

Inflammation et nanoparticules métalliques

Période : novembre 2010 à février 2011

Pascal ANDUJAR

Université Paris-Est Créteil – INSERM U955 Équipe 4 – Créteil

Mots clés : Cytokine pro-inflammatoire, Dioxyde de silice, Dioxyde de titane, Empreinte, Inflammasome, Inflammation, Nanoparticules, Oxydes métalliques, Poumon

Dans le champ de la nanotoxicologie pulmonaire, l'étude de l'inflammation⁽¹⁾ mérite une attention particulière. En effet, l'appareil respiratoire constitue la principale voie d'entrée dans l'organisme des particules, notamment des nanoparticules (NP). De façon générale, le macrophage⁽²⁾ alvéolaire est une cellule de l'immunité douée de phagocytose jouant un rôle primordial dans l'élimination pulmonaire, notamment de particules (Mühlfeld *et al*, 2008). En effet, le contact établi entre le macrophage et la particule active des récepteurs cellulaires de l'immunité innée, et induit la sécrétion de médiateurs inflammatoires, comme la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 β ⁽³⁾ (IL-1 β).

De nombreux travaux ont montré que l'administration pulmonaire de certaines NP d'oxydes métalliques, comme le dioxyde de titane (TiO₂), entraîne une réponse inflammatoire souvent décrite comme transitoire, apparaissant 24 heures après l'administration qu'elle soit par voie inhalée ou intratrachéale, caractérisée par l'augmentation de la cellularité totale du liquide de lavage broncho-alvéolaire (principalement des macrophages et des polynucléaires neutrophiles) et disparaissant le plus souvent avant 2 semaines. Différents paramètres physicochimiques semblent impliqués dans la réponse inflammatoire, comme la dose, la taille et la structure cristalline des NP.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces phénomènes inflammatoires et la mise en évidence de biomarqueurs moléculaires des NP, notamment sous forme d'oxydes métalliques, apparaissent essentielles.

Les nanoparticules activent l'inflammasome⁽⁴⁾ Nlrp3 (Récepteurs NOD-like de type 3 contenant un domaine pyrine) et causent une inflammation pulmonaire par libération des interleukines IL-1 α et IL-1 β

Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 19449-19454.

Analyse

Certains récepteurs cellulaires exprimés par les macrophages sont capables, après stimulation, de déclencher une réponse inflammatoire, notamment les récepteurs Toll-like (TLR) et NOD-like (NLR) qui reconnaissent des signatures moléculaires de pathogènes (PAMP: Pathogen-associated molecular pattern molecules) ou des signaux de danger (DAMP: damage-associated molecular pattern molecules), comme HMGB1 (high mobility group box 1), ou encore les protéines S100 ou l'ADN. Les récepteurs NLR font partie de la famille des récepteurs intracellulaires de l'immunité innée et comprennent 22 membres. Un de ces récepteurs NLR, le récepteur Nlrp3, joue un rôle capital dans la détection de signaux PAMP et DAMP, en induisant notamment la production d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 β . Ce récepteur Nlrp3 appartient à un complexe moléculaire appelé l'inflammasome⁽⁶⁾ comportant également les adaptateurs Asc (apoptosis-associated speck-like protein) et Cardinal, et la caspase-1⁽⁵⁾, enzyme responsable de la maturation du précurseur pro-IL-1 β en IL-1 β active. Les mécanismes d'activation

de l'inflammasome sont encore mal connus, un rôle potentiel de l'afflux de potassium et de la génération d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaire ayant été proposé (Schroder et Tschopp, 2010). Des auteurs ont montré que la voie de l'inflammasome était induite dans des macrophages exposés à des fibres d'amiante ou à des particules micrométriques de silice cristalline (Dostert *et al*, 2008).

Les auteurs de cet article ont donc voulu comparer les effets pro-inflammatoires de différentes NP: NP de dioxyde de titane (TiO₂), soit sous forme cristalline rutile à 80 nm de diamètre, soit sous forme cristalline anatase à 20 nm de diamètre, NP de dioxyde de silice (SiO₂) à 15 nm de diamètre (comparées à des particules micrométriques de SiO₂) et NP d'oxyde de zinc (ZnO) à 15 nm de diamètre, par activation de l'inflammasome, *in vitro* dans des modèles cellulaires murins et humains et *in vivo* sur des modèles murins.

Les auteurs ont tout d'abord exposé des lignées cellulaires macrophagiques humaines THP1 et des cultures primaires de kératinocytes humains et de macrophages murins à ces NP pendant 6 heures. À partir de ces modèles cellulaires, les auteurs ont montré dans cet article que les NP de TiO₂ et de SiO₂ induisent un inflammasome de type Nlrp3 en mettant en évidence le clivage de la caspase-1 et la sécrétion de l'IL-1 β dans ces modèles cellulaires, contrairement aux NP de ZnO qui n'avaient pas d'effet. L'emploi d'un inhibiteur du canal potassique ATP-dépendant (glibenclamide) ou d'un piègeur d'espèces réactives de l'oxygène diminue la sécrétion d'IL-1 β dépendante de l'inflammasome induite par les NP. La phagocytose n'est pas obligatoire dans l'activation de l'inflammasome induit par les NP. En effet, les auteurs montrent, d'une part, que dans un kératinocyte, cellule

cutanée à faible capacité phagocytaire, il existe tout de même une activation de l'inflammasome par les NP de SiO₂ et d'autre part, que l'inhibition de la phagocytose des macrophages par la cytochalasine D n'empêche pas l'activation de l'inflammasome par ces NP. Il est à noter que cette activation de l'inflammasome dans les kératinocytes est absente pour les particules micrométriques de SiO₂, alors que l'inflammasome est activé dans les macrophages, cellule à forte activité phagocytaire, par les particules nanométriques et micrométriques de SiO₂. L'emploi d'inhibiteurs d'endocytose (notamment caveolae-dépendante ou clathrine-dépendante) n'a pas permis d'inactiver l'inflammasome induit par les NP de TiO₂ qui sont principalement sous forme libre dans le cytoplasme en microscopie électronique, laissant suspecter une autre voie de pénétration cellulaire de ces NP.

Par ailleurs, des souris transgéniques knock-out (KO, c'est-à-dire inactivée pour un gène) pour l'un des gènes codant pour les protéines suivantes ont été étudiées: le récepteur Nlrp3, l'adaptateur Asc, Ipaf (ICE protease activating factor), l'interleukine IL-1 α , le récepteur de l'IL-1, IL-1R, et la caspase-1. Ces souris ont été exposées aux NP de TiO₂ par 3 voies: la voie intrapéritonéale, par une injection unique de 1 à 1,5 mg de NP de TiO₂ avec recueil du lavage péritonéal et analyse des cellules par cytométrie en flux, la voie intranasale, par administration unique de 7,5 à 30 mg/kg de NP de TiO₂, et la voie cutanée, par une application quotidienne de NP de TiO₂ (dose non précisée par les auteurs) pendant 5 à 10 jours. À partir de ces modèles murins transgéniques exposés par voie intrapéritonéale, les auteurs ont montré que le recrutement de polynucléaires neutrophiles est intégralement dépendant d'Asc, de l'IL-1 α et de l'IL-1R. Dans les mêmes conditions, les auteurs montrent que le recrutement de polynucléaires neutrophiles est dépendant de Nlrp3 seulement s'il existe une déplétion de l'IL-1 α (réalisée après emploi d'un anticorps anti-IL-1 α). Le rôle majeur de l'IL-1 α a été confirmé *in vitro* par l'induction dans les kératinocytes et les macrophages humains et murins de la libération d'IL-1 α de manière partiellement dépendante de Nlrp3 et Asc après exposition aux NP de TiO₂. De plus, les auteurs ont montré que l'inflammation pulmonaire observée après instillation intranasale de NP de TiO₂ chez les souris transgéniques était dépendante de Nlrp3, d'Asc, de l'IL-1 α et de l'IL-1R avec libération d'IL-1 α et d'IL-1 β . En revanche, les auteurs n'ont pas montré *in vivo* d'effets inflammatoires cliniquement ou histologiquement visibles chez les souris exposées aux NP par voie cutanée.

En conclusion, les auteurs montrent que les NP de TiO₂ et de SiO₂ activent l'inflammasome de type Nlrp3, conduisant à la libération d'IL-1 α et d'IL-1 β . Contrairement à d'autres particules (amiante et silice), l'activation de l'inflammasome de type Nlrp3 par les NP de TiO₂ ne nécessite pas une phagocytose préalable. Enfin, l'inflammation engendrée par les NP de TiO₂ est largement causée par la libération d'IL-1 α .

Commentaire

Cet article a suscité l'émoi dans la communauté scientifique et apporte une très nette avancée dans la compréhension et la caractérisation des phénomènes inflammatoires observés

dans de nombreuses études sur les effets respiratoires après exposition d'animaux notamment aux NP de TiO₂. Il est important de rappeler que les particules de TiO₂ ont longtemps été considérées comme des particules inertes et employées comme témoins dans des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs montrent que le facteur « taille » d'une particule est un élément déterminant dans la voie d'activation de l'inflammasome. En effet, à composition chimique identique, l'activation de l'inflammasome engendrée par les NP ne semble pas nécessiter de phagocytose préalable (phagocytose non requise), alors que pour les particules micrométriques, une phagocytose est requise. L'autre point important est l'absence d'effet observé dans les modèles employés dans cette étude des NP d'oxyde de zinc montrant là encore que les effets des NP ne dépendent pas uniquement de la taille, mais également de nombreux paramètres physico-chimiques. Dans le cas de l'oxyde de zinc, l'absence d'activation de la voie de l'inflammasome pourrait être due à la dissolution très rapide de cet oxyde en milieu aqueux, ce qui ne veut pas dire que les NP d'oxyde de zinc sont dépourvus de tout effet, comme le rapporte la publication suivante.

Chaque nanoparticule d'oxydes métalliques induit des empreintes inflammatoires pulmonaires spécifiques avec d'importantes implications pour les tests des nanoparticules

Cho WS, Duffin R, Poland CA, Howie SE, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect.* 2010; 118: 1699-1706.

Analyse

L'évaluation du risque des NP pour la santé humaine, notamment sous forme d'oxydes métalliques, d'ores et déjà largement employés notamment dans l'industrie, nécessite une meilleure identification de leur danger potentiel et l'obtention de données sur leur relation dose-effet difficiles à caractériser face à l'accroissement exponentiel du nombre de nouvelles NP sur le marché. Par ailleurs, la mise en évidence du danger de ces NP par des tests *in vitro*, encore non validés, comporte des limites importantes. L'un des principaux effets biologiques des NP est l'inflammation. Sous le terme d'inflammation se cachent des réponses inflammatoires extrêmement variées à une agression biologique, physique ou chimique de l'organisme.

Les auteurs de cet article proposent de mieux caractériser l'inflammation pulmonaire aiguë obtenue induite chez des rats exposés par instillation intratrachéale unique à 100 et à 300 cm²/ml de différentes NP d'oxydes métalliques [dioxyde de cérium (CeO₂) de 20-30 nm de diamètre, dioxyde de titane (TiO₂) de 30-40 nm, dioxyde de silice (SiO₂) de 10 nm, oxyde de nickel (NiO) de 10 à 20 nm, oxyde de zinc (ZnO) inférieur à 10 nm et oxyde de cuivre (CuO) inférieur à 50 nm], en prenant comme NP témoins des NP de noir de carbone (CB: Carbon black) à 14 nm et des NP de polystyrène comportant des amines modifiées à 36 nm dispersées dans du sérum de rat. Les auteurs

de l'article ont analysé les caractéristiques physico-chimiques de ces NP (notamment taille, surface totale, surface spécifique, dispersion, charge électrique) et vérifié l'absence d'endotoxines. Les analyses des parenchymes pulmonaires (par histologie et par immunohistochimie) et des liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) [par cytologie, dosage des protéines totales et de la lactate déshydrogénase (LDH), deux marqueurs de lyse cellulaire, dosage de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-13, MIP-2 (Macrophage inflammatory protein 2), IFN- γ et éotaxine)] ont été effectuées à 24 heures et 4 semaines post-instillation en comparant les rats exposés aux rats non exposés.

Les NP de CeO₂ engendrent une inflammation pulmonaire à polynucléaires neutrophiles (PNN) à 24 heures, associée à de rares granulomes alvéolaires et interstitiels à 4 semaines. Une augmentation statistiquement significative du nombre de PNN dans les liquides de LBA est observée à 24 heures et à 4 semaines, ainsi que des dosages dans les liquides de LBA de la LDH, des protéines totales, de l'IL-1 β et de MIP-2 à 24 heures et uniquement à la plus forte dose pour la LDH et MIP-2 à 4 semaines.

Les NP de NiO provoquent une inflammation pulmonaire mixte à PNN et à lymphocytes à 24 heures associée à 4 semaines à une lipoprotéinose alvéolaire (infiltrats alvéolaires de lipoprotéines avec des macrophages spumeux). Une augmentation statistiquement significative du nombre de PNN est observée dans les liquides de LBA à 24 heures avec une relation dose-effet. À quatre semaines, le nombre de PNN et de lymphocytes sont augmentés, et ceci de façon plus importante pour les PNN par rapport au temps « 24 heures ». Les dosages dans les liquides de LBA de LDH, des protéines totales, de l'IL-1 β et de MIP-2 sont augmentés à 24 heures, avec une relation dose-effet pour la LDH et les protéines totales. À quatre semaines, la LDH, les protéines totales, MIP-2 et IFN- γ sont augmentés (uniquement à la dose la plus forte pour l'IFN- γ).

Les NP de ZnO sont à l'origine d'une inflammation pulmonaire à polynucléaires éosinophiles (PNE) à 24 heures et d'une inflammation interstitielle et alvéolaire avec infiltrats de PNE, de cellules géantes, de macrophages et des lésions sévères de fibrose alvéolaire à 4 semaines. Une augmentation statistiquement significative du nombre de PNN et de PNE a été observée dans les liquides de LBA à 24 heures et du nombre de lymphocytes à 4 semaines. Les dosages dans les liquides de LBA de LDH et des protéines totales sont augmentés seulement à 24 heures avec une relation dose-effet. Les dosages de l'IL-1 β , de l'IL-13 et de l'éotaxine sont augmentés à 24 heures et ceux de l'IFN- γ à 4 semaines, uniquement à la dose la plus forte.

Pour les NP de CuO, il existe une inflammation pulmonaire à PNE associée à 4 semaines à une inflammation granulomateuse alvéolaire et à une fibrose interstitielle. Une augmentation statistiquement significative du nombre de PNN et de PNE a été observée dans les liquides de LBA à 24 heures. Les dosages dans les liquides de LBA à 24 heures de LDH, des protéines totales, de MIP-2 et de l'IL-13 sont augmentés seulement à 24 heures.

Au total, les auteurs ont mis en évidence une inflammation pulmonaire pour quatre types de NP d'oxydes métalliques administrées par instillation intratrachéale à hautes doses chez le rat avec, pour chacune, des « empreintes » inflammatoires

différentes à 24 heures et à 4 semaines après l'instillation. En revanche, aucun effet inflammatoire n'a été observé les NP d'oxyde de silice.

Commentaire

Dans cet article, les auteurs ont montré la présence de phénomènes inflammatoires pulmonaires distincts selon le type de NP d'oxydes métalliques à d'importantes doses chez des rats exposés par instillation intratrachéale unique. Les auteurs ont choisi à juste titre une expression de la dose de NP à administrer surfacique et non massique, ce qui, étant donné leur taille nanométrique, reflète le mieux l'effet biologique des NP. De façon intéressante, une libération de l'IL-1 β est mise en évidence à 24 heures après exposition aux NP de CeO₂, de NiO et de ZnO, ce qui peut laisser supposer, si l'on se réfère à l'article précédent de Yazdi *et al.* (2010), une possible activation de l'inflammasome par ces 3 types de NP.

Il est important de noter que dans cet article, les rats exposés aux NP de TiO₂ et de SiO₂ n'ont pas d'inflammation pulmonaire, ce qui peut paraître très étonnant. Ceci pourrait être lié, au fait qu'il s'agit de NP de TiO₂ et de SiO₂ amorphes, et/ou aux choix différents des doses de NP administrées. La forme cristalline revêt une importance capitale dans la réactivité de ces 2 types de NP. En effet, de nombreux travaux vont dans ce sens, comme l'étude expérimentale de Warheit *et al.* (2007), menée chez des rats instillés par voie intratrachéale avec des particules de TiO₂ rutile fin et ultrafin ou un mélange anatase/rutile (80/20) ultrafin. Celle-ci montre que, quelle que soit la taille des particules de TiO₂, la forme cristalline rutile est associée à une inflammation pulmonaire transitoire, alors que le mélange anatase/rutile entraîne une inflammation pulmonaire non transitoire, encore présente 3 mois après l'exposition. Cependant, une revue de la littérature récente de Napierska *et al.* (2010) rapporte quelques études expérimentales *in vivo* et *in vitro* montrant un effet inflammatoire des NP de SiO₂ amorphe.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, ces deux articles montrent l'implication indiscutable des phénomènes inflammatoires dans les mécanismes de toxicité de certaines NP d'oxydes métalliques et de mieux comprendre ces mécanismes inflammatoires, notamment pulmonaires, induits par ces NP d'oxydes métalliques en mettant en évidence, pour le premier, une activation de l'inflammasome par des NP de TiO₂ et de SiO₂ sans recours à une phagocytose préalablement avec des spécificités liées à l'échelle nanométrique de ces particules (par rapport à leur forme micrométrique), et pour le second, des mécanismes inflammatoires différents selon le type de NP d'oxydes métalliques. Ces deux articles permettent d'entrevoir à terme la possibilité de disposer d'un spectre d'outils prédictifs d'effets biologiques des NP *in vitro* à haut débit.

Lexique

- (1) Inflammation : réaction de défense immunitaire complexe de l'organisme déclenchée par des médiateurs d'origine plasmatisque ou cellulaire générés par l'activation en cascade de plusieurs voies intriquées pour répondre à une agression biologique, chimique ou physique, afin de maintenir l'intégrité de l'organisme.
- (2) Macrophage : cellule tissulaire issue d'une cellule sanguine circulante de la famille des globules blancs appelée monocyte. Les macrophages phagocytent les germes et les corps étrangers notamment les particules et participent à la fois dans les défenses non spécifiques (immunité innée) et les défenses spécifiques (immunité acquise).
- (3) Cytokine pro-inflammatoire : glycoprotéine membranaire ou sécrétée suite à une stimulation, pouvant être synthétisée par plusieurs types cellulaires et agir sur un grand nombre de cellules cibles. Elles sont très nombreuses et classées par homologie de structures. Elles ne peuvent agir que par l'intermédiaire de récepteurs qui doivent être présents sur les cellules cibles. Certains de ces récepteurs se clivent après leur fixation et forment un récepteur soluble inhibant ainsi l'action de la cytokine. La plupart de ces récepteurs n'ont pas d'activités enzymatiques propres et sont associés à d'autres protéines cellulaires. Parmi les cytokines, on trouve le TNF- α , les interleukines, les chimiokines et les interférons (IFN).
- (4) Inflammasome : complexe moléculaire comportant le récepteur Nlrp3, les adaptateurs, Asc et Cardinal, et la caspase-1, enzyme responsable de la maturation du précurseur pro-IL-1 β en IL-1 β active.
- (5) Caspase : le génome humain code pour 11 caspases qui sont des protéines cytoplasmiques impliquées dans la réponse inflammatoire en jouant un rôle dans l'activation des cytokines et la régulation de l'apoptose⁽⁶⁾. Elles sont dénommées ainsi, car ce sont des enzymes ayant un site catalytique conservé composé d'un résidu Cystéine, coupant leurs substrats après un résidu ASPartate et agissant comme protéASEs.
- (6) Apoptose : mort cellulaire programmée d'une cellule normale en situation de stress ou d'anomalie. Il s'agit d'un programme cellulaire actif d'auto-destruction. Ce programme de « suicide cellulaire » est activé pour éliminer sélectivement des cellules devenues indésirables.

Publications de référence

Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008 ; 320: 674-677.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 ; 140: 821-832.

Warheit DB, Webb TR, Reed KL et al. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*. 2007 ; 230: 90-104.

Revue de la littérature

Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Blank F et al. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 ; 294: 817-829.

Autres publications identifiées

Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Madrid EB et al. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol Lett*. 2011 ; 202: 111-119.

Les auteurs de cet article ont montré que la dysfonction mitochondriale résultant d'une exposition à des NP de TiO₂ est due à une altération de l'équilibre de la balance oxydants/anti-oxydants. Les auteurs ont isolé des mitochondries à partir de cellules de tissu pulmonaires de rats exposés à 10 μ g de NP de TiO₂ (diamètre inférieur à 25 nm) par mg de protéines mitochondriales pendant 2 heures. Ils ont montré une diminution du taux de la NADH et une altération du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) associée à une génération d'espèces réactives de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Napierska D, Thomassen LC, Lison D et al. The nanosilica hazard: another variable entity. *Part Fibre Toxicol*. 2010 ; 7 : 39-70.

Cet article est une revue de la littérature sur les effets sur la santé des NP de SiO₂ amorphes et cristallines. Les études expérimentales in vitro rapportent une pénétration cellulaire, une cytotoxicité « taille et dose dépendantes », une augmentation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et des effets pro-inflammatoires de ces NP. Les études expérimentales in vivo, chez l'animal en nombre plus limité, montrent la présence d'une inflammation pulmonaire réversible, la formation de granulome inflammatoire et l'existence de lésions focales d'emphysème, mais sans fibrose pulmonaire progressive.

Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ et al. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*. 2010 ; 7 : 37-47.

Les auteurs ont étudié les effets de la présence et de l'absence d'agglomération de particules nanométriques, sub-micrométriques et micrométriques d'or sur la réponse inflammatoire pulmonaire chez des rats exposés à une instillation intratrachéale unique de 1,6 mg/kg de NP d'or de 50 nm ou d'environ 200 nm de diamètre (le témoin positif employé était des NP de quartz DQ12). Les auteurs ont effectué une caractérisation physico-chimique des particules en suspension (potentiel zéta, pH, concentration et distribution en taille, vérification en microscopie électronique à transmission). Il n'existait pas dans cette étude de différence majeure au niveau des différents marqueurs de l'inflammation pulmonaire et systémique après instillation de particules d'or agglomérées ou non agglomérées quelles que soient leurs différentes tailles. Les deux types de particules d'or étaient présents à l'intérieur des macrophages. Cependant, les auteurs ont exposé les macrophages en prenant des doses massiques.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Nanoparticle, Toxicity.