nanotechnol* 7, 2833–2841 (2007).

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F. & Ferreira, D. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomed. Chromatogr.* 20, 898–903 (2006).

Sawant, R. R. & Torchilin, V. P. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J* 14, 303–315 (2012).

Sayed, F. N., Jayakumar, O. D., Sudakar, C., Naik, R. & Tyagi, A. K. Possible weak ferromagnetism in pure and M (Mn, Cu, Co, Fe and Tb) doped NiGa₂O₄ nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 11, 3363–3369 (2011).

Sayes, C. M. et al. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol. Lett.* 161, 135–142 (2006).

SCENIHR Opinion on Nanosilver : safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. (2014)

SCENIHR Guidance on the determination of potential Health Effects of nanomaterials used in medical devices. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. (2015)

Sengel, C. Delivery of Nanoparticles for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Global Journal of Obesity, Diabetes and Metabolic Syndrome* 2, 018–021 (2015).

Senior, J. H. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3, 123–193 (1987).

Shrivastava, S. et al. Characterization of Antiplatelet Properties of Silver Nanoparticles. *ACS Nano* 3, 1357–1364 (2009).

Shuai, X., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S. & Gao, J. Micellar carriers based on block copolymers of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *J Control Release* 98,

415–426 (2004).

Shutava, T. G. & Lvov, Y. M. Nano-engineered Microcapsules of Tannic Acid and Chitosan for Protein Encapsulation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6, 1655–1661 (2006).

Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Giri, S. & Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Adv. Funct. Mater.* 17, 1225–1236 (2007).

Smolensky, E. D., Park, H.-Y. E., Berquó, T. S. & Pierre, V. C. Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications - effect of anchoring group and ligand exchange protocol. *Contrast Media Mol Imaging* 6, 189–199 (2011).

Sussman, E. M., Jayanti, P., Dair, B. J. & Casey, B. J. Assessment of total silver and silver nanoparticle extraction from medical devices. *Food Chem. Toxicol.* 85, 10–19 (2015).

Szebeni, J. & Barenholz, Y. Adverse immune effects of liposomes: complement activation, immunogenicity and immune suppression. *Harnessing Biomaterials for Nanomedicine: Preparation, Toxicity and Applications*, ed PS Publishing (Singapore: Pan Stanford Publishing) 1–19 (2009).

Szebeni, J. & Moghimi, S. M. Liposome triggering of innate immune responses: a perspective on benefits and adverse reactions. *J Liposome Res* 19, 85–90 (2009).

Tada, H., Higuchi, H., Wanatabe, T. M. & Ohuchi, N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res.* 67, 1138–1144 (2007).

Tomalia, D. A. & Fréchet, J. M. J. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective*. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 40, 2719–2728 (2002).

Torchilin, V. P. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 235–252 (2002).

Torchilin, V. P. et al. New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. *J Pharm Sci* 84, 1049–1053 (1995).

Tripisciano, C., Costa, S., Kalenczuk, R. J. & Borowiak-Palen, E. Cisplatin filled multiwalled carbon nanotubes – a novel molecular hybrid of anticancer drug container. *Eur. Phys. J. B* 75, 141–146 (2010).

Ulrich, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci. Rep.* 22, 129–150 (2002).

- Urtti, A.** et al. Controlled drug delivery devices for experimental ocular studies with timolol 2. Ocular and systemic absorption in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 61, 241–249 (1990).
- US EPA,** O. Nanotechnology White Paper. Available at: <https://www.epa.gov/osa/nanotechnology-white-paper>.
- Varga, I.,** Gilányi, T., Mészáros, R., Filipcsei, G. & Zrínyi, M. Effect of Cross-Link Density on the Internal Structure of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels. *J. Phys. Chem. B* 105, 9071–9076 (2001).
- Vasir, J. K.,** Reddy, M. K. & Labhasetwar, V. D. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience* 1, 47–64 (2005).
- Vega-Villa, K. R.** et al. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 929–938 (2008).
- Vonarbourg, A.,** Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27, 4356–4373 (2006).
- Wang, Y.-J.** et al. The use of polymer-based nanoparticles and nanostructured materials in treatment and diagnosis of cardiovascular diseases: Recent advances and emerging designs. *Progress in Polymer Science* 57, 153–178 (2016).
- Waters, K. M.** et al. Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. *Toxicol. Sci.* 107, 553–569 (2009).
- Westedt, U.** et al. Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *J Control Release* 119, 41–51 (2007).
- Willis, & Forssen,** Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 249–271 (1998).
- Yi, Y.-M.,** Yang, T.-Y. & Pan, W.-M. Preparation and distribution of 5-fluorouracil (125I) sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles. *World J. Gastroenterol.* 5, 57–60 (1999).
- Yin, R.-X.,** Yang, D.-Z. & Wu, J.-Z. Nanoparticle Drug- and Gene-eluting Stents for the Prevention and Treatment of Coronary Restenosis. *Theranostics* 4, 175–200 (2014).
- Zhang, B.** et al. Characterization of and biomolecule immobilization on the biocompatible multi-walled carbon nanotubes generated by functionalization with polyamidoamine dendrimers. *Colloids Surf B Biointerfaces* 80, 18–25 (2010).
- Zhu, M.-T.** et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 247, 102–111 (2008).