

ETUDE MULTIPARAMETRIQUE DE LA BIO-TOXICITE ET BIO-DISTRIBUTION DES NANOPARTICULES AGuIX® SUR DES MODELES INNOVANTS DE CULTURES 3D MUCILAIR™ ET ONCOCILAIR™

PF.03-CHEC

Delphine Boudard^{1,2}, Lucie Sancey³, Odile Sabido^{1,2}, Zhiguo He^{2,4}, Fabien Rossetti⁵, Alain Guignandon^{2,6}, Valérie Bin^{1,2}, Jean-Luc Coll³, Michèle Cottier^{1,2}, François Lux^{5,7}, Olivier Tillement^{5,7}, Samuel Constant^{8,9}, Christophe Mas⁹

¹Inserm U1059 SAINBIOSE, équipe DVH/PIB, Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, Saint Etienne, France

²Université de Lyon, Saint-Etienne, France

³INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France

⁴BIGC EA2521, Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, Saint Etienne, France

⁵CNRS UMR5306, Université Lyon 1, Institut Lumière Matière, Lyon, France

⁶Inserm U1059 SAINBIOSE, équipe LBTO, Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, Saint Etienne, France

⁷INH Therapeutics, Meylan, France

⁸Epithelix SARL, Genève, Suisse

⁹OncoTheis SARL, Genève, Suisse

Contact : delphine.boudard@univ-st-etienne.fr

Les auteurs remercient l'Agence Nationale pour la Recherche pour son financement ANR MULTIMAGE.

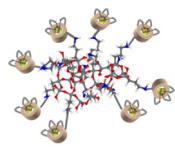


Introduction

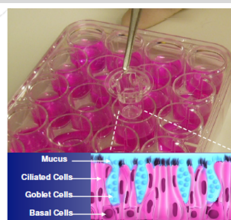
L'utilisation de nouveaux agents radio-sensibilisants de haut numéro atomique tels que le Gadolinium ($Z = 64$) offre un potentiel thérapeutique prometteur, afin d'augmenter l'efficacité de l'irradiation dans la zone tumorale, tout en limitant la dose locale administrée et les effets délétères sur le tissu sain environnant. Les nanoparticules (NPs) dites théranostiques de Gadolinium AGuIX® se caractérisent par une double compétence, en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie nucléaire mais aussi molécule radiosensibilisante dont il est crucial d'évaluer la cytotoxicité, ainsi que leur comportement cellulaire *in vitro* et *in vivo*, dans un contexte de pathologie cancéreuse, ici de tumeurs broncho-pulmonaires.

Nous avons réalisé une étude *in vitro* en utilisant deux modèles innovants de culture 3D représentatifs de l'épithélium respiratoire humain : modèle sain MucilAir™ (Epithelix) ayant une capacité fonctionnelle de production en mucus, versus un modèle homologue tumoral OncoCilAir™ (OncoTheis). Ces inserts de cultures ont été exposés aux NPs AGuIX® par des dépôts liquides en solution saline directement sur la surface apicale ou par le milieu de culture contenu dans le compartiment basal. Enfin, le potentiel radiosensibilisant de ces NPs AGuIX® a été investigué à l'aide du modèle OncoCilAir™, après irradiation en présence ou non des nanoparticules.

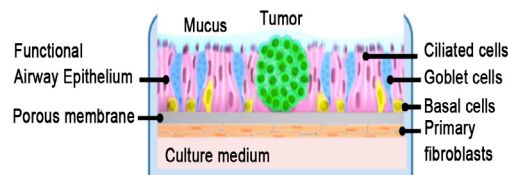
Matériel et Méthodes



NPs AGuIX®
Matrice de polysiloxane sur laquelle sont greffés des chélates de gadolinium (Φ 3 nm, 10 kDa)
Institut Lumière Matière, UMR5306, UCB Lyon1-CNRS



Modèle MucilAir™



Modèle OncoCilAir™ intégrant des cellules tumorales A549-tagGFP dans l'épithélium respiratoire

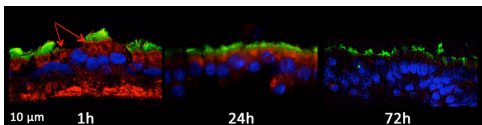
- 1) Expositions par le compartiment apical après lavage ou non du mucus sécrété, versus basal de l'insert (cultures MucilAir™) :
- Doses de 1 ou 10 mM d'AGuIX® brutes ou conjuguées FITC, Rhodamine ou Cy5.5, selon les paramètres étudiés
- Contacts de 24h, avec suivi du signal AGuIX® à T72h après lavage
- 2) Irradiation à 4 vs 6 Gy sur les cultures OncoCilAir™ +/- AGuIX®, puis suivi du % de surface tumorale et de la mort cellulaire

Analyse multiparamétrique par fluorimétrie, cytométrie, microscopie et ICP de :

- Bio-toxicité avec morphologie cellulaire, relargage de la LDH, sécrétion d'IL8 et stress oxydant (ROS), mesures de la Papp (perméabilité apparente)
- Caractéristiques fonctionnelles avec suivi de la résistance trans-épithéliale (TEER), fréquence du battement ciliaire et clairance mucociliaire
- Bio-distribution (internalisation) globale et selon l'expression du marqueur CLCA1

Résultats

MucilAir™

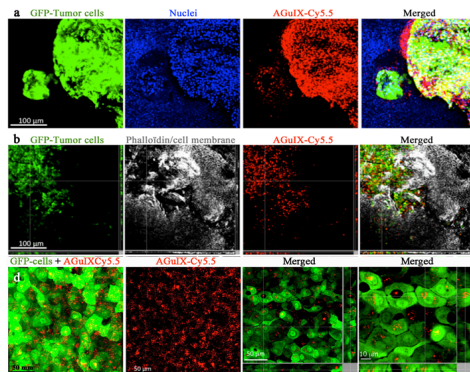


Internalisation rapide et passage transcellulaire des NPs observées en microscopie confocale : AGuIX-Rhodamine – Tubuline (cils) – noyau

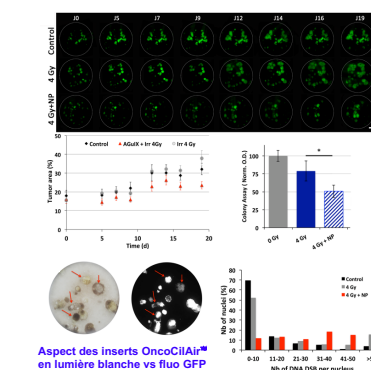
OncoCilAir™

		Healthy GFP-negative cells	GFP+ tumor cells	GFP- tumor cells
% AGuIX® cells (mean $\pm$ SD) (MFI $\pm$ SD)	24 hours	40 $\pm$ 13%	83 $\pm$ 6%	83 $\pm$ 10%
		6284 $\pm$ 3283	17670 $\pm$ 6412*	15336 $\pm$ 4773*
Relative uptake ratio (from MFI values)	72 hours	44 $\pm$ 6%	73 $\pm$ 12%	71 $\pm$ 16%
		4640 $\pm$ 926	11133 $\pm$ 4845*	11502 $\pm$ 5388*
72h/24h relative uptake ratio		0.77	0.65	0.76

Evaluation cytométrique de l'internalisation des AGuIX® dans le modèle OncoCilAir™ en discriminant les cellules saines des cellules tumorales (% de cellules AGuIX+ versus valeurs MFI), et en établissant un ratio relatif d'uptake. Persistance du signal AGuIX® à T72h.



Ciblage tumoral après 24h de contact avec les NPs sur les inserts de cultures OncoCilAir™ - A549-GFP – noyauux – Phalloïdine (architecture cellulaire). Internalisation des AGuIX® sous forme de vésicules cytoplasmiques qui sont parfois observables avec une disposition agglomérée péri-nucléaire, pouvant expliquer leur action radiosensibilisante.



Potentiel radiosensibilisant des NPs évalué sur le modèle OncoCilAir™ après irradiation à 4 Gy +/- AGuIX®. En présence des NPs, l'effet de l'irradiation est potentialisé avec une réduction $\approx$ 20% de la surface tumorale, une diminution de la viabilité des cellules tumorales A549 associée à un taux de cassures de l'ADN significativement augmenté.

Conclusion

Les NPs AGuIX® sont dépourvues de toxicité et capables de cibler préférentiellement les cellules tumorales, en l'absence d'une fonctionnalisation spécifique de surface ou d'un effet EPR / Enhanced Permeability Retention tel qui l'a été décrit *in vivo*. L'internalisation dans l'épithélium respiratoire sain est limitée et transitoire, avec un uptake plus important dans les cellules ciliées par rapport aux cellules calciformes. Par contre au niveau des cellules tumorales du modèle OncoCilAir™, le niveau d'internalisation dans les A549 peut atteindre 90% avec une intensité presque 3 fois plus élevée que dans les cellules épithéliales AGuIX+. La présence des zones tumorales semble induire un uptake plus important des AGuIX® dans le tissu sain environnant par rapport à MucilAir™, du fait d'une diminution de l'intégrité épithéliale (TEER, Papp). Cette étude a permis aussi de conforter le potentiel radiosensibilisant de ces NPs AGuIX®, et d'une perspective prometteuse d'administration localisée par aérosolisation en dose unique, compte-tenu de la rétention tumorale des AGuIX®. Enfin, ces cultures humaines 3D MucilAir™ et OncoCilAir™ constituent des modèles *in vitro* de pointe qui s'avèrent particulièrement bien adaptés pour des investigations nanotoxicologiques et pré-cliniques en thérapie ciblée.