



Samir DEKALI **Ghislaine LACROIX**

COOPÉRATION CELLULAIRE ET RÔLE DU RÉCEPTEUR P2X₇ DANS L'INFLAMMATION PULMONAIRE INDUITE PAR LES NANOPARTICULES

Références

- [1] Yazdi AS., Guarda G., Riteau N., Drexler SK., Tardivel A., Couillin I., et al. 2010. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (45):19449–19454.
- [2] Dekali S., Divetain A., Kortulewski T., Vanbaelinghem J., Gamez C., Rogerieux F., Lacroix G., Rat P. Cell cooperation and role of the P2X₇ receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles *Nanotoxicology*, 2013, 7 (8): p. 1302-1314

Le développement très important des nanotechnologies, et donc la production à un niveau industriel de matériaux manufacturés à l'échelle nanométrique, impliquent des probabilités d'exposition de plus en plus élevées, avant tout chez les travailleurs concernés, mais également pour le grand public. De par leur petite taille (< 100 nm), le premier risque d'exposition aux nanoparticules (NPs) est lié à la pénétration par voie pulmonaire (inhalation) mais les données toxicologiques sur les NPs sont encore incomplètes à ce jour.

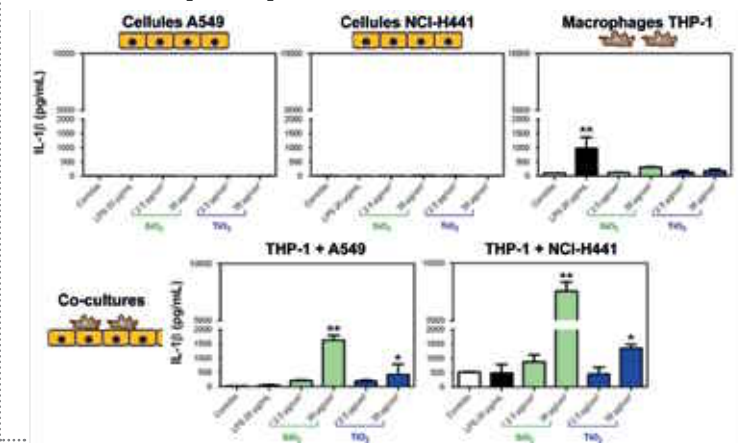
Les études menées *in vitro* sont, pour des considérations éthiques et économiques, une alternative indispensable à l'approche *in vivo*. Bien que les modèles de toxicité *in vitro*, isolés de leur microenvironnement *in vivo*, ne puissent pas remplacer complètement les études *in vivo*, ils permettent, par leur simplicité, d'appréhender plus facilement les mécanismes d'action des toxiques. L'avantage des méthodes *in vitro* pour l'évaluation de

la dangerosité des nanomatériaux est donc de fournir des outils de dépistage de toxicité plus simples, plus rapides et moins coûteux que l'approche *in vivo*.

Depuis quelques années, se sont développés des modèles cellulaires plus élaborés que la simple monocouche cellulaire, dans le but de recréer une partie des interactions cellulaires et moléculaires se produisant au sein des organismes vivants. Au niveau pulmonaire, les macrophages alvéolaires jouent un rôle clé lors des processus inflammatoires, notamment grâce à leur fonction de phagocytose. Les NPs non phagocytées par les macrophages peuvent entrer en contact avec les cellules épithéliales alvéolaires, induire une inflammation et attirer d'autres macrophages alvéolaires au niveau du site de dépôt. Les mécanismes de coopération cellulaire lors de ces phénomènes inflammatoires qui jouent un rôle prépondérant dans la toxicité des NPs *in vivo*, sont peu connus à ce jour.

Figure 1

Sécrétion d'IL-1β par les mono et les co-cultures en réponse à une exposition à des NPs de TiO₂ ou SiO₂



Macrophages and alveolar epithelial cells are the first targets of inhaled nanoparticles (NPs) reaching the alveoli. Mono- or co-cultures of lung epithelial (A549 or NCI-H441) and macrophage (THP-1) cell lines were used to study the cell cooperation and the involvement of the P2X₇ cell death receptor during the inflammation caused by SiO₂ and TiO₂ NPs. Here we show that secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-8) in response to NP exposure was higher in co-cultures than in mono-cultures. A functional P2X₇ receptor was found in all the cell lines studied. Its involvement in IL-1 β secretion in co-cultures was demonstrated using a specific antagonist, the brilliant blue G. Furthermore, mono and co-cultures exhibited distinct secretion patterns of pro-inflammatory cytokines in response to NP exposure and we provide the first evidence that the P2X₇ receptor is involved in the inflammation triggered by SiO₂ and TiO₂ NPs, by increasing IL-1 β secretion, and likely via the inflammasome pathway. Altogether, our data indicate that cell co-cultures used in this study represent valid models to study the inflammatory mechanisms of NPs within the alveoli.

Les objectifs de ce travail ont été :

1. de concevoir un modèle représentatif de l'environnement alvéolaire, composé des deux types cellulaires exposés en première ligne après inhalation de composés exogènes: les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires;
 2. d'étudier la réponse inflammatoire de cette co-culture en réponse à des NPs de dioxyde de titane et de silice et de la comparer à celle obtenue sur les cellules épithéliales et les macrophages cultivés seuls (mono-cultures);
 3. d'approfondir les mécanismes d'action conduisant à cette réponse inflammatoire le cas échéant.
- La co-culture a été développée sur lignées cellulaires humaines: des cellules épithéliales pulmonaires A549 ou NCI-H441 sur lesquelles ont été déposés des macrophages de la lignée monocyttaire THP-1 préalablement différenciés. La réponse inflammatoire a été évaluée par dosage de 4 cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) dans les milieux de culture.

Résultats

Les résultats ont montré qu'une exposition de 6 heures à des NPs de SiO₂ et de TiO₂ induisait une diminution de la viabilité des macrophages en monoculture, alors qu'aucune cytotoxicité n'était observée au niveau des co-cultures ou des cellules épithéliales seules. Généralement, les sécrétions de cytokines ont été significativement plus importantes dans les milieux de culture des co-cultures, en particulier pour l'IL-1 β , qui a montré un fort pic de sécrétion quelle que soit la NP étudiée, alors qu'aucune sécrétion n'était significative pour les cellules cultivées seules [Figure 1](#).

Sachant que la voie de l'inflammasome Nlrp3 avait récemment été identifiée *in vitro* comme impliquée dans l'inflammation liée à une exposition aux NPs de SiO₂ et de TiO₂ [1] et que l'activation de cette voie conduit à la sécrétion d'IL-1 β , l'objectif était de déterminer si le récepteur P2X₇, acteur clé de cette voie, était impliqué dans l'augmentation de

la sécrétion d'IL-1 β au niveau des cultures suite à l'exposition aux NPs.

La présence de ce récepteur et sa fonctionnalité ont été mises en évidence sur toutes les lignées cellulaires étudiées. Pour savoir si la présence du récepteur P2X₇ fonctionnel sur les cellules était reliée à la sécrétion d'IL-1 β par les co-cultures, les cellules ont été pré-incubées avec un antagoniste spécifique du récepteur P2X₇: le bleu de Coomassie (BBG) avant d'être exposées aux NPs de SiO₂ et de TiO₂. Il a été observé une déplétion de la sécrétion d'IL-1 β des co-cultures pré-incubées, comparativement aux cellules non pré-incubées [Figure 2](#). Ces résultats soulignent l'importance de la coopération cellulaire lors de l'inflammation causée par les NPs de SiO₂ et de TiO₂ et démontrent l'implication du récepteur P2X₇ dans ce phénomène [2]. Les co-cultures cellulaires représentent donc des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes pro-inflammatoires induits par les NPs au niveau de la barrière alvéolaire.

Figure 2

Rôle du récepteur P2X₇ dans la sécrétion d'IL-1 β par les co-cultures

