

Quelles voies de réponse au stress en présence de nanoparticules et quelles conséquences?

Laurence VERNIS | laurence.vernis-beringue@curie.fr

Inserm, UMR3348 CNRS/Institut Curie, Orsay

Mots clés : Nanoparticules, peroxyredoxine, réponse cellulaire au stress, transcription, stress oxydant

De nombreuses études ont montré que la présence de polluants dans l'environnement cellulaire provoque du stress oxydant, attesté par la présence de biomarqueurs tels que des protéines, des lipides ou encore des acides nucléiques oxydés qui peuvent être repérés dans le plasma, ou les tissus analysés. Le stress oxydant est une altération de l'homéostasie rédox cellulaire*, et se caractérise par un déséquilibre des espèces réactives de l'oxygène (ROS) cellulaires. Le niveau de ROS intracellulaire est très contrôlé par des systèmes enzymatiques d'une part (peroxyredoxines*, thioredoxines, catalase, etc...) et non-enzymatiques d'autre part (GSH*, NAD*, ...). L'activité de protéines contenant des thiols sensibles est une réponse à l'oxydation. En cas de stress oxydant important, les niveaux de ROS sont tels que la capacité antioxydante des cellules peut être saturée ; les macromolécules s'oxydent et des mutations sur l'ADN sont susceptibles d'être induites. La mort cellulaire ou la cancérisation des cellules peuvent éventuellement survenir. Les deux articles présentés dans cette note montrent que l'homéostasie rédox peut être altérée par la présence de nanoparticules, bien que celles-ci soient utilisées à des doses subtoxiques.

Dans le premier article, les auteurs montrent que les nanoparticules de titane (TiO₂) modifient spécifiquement la réponse transcriptionnelle, et notamment la voie de réponse au stress impliquant les peroxyredoxines. Les auteurs proposent que des complexes protéines-nanoparticules soient à l'origine de cette réponse.

Dans le deuxième article, les auteurs s'intéressent aux réponses adaptatives de cellules exposées à des nanoparticules de silice (SiO₂). Ils montrent aussi l'existence d'une altération importante de l'homéostasie rédox, ainsi que l'activation d'une voie de réponse au stress oxydant, connue jusqu'ici pour être induite en absence de glucose.

Les nanoparticules de TiO₂ altèrent l'expression des gènes antioxydants peroxyredoxines.

Runa S. et al. (2016). TiO₂ Nanoparticles Alter the Expression of Peroxyredoxin Antioxidant Genes. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol.120 (37) : p 20736–20742

Résumé

Les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) sont couramment utilisées dans les procédés industriels à des niveaux de plus en plus élevés. Parmi les travaux relatifs à l'évaluation de leur toxicité, peu de données concernent les réponses cellulaires à des concentrations inférieures aux valeurs cytotoxiques. Ce travail traite de la réponse transcriptionnelle induite par la présence de nanoparticules, pour 84 gènes sélectionnés en lien avec le stress oxydant. Les auteurs ont utilisé à la fois des puces à ADN dédiées, et validé leurs résultats par western blot. Ils indiquent que quatre membres de la famille des peroxyredoxines (Prxs) présentent une expression altérée en présence de nanoparticules de TiO₂ de façon spécifique, puisque des billes de polystyrène de taille et de charge comparable ne provoquent aucun effet. L'adsorption de protéines de sérum à la surface des nanoparticules de TiO₂ montre un effet protecteur et réduit la cytotoxicité, relativement à une même dose de nanoparticules non couvertes de protéines. Les auteurs concluent que les complexes protéines-nanoparticules de TiO₂ induisent une réponse spécifique au stress oxydant et plus largement, soulignent l'importance

d'étudier la réponse aux faibles doses de nanoparticules, qui n'induisent pas de cytotoxicité, mais engendrent des réponses cellulaires plus subtiles.

Commentaire

Ce travail montre l'intérêt d'étudier les réponses cellulaires aux nanoparticules à des doses subtoxiques, qui sont les doses auxquelles nos organismes sont réellement exposés. Il montre que les particules de TiO₂ interfèrent avec les réponses anti-oxydantes des cellules au niveau transcriptionnel. Ce résultat permet de cerner avec précision quelles voies de résistance au stress oxydant sont mises en jeu. Si les résultats obtenus sont comparables dans les deux lignées cellulaires utilisées, les cellules Hela* et des cellules épithéliales de rein de singe, il serait intéressant d'élargir le nombre de types cellulaires, notamment aux cellules présentes dans les muqueuses digestive et respiratoire, car elles sont directement exposées aux nanoparticules. De la même façon, l'analyse de la réponse neuronale à la présence de TiO₂ est importante à évaluer, puisqu'il est désormais connu que ces nanoparticules traversent et altèrent la barrière hématoencéphalique (1).

Les auteurs observent une réponse variable en fonction du nombre de passages en culture de ces cellules. S'il est difficile d'imaginer à quoi comparer un nombre de passages en culture dans un organisme entier, il reste intéressant de noter qu'un même type cellulaire peut moduler l'expression de ses Prxs dans un sens ou dans l'autre, selon peut-être son état physiologique, son âge, etc. Il est donc possible

d'imaginer différents effets selon l'état ou la nature des individus exposés. Afin de mettre en évidence le rôle des Prxs dans cette réponse, il aurait également été intéressant d'exposer aux nanoparticules de TiO₂ des cellules dont l'expression des Prxs a été préalablement diminuée. La mort de ces cellules permettrait de démontrer le rôle protecteur des Prxs en présence de TiO₂.

Enfin, les Prxs sont largement impliquées dans la réponse rédox, mais également dans d'autres voies de signalisation : signalisation apoptotique chez certaines souris modèles de la maladie de Parkinson (2), contrôle de la migration cellulaire de fibroblastes (3). Il serait donc important d'évaluer l'effet à long terme d'une activation continue des Prxs, liée à la présence de nanoparticules, notamment vis-à-vis de la prolifération cellulaire, et l'éventuelle tumorigénèse des cellules.

L'activation transcriptionnelle de la follistatine par Nrf2 protège les cellules pulmonaires contre le stress oxydant induit par exposition aux nanoparticules de dioxyde de silice.

Lin C. et al. (2016). Transcriptional activation of follistatin by Nrf2 protects pulmonary epithelial cells against silica nanoparticle-induced oxidative stress. *Sci Rep*, vol.6: p.21133.

Résumé

Les nanoparticules de dioxyde de silice (SiO₂) avec une taille inférieure à 100 nm pour au moins l'une des trois dimensions, et génèrent du stress oxydant au niveau des voies respiratoires après inhalation. Même si les cellules mettent en place des réponses adaptatives qui permettent de diminuer la cytotoxicité des nanoparticules de SiO₂, cette réponse reste très peu connue sur le plan moléculaire. Ce travail démontre que les nanoparticules considérées induisent l'expression du gène de la follistatine (*FST*) un gène de réponse au stress, à la fois dans des tissus pulmonaires de souris après instillation intra-trachéale ainsi que dans une lignée de cellules pulmonaires. Deux marqueurs de l'activité transcriptionnelle du gène *FST*, l'acétylation de l'histone H3 et la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, sont significativement augmentés lors du traitement par SiO₂. Cette induction transcriptionnelle est médiée par Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2), un acteur central de la réponse au stress oxydant, puisque Nrf2 se lie directement au promoteur de *FST* et que l'expression de *FST* est réduite dans des cellules déficientes en Nrf2. La diminution du niveau de la follistatine provoque l'apoptose dans des cellules en culture et des tissus exposés aux particules de SiO₂. Enfin, les auteurs montrent également que la modulation de l'expression de *FST* influence les niveaux d'expression de deux NADPH oxydases (NOX1 et NOX5), ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En résumé, ce travail démontre un rôle protecteur de *FST* contre le stress oxydant induit par les nanoparticules de SiO₂, et souligne que les nanoparticules de SiO₂ interfèrent avec les systèmes biologiques.

Commentaire

FST est un gène de réponse au stress, dont l'activation par une carence en glucose a été bien étudiée (4). Le travail présenté ici montre que *FST* est également activé par les nanoparticules de SiO₂, via l'activateur transcriptionnel Nrf2 (5). Ce résultat est important car il atteste encore une fois que les voies de réponse au stress oxydant sont au cœur de la réponse induite par les nanoparticules de SiO₂. Sur le plan moléculaire, ce travail met en avant une nouvelle voie d'activation de *FST*. En effet, dans le cas d'une carence en glucose, c'est l'allongement de la demi-vie des ARN messagers qui explique l'augmentation de la quantité de follistatine. Dans le cas du SiO₂, il s'agit d'une activation transcriptionnelle par Nrf2, lui-même sensible aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées après exposition des cellules aux nanoparticules. La follistatine inhibe la production de ROS en diminuant l'expression des NOX productrices de ROS, et prévient ainsi la mort cellulaire.

De façon intéressante, les auteurs indiquent que *FST* est également activé en présence d'autres nanoparticules, dont le TiO₂, soulignant ainsi le rôle central de ce gène dans les mécanismes moléculaires de réponse.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nos organismes sont exposés chaque jour à des doses variables de nanoparticules, en raison de leur utilisation croissante et massive dans les industries alimentaires, de la santé, etc... Pourtant introduites à des doses subtoxiques, ces nanoparticules s'accumulent dans l'environnement et dans les tissus, et provoquent des réponses cellulaires dont les mécanismes moléculaires sous-jacents sont peu connus. La production de stress oxydant après exposition aux nanoparticules est bien documentée, sans que les conséquences cellulaires d'un tel stress ne soient pourtant envisagées explicitement. Les deux articles analysés montrent que les réponses antioxydantes mises en œuvre par nos cellules sont variables (péroxirédoxines et follistatine via le facteur de transcription rédox Nrf2) et que cette mise en évidence est essentielle tant sur le plan fondamental qu'en vue d'une utilisation éventuelle en tant que marqueur d'exposition, qualitatif ou quantitatif.

Une telle connaissance permettrait de fournir des outils au législateur pour établir des normes d'exposition aux nanoparticules. En effet, la présence continue de nanoparticules dans notre environnement pourrait logiquement créer un stress oxydant chronique, dont les conséquences (mutagénèse, instabilité génomique) sont potentiellement à l'origine de pathologies variées, et notamment de cancers.

GENERAL CONCLUSION

Human organisms are exposed to various amounts of nanoparticles every day, due to an increasing, massive use in food or health industry for example. Despite being utilized in the subtoxic range, nanoparticles accumulate in the environment and in human tissues, and are responsible for cellular responses which underlying mechanisms are still unknown. Oxidative stress generation due to nanoparticles is well documented, without being fully aware of cellular consequences. Both articles show that various redox responses are being implemented (peroxiredoxins and Follistatin via Nrf2 activation) and that in-depth investigations are necessary to fully understand mechanisms and maybe identify specific markers of exposure to nanoparticles.

Such knowledge should allow providing new decision tools for regulatory authorities regarding nanoparticles. Continuous presence of nanoparticles in the environment may logically generate chronic oxidative stress which consequences (mutagenesis, genomic instability) may lead to various diseases, including cancer.

2 Lee, Y. M., Park, S. H., Shin, D. I., Hwang, J. Y., Park, B., Park, Y. J., Lee, T. H., Chae, H. Z., Jin, B. K., Oh, T. H., and Oh, Y. J. (2008) Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease. *J Biol Chem* 283, 9986-9998

3 McKean, D. M., Sisbarro, L., Ilic, D., Kaplan-Albuquerque, N., Nemenoff, R., Weiser-Evans, M., Kern, M. J., and Jones, P. L. (2003) FAK induces expression of Prx1 to promote tenascin-C-dependent fibroblast migration. *J Cell Biol* 161, 393-402

4 Gao, X., Wei, S., Lai, K., Sheng, J., Su, J., Zhu, J., Dong, H., Hu, H., and Xu, Z. (2010) Nucleolar follistatin promotes cancer cell survival under glucose-deprived conditions through inhibiting cellular rRNA synthesis. *J Biol Chem* 285, 36857-36864

5 Ma, Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 401-426

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.

Lexique

Cancérisation /Tumourisation: Transformation cellulaire qui aboutit à des divisions incontrôlées des cellules.

Catalase, peroxiredoxines, thioredoxines: enzymes cellulaires ayant une activité anti-oxydante.

GSH, NAD: glutathion et nicotinamide adénine dinucléotide, deux facteurs cellulaires avec activité anti-oxydante.

Homéostasie rédox : état d'équilibre entre les espèces oxydantes et réductrices.

Macromolécules : molécule de taille moléculaire élevée (ex : l'ADN chromosomique, les complexes protéiques).

Nanoparticules : 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 comprise entre 1 nm et 100 nm (définition harmonisée au niveau européen).

Réponse transcriptionnelle: modification de l'expression des gènes en réponse à un changement (ex : réponse transcriptionnelle au stress)

Subtoxique: relatif à une dose très inférieure à la dose toxique, qui entraîne la mort cellulaire.

Thiol : groupement chimique (-SH) à la surface de certaines molécules et réactif à l'oxydation.

Publications de référence

1 Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J., and Allen, D. D. (2004) Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of drug targeting* 12, 635-641