

Projet de recherche – Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules

Contexte sociétal

Les activités humaines telles que le transport engendrent la production de nombreuses particules fines. Ainsi, en 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) constate que 92% des êtres humains vivent dans des lieux où l'air est de mauvaise qualité¹. Il en résulte une augmentation considérable du nombre de maladies respiratoires, de cancers pulmonaires, d'hospitalisations et de décès. En outre, l'OMS et l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) estiment que la pollution en Europe induit des frais de santé annuels de 1 400 milliards d'euros². L'inhalation de particules fines constitue donc un réel problème de société, tant sur le plan sanitaire qu'économique.

Contexte scientifique et objectifs de la thèse

Les mécanismes responsables des problèmes de santé issus de la respiration de nanoparticules sont mal connus. Les nanoparticules (Nps) sont des particules fines de taille inférieure à 100 nm. Une fois inhalées, elles atteignent les alvéoles pulmonaires, lieu des échanges gazeux. Dans les alvéoles, les nanoparticules rencontrent le surfactant pulmonaire puis les cellules épithéliales constituant les parois des poumons³ (Figure 1). Le surfactant pulmonaire (SP) est un biofluide constitué de deux éléments : un film de phospholipides et de protéines, situé à l'interface air-liquide et une phase aqueuse, dite hypophase, composée de protéines et de vésicules phospholipidiques multilamellaires dispersées en taille.

Nous avons réalisé une étude bibliographique conséquente qui nous a permis d'établir le chemin suivi par les Nps inhalées après leur arrivée dans les alvéoles⁴ (Figure 2). Brièvement, les nanoparticules traversent le film de surfactant en interagissant plus ou moins fortement avec ses composants. Les particules se retrouvent donc dans l'hypophase, soit nues soit enrobées de biomolécules (Figure 2, étape 1). Elles peuvent ensuite interagir ou non avec les vésicules présentes, ce qui donne potentiellement naissance à des systèmes hybrides Nps / phospholipides / protéines. Leur composition est relativement bien caractérisée, contrairement à leur structure, encore méconnue (Figure 2, étape 2). Les Nps ont alors une nouvelle identité, et par conséquent une bioréactivité différente. Finalement, les systèmes hybrides rencontrent les cellules épithéliales alvéolaires (Figure 2, étape 3). L'impact du SP sur la toxicité des particules et leur translocation vers le système sanguin est peu compris.

Dans ce projet, nous cherchons à rationaliser l'interaction nanoparticules / surfactant pulmonaire / cellules alvéolaires grâce à une approche unique à notre connaissance : reproduire la globalité du cheminement énoncé précédemment. Dans ce contexte, des systèmes modèles sont utilisés pour comprendre le rôle joué par le SP dans la toxicité induite chez les cellules alvéolaires par les Nps inhalées.

Dans ce projet, nous cherchons à rationaliser l'interaction nanoparticules / surfactant pulmonaire / cellules alvéolaires grâce à une approche unique à notre connaissance : reproduire la globalité du cheminement énoncé précédemment. Dans ce contexte, des systèmes modèles sont utilisés pour comprendre le rôle joué par le SP dans la toxicité induite chez les cellules alvéolaires par les Nps inhalées.

Contribution scientifique

Caractérisation des systèmes modèles

Pour diminuer la complexité du système étudié, nous avons sélectionné des éléments modèles : nanoparticules manufacturées (7 Nps différentes mais de même taille), cellules A549 (cellules humaines alvéolaires cancéreuses et immortalisées) et Curosurf® (surfactant pulmonaire d'origine porcine utilisé chez les nouveau-nés prématurés n'en sécrétant pas). Avant d'aborder toute expérience, nos systèmes modèles ont été scrupuleusement caractérisés.

Par ailleurs, nous avons extrudé le Curosurf® afin de réduire la taille et la dispersité des vésicules qui le composent sans modifier ses autres propriétés. Ce procédé, non appliqué

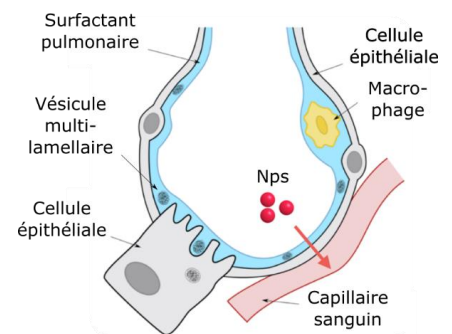


Figure 1 : Représentation d'une alvéole

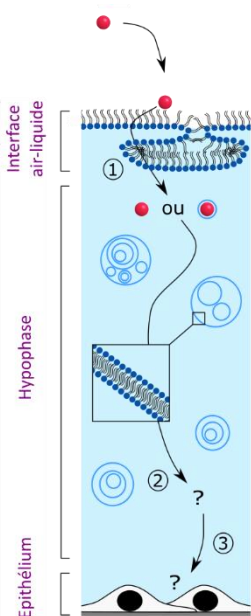


Figure 2 : Chemin suivi dans les alvéoles par les Nps inhalées, de l'air jusqu'aux cellules.

¹ Le Monde. 92% de la population mondiale respire un air ambiant trop pollué (2016)

² Le Monde. L'impact sanitaire de la pollution de l'air coûte chaque année 1 400 milliards d'euros à l'Europe (2015)

³ Pérez-Gil J. *et al.* (2008)

⁴ Oberdörster G. *et al.* (2005), Bakshi M. *et al.* (2008), Muhlfield C. *et al.* (2008), Schleh C. *et al.* (2009), Choi H.S. *et al.* (2010), Fan Q. *et al.* (2011), Sund J. *et al.* (2011), Ruge C.A. *et al.* (2012), Hu G. *et al.* (2013), Kreyling W. *et al.* (2013), Svensson C. *et al.* (2013), Raesch S. *et al.* (2015), Sweeney S. *et al.* (2015 and 2016), Theodorou I. *et al.* (2015 and 2016), Bajaj P. *et al.* (2016), Kumar A. *et al.* (2016), Whitwell H. *et al.* (2016), Hu Q. *et al.* (2017), Konduru N. *et al.* (2017)

à des biofluides à notre connaissance, nous a permis d'utiliser des techniques expérimentales variées, et d'étudier les phénomènes d'intérêt à différentes échelles de taille.

Interaction entre nanoparticules et hypophase du surfactant pulmonaire

Nous avons déterminé l'interaction entre SP et Nps présentes dans l'hypophase dans les cas où les particules sont soit nues soit enrobées de phospholipides. Dans un premier temps, l'interaction entre particules nues et hypophase du Curosurf® a été mesurée pour 5 Nps par diffusion de la lumière grâce à un protocole rapide et versatile préalablement mis au point dans notre équipe. Nous avons ainsi montré que l'interaction est majoritairement électrostatique. De plus, ce travail a mis en évidence que la composition du surfactant pulmonaire modèle considéré modifie de façon importante son interaction avec les particules. Cette observation souligne l'importance de travailler avec un surfactant modèle le plus proche possible du surfactant endogène. Par ailleurs, nous avons caractérisé par microscopie optique, électronique à transmission et cryo-electronique à transmission la structure de la couronne biomoléculaire résultant de l'incubation de Nps nues avec le SP. L'interaction particules / vésicules donne naissance à de multiples architectures : Nps isolées nues ou couvertes d'une bicouche de phospholipides, Nps agrégées, vésicules décorées de Nps, Nps internalisées par les vésicules et agrégats mixtes Nps / vésicules. Ainsi, la couronne biomoléculaire formée dans le surfactant pulmonaire est constituée de divers colloïdes hybrides complexes.

Dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur le cas où les Nps sont enrobées de phospholipides lorsqu'elles atteignent l'hypophase. Afin de mimer cet état, nous avons développé un protocole permettant de déposer une bicouche de Curosurf® sur les nanoparticules par simple sonication! La formulation contrôlée de bicouche lipidique supportée n'était pas décrite à notre connaissance dans la littérature. Par la suite, aucune interaction significative n'a été détectée entre ces Nps et le SP. Par conséquent, lorsque les particules arrivent enrobées de phospholipides dans l'hypophase, elles restent dispersées dans cette dernière, à l'inverse des Nps nues.

Interaction avec les cellules alvéolaires

Nous avons étudié l'impact du surfactant pulmonaire sur la toxicité et sur l'internalisation des Nps. En accord avec une partie de la littérature⁵, nous avons montré que la présence de surfactant pulmonaire diminue significativement la toxicité des 7 particules testées. Par microscopie confocale, microscopie à transmission électronique et par un protocole de fluorescence que nous avons développé, nous avons visualisé et mesuré les quantités de particules internalisées par les cellules alvéolaires lorsque ces dernières sont incubées avec diverses structures hybrides particules / Curosurf®. Les résultats diffèrent significativement du cas où le surfactant pulmonaire est absent. Plus précisément, les nanoparticules ayant rencontré le Curosurf® sont moins internalisées. Ce phénomène est significativement plus marqué dans le cas des particules enrobées. Nos résultats indiquent que l'internalisation et la toxicité des particules semblent intimement liés aux architectures Nps / SP qui résultent de l'arrivée des particules dans le surfactant pulmonaire. Ce lien entre structure hybride et bioréactivité n'a pas été démontré clairement à notre connaissance.

Conclusion

Les résultats majeurs de mon travail sont résumés en Figure 3. Les expériences réalisées indiquent qu'il est indispensable de considérer l'interaction physico-chimique que le surfactant pulmonaire développe avec les particules fines inhalées afin de comprendre la toxicité induite par ces dernières. Les protocoles *in vitro* actuels excluant généralement le surfactant, il semble urgent de les repenser. Par ailleurs, nous avons montré qu'en plus de ces fonctions physiologiques connues, le surfactant pulmonaire protège les cellules alvéolaires.

Nous avons observé que les nanoparticules enrobées de Curosurf® sont furtives en milieu physiologique. Cette propriété est particulièrement recherchée en imagerie ou en traitement du cancer chez l'homme. En effet, les particules sont connues pour agréger dans les biofluides ou être rapidement étiquetées comme corps étranger⁶, ce qui diminue considérablement leur efficacité. Plus généralement, nous avons apporté des connaissances sur le sujet particules / surfactant pulmonaire / cellules. Ces informations sont fondamentales en vue d'applications futures en nanomédecine telles que l'administration de médicaments sous forme d'aérosols. Enfin, notre travail montre qu'il est indispensable d'appliquer une approche pluridisciplinaire pour avancer dans la compréhension de sujets complexes à l'interface de la physico-chimie et de la biologie.

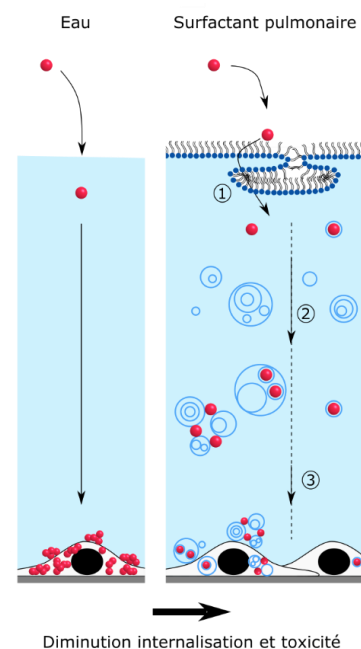


Figure 3 : Représentation schématique résumée des résultats majeurs de la thèse.

⁵ Wallace W.E. *et al.* (1992), Gao N. *et al.* (2001), Gasser M. *et al.* (2012), Ratoi M. *et al.* (2014), Kasper J.Y. *et al.* (2015), Sweeney S. *et al.* (2015 and 2016), Theodorou I.G. *et al.* (2016)

⁶ Brigger I. *et al.* (2002), Jokerst J.V. *et al.* (2011)