

Développement d'un nouveau modèle *in vitro* pour l'étude de l'impact des particules atmosphériques sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires

J. Deweirdt*, J.F. Quignard, T. Ducret, J.P. Savineau, R. Marthan, C. Guibert, I. Baudrimont

CRCTB, INSERM U1045, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

*juliette.deweirdt@u-bordeaux.fr

TITLE

Development of a new *in vitro* model in order to study the impact of atmospheric particles in pulmonary artery endothelial cells

ABSTRACT

Several epidemiological studies have revealed a correlation between airborne particulate matter pollution and excess of cardiovascular diseases. Pulmonary artery endothelial cells can be a direct target of inhaled particles and people with pulmonary hypertension (PH) may present a cardiovascular disease risk. The aim of this study is to develop a new *in vitro* model which mimics PH, in order to access if nanoparticles (NPs) exposure can be a risk factor in the aggravation of cardiovascular diseases such as PH.

RESUME

De nombreuses études épidémiologiques ont révélé l'implication de la pollution particulaire dans le déclenchement ou l'exacerbation de maladies cardiovasculaires. Les cellules endothéliales d'artères pulmonaires constituent une cible privilégiée des particules inhalées et les personnes souffrant d'hypertension pulmonaire (HTP) pourraient constituer une population à risque. L'objectif de cette étude est de développer un nouveau modèle *in vitro* qui mime l'HTP afin d'évaluer si l'exposition aux nanoparticules peut être un facteur de risque dans l'aggravation des maladies cardiovasculaires.

KEYWORDS: *in vitro* model, nanoparticles, pulmonary artery endothelial cells, reactive oxygen species, fibroblast growth factor 2 (FGF-2) / **MOTS-CLÉS:** modèle *in vitro*, nanoparticules, cellules endothéliales d'artères pulmonaires, espèces réactives de l'oxygène, facteur-2 de croissance des fibroblastes (FGF-2).

1. INTRODUCTION

L'exposition humaine aux particules atmosphériques et, notamment, aux nanoparticules (NPs) est une préoccupation majeure de santé publique. L'excès de morbidité et mortalité, constaté par des études épidémiologiques, est principalement associé aux pathologies respiratoires et cardiovasculaires (Newby, 2015). Il a été montré que, après inhalation, les particules les plus fines, caractérisées par une forte réactivité de surface, pénètrent profondément dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les NPs, pourraient franchir la barrière alvéolo-capillaire, se retrouver dans la circulation générale et y exercer des effets délétères par des interactions directes avec le système cardiovasculaire et, notamment, les cellules endothéliales qui tapissent la lumière des vaisseaux et qui contrôlent l'activité vasculaire (Miller, 2017). Des études menées au laboratoire ont pu montrer qu'une exposition aux NPs pouvait modifier la réactivité vasculaire d'artères pulmonaires (Courtois, 2010). Par ailleurs, il est connu que l'inhalation de NP d'oxyde de titane entraîne, chez le rat, une dysfonction au niveau micro-vasculaire (Knuckles, 2011). De plus, il a été montré une corrélation entre l'exposition aux particules et une augmentation des pressions artérielles pulmonaires (caractéristique de l'hypertension pulmonaire-HTP) (Calderón-Garcidueñas, 2007). L'HTP est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg (Izikki, 2009). C'est une maladie multifactorielle mortelle caractérisée par la réduction de la production de facteurs vasodilatateurs, l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs et de facteurs de croissance qui conduisent à une hyperréactivité vasculaire, un remodelage artériel dû à la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) et endothéliales (CE), souvent accompagnée d'une inflammation. Il a, également, été montré que les cellules endothéliales pulmonaires secrètent des facteurs paracrines, notamment, le facteur FGF-2 (facteur-2 de croissance des fibroblastes) qui contribue à l'hyperplasie des CML pendant la progression de l'HTP (Izikki, 2009). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'HTP sont peu connus mais des travaux récents ont montré que l'altération de la signalisation calcique joue un rôle majeur dans la physiopathologie de cette maladie (Ducret, 2010). Le stress oxydant (surproduction d'espèces réactives de l'oxygène: ERO) joue, également, un rôle important, dans le développement de l'HTP (Freund-Michel, 2013) ainsi que dans les effets délétères induits par les NPs sur le système vasculaire (Nemmar, 2013). Cependant, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets cellulaires et moléculaires des NPs sur les cellules cibles vasculaires pulmonaires. Dans ce contexte, et afin d'évaluer si l'exposition aux NPs peut être un facteur de risque dans l'aggravation des maladies cardiovasculaires, nous avons développé un nouveau modèle *in vitro* innovant qui mime la dynamique vasculaire observée dans l'HTP (culture des cellules en hypoxie sur système d'étirement cellulaire STREX®).

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. Les nanoparticules de noir de carbone FW2

Les NPs FW2 sont commercialisées par la société Degussa (Francfort, Allemagne). Elles sont constituées de carbone élémentaire (carbone pur) et possède les caractéristiques suivantes : diamètre aérodynamique moyen de 13 nm, surface de 350 m²/g, pH = 2.5. La solution mère de NP FW2 (2 mg/ml) est soniquée à l'aide d'un sonicateur doté d'une sonde à induction, pendant 3 cycles de 30 secondes, à 100 Hz.

2.2. Culture cellulaire

Toutes les expérimentations sont réalisées sur des cultures primaires de cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC, Human Pulmonary Artery Endothelial Cells), commercialisées par PromoCell®. Elles sont isolées à partir de l'artère pulmonaire principale d'un patient Caucasiens de 23 ans ayant subi une exérèse pulmonaire. Le milieu de culture utilisé est l'ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) utilisé selon les recommandations du fournisseur (PromoCell®), sans antibiotiques ni fongicides et complété avec du SupplementMix (PromoCell®) contenant 2 % de sérum de veau foetal (SVF), 0,4 % d'Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS), 0,1 ng/ml d'Epidermal Growth Factor (EGF), 1 ng/ml de Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF), 90 µg/ml d'héparine et 1 µg/ml d'hydrocortisone. Les cellules sont incubées, à 37 °C, en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO₂.

2.3. Système d'étirement (STREX® commercialisé par B-bridge International)

Les cellules sontensemencées dans des chambres de culture en silicone (préalablement coatées à la fibronectine), à une densité de 30000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 heures, à 37 °C, 5 % CO₂. Les cellules sont ensuite placées dans deux conditions expérimentales distinctes:

- Condition pathologique mimant l'HTP (cellules étirées + hypoxie)

Les cellules sont étirées grâce à l'appareil STREX®, à raison de 30 cycles par minute et 20 % d'étirement, et, placées en hypoxie, pendant 20 heures, à 37 °C, 5 % CO₂ et 1 % d'O₂.

- Condition physiologique (cellules témoins)

Les cellules non étirées sont placées, en normoxie, dans l'incubateur, pendant 20 heures, à 37 °C, 5% CO₂ et 21 % d'O₂.

Les cellules sont, ensuite, exposées ou non, pendant 4 heures, avec les nanoparticules FW2 à différentes concentrations (5 ; 7,5 et 10 µg/cm²), selon les deux conditions expérimentales.

2.4. Dosage du facteur FGF-2

Les cellules sont cultivées dans les deux conditions expérimentales (modèle physiologique et modèle pathologique) et, après 24 heures de conditionnement, les surnageants cellulaires sont prélevés et le FGF-2 est dosé, selon les recommandations du fabricant, par la technique d'enzyme-linked immunosorbent assay (Human Fibroblast Growth Factor basic FGF-2 ELISA Kit, Promocell®), à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®).

2.5. Evaluation du stress oxydant

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est évaluée, par spectrofluorimétrie, grâce à la sonde CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate, acetyl ester) (Fisher Scientific®) selon les recommandations du fabricant. Après 20 h de pré-conditionnement dans les deux conditions expérimentales (modèle physiologique et modèle pathologique), les cellules sont rincées avec une solution d'Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) sans rouge de phénol et incubées, durant 20 minutes, à 37 °C et 5 % CO₂, avec une solution d'HBSS contenant 20 µM de sonde. Les cellules sont ensuite rincées, afin d'éliminer la sonde non incorporée, puis, elles sont exposées, pendant 4h, aux NPs FW2. L'intensité de fluorescence est déterminée, par spectrofluorimétrie, grâce à un lecteur de plaques (FLUOstar Omega 2.10 et le logiciel d'analyse MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®) à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les cellules sont cultivées sur des supports étirables en silicone et placées en hypoxie. Ce système permet d'étirer les cellules de façon chronique en les soumettant à des étirements dont la fréquence et l'intensité peuvent être contrôlées par le dispositif. Ce système permet d'imposer des contraintes uni-axiales et donc de reproduire *in vitro* les contraintes physiques que peuvent subir *in vivo* les cellules présentes dans la paroi

vasculaire, en mimant la dynamique vasculaire observée lors de l'HTP. La dysfonction endothéliale a un rôle essentiel dans le développement de l'HTP. Plusieurs altérations moléculaires sont à l'origine des perturbations fonctionnelles observées dans cette pathologie dont, notamment, une production et une libération anormale de médiateurs prolifératifs tels que le FGF-2 (Izikki, 2009). Ce facteur de croissance peut donc être considéré comme un biomarqueur du dysfonctionnement vasculaire et du remodelage observé dans l'HTP. Afin de valider notre modèle pathologique *in vitro*, nous avons évalué, dans les deux conditions expérimentales (cellules témoins et modèle pathologique) la production de ce facteur de croissance dans les cellules HPAEC après 24h (fig. 1).

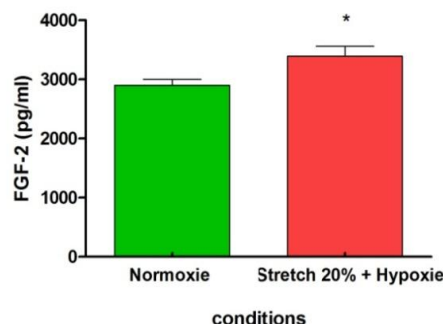


Figure 1. Dosage du FGF-2 dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique). Les résultats sont exprimés en pg/ml. Le test statistique utilisé est un Mann-Whitney. * $P < 0,05$: seuil de significativité par rapport aux cellules témoins placées en normoxie (n=3).

Les résultats montrent une augmentation significative de la production de FGF-2 dans le surnageant de culture des cellules HPAEC dans le modèle pathologique qui mime l'HTP par rapport à celle observée dans les cellules témoins (fig. 1). Afin de confirmer la validité du modèle, nous avons, également, évalué, dans les deux conditions expérimentales (cellules témoins et modèle pathologique), la production d'un deuxième marqueur moléculaire de l'HTP. De nombreuses études ont montré que les ERO jouent un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires telles que l'HTP. Il a, en effet, été observé une augmentation des ERO dans l'HTP chez l'Homme ainsi que dans des modèles animaux mimant l'HTP (Freund-Michel, 2013). Il nous est donc apparu pertinent de mesurer, dans les cellules HPAEC, la production globale d'ERO, après 24h (fig. 2).

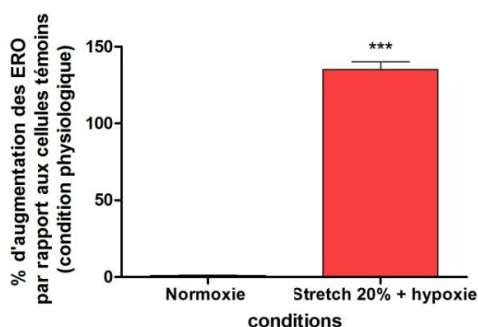


Figure 2. Production globale d'ERO dans les deux conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation des ERO par rapport aux cellules témoins. Le test statistique utilisé est un Mann-Whitney. *** $P < 0,001$: seuil de significativité par rapport aux cellules témoins (n=3).

Les résultats montrent, dans le modèle pathologique qui mime l'HTP, une augmentation significative de la production d'ERO (135,19%) dans les cellules HPAEC par rapport aux cellules témoins (condition physiologique). Afin d'évaluer si l'exposition aux NPs peut être un facteur de risque dans l'aggravation des maladies cardiovasculaires, il nous est apparu intéressant, dans une deuxième étape, de regarder l'effet des NPs FW2 sur les cellules HPAEC dans les deux conditions expérimentales (fig. 3). Le stress oxydant étant un événement critique impliqué, d'une part, dans les effets cardiovasculaires induits par les NPs et, d'autre part, dans la physiopathologie de l'HTP, nous avons, évalué, dans les deux conditions expérimentales, l'effet des NPs FW2 sur la production d'ERO dans les cellules HPAEC.

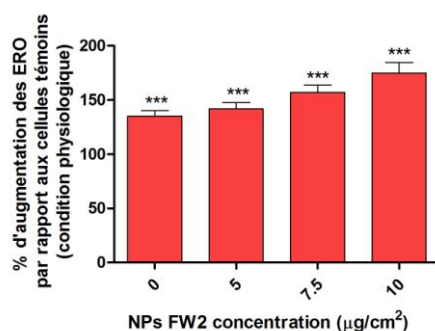


Figure 3. Production globale d'ERO dans les cellules HPAEC après 4h d'exposition avec les NPs FW2 (5 ; 7,5 et 10 µg/cm²) dans la condition pathologique. Les résultats sont exprimés, pour chaque concentration, en pourcentage d'augmentation des ERO par rapport à la condition physiologique. Le test statistique utilisé est un Kruskal-Wallis ***P<0.001: seuil de significativité par rapport aux cellules témoins (condition physiologique) (n=3).

Quelles que soient les conditions expérimentales (physiologique et pathologique), nos résultats montrent, après 4h d'intoxication avec les NPs FW2, une augmentation significative des ERO de manière concentration-dépendante (résultats non montrés). Lorsque les cellules HPAEC sont placées en conditions pathologiques qui miment l'HTP, on observe, pour toutes les concentrations étudiées, une augmentation significative de la production d'ERO par rapport aux cellules témoins (condition physiologique) (fig. 3). L'ensemble de ces résultats montre que ce modèle *in vitro* devrait permettre, d'une part, de mimer la dynamique vasculaire observée *in vivo* dans l'HTP et, d'autre part, d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires des particules atmosphériques sur les cellules cibles vasculaires pulmonaires.

4. CONCLUSION

Ce modèle *in vitro* semble donc être pertinent pour étudier l'impact des particules atmosphériques sur les HPAEC et devrait nous permettre d'évaluer si l'exposition aux particules pourrait constituer un facteur de risque dans l'exacerbation de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTP.

5. REFERENCES

- Calderón-Garcidueñas, L., Vincent, R., Mora-Tiscareño, A., Franco-Lira, M., Henríquez-Roldán, C., Barragán-Mejía, G., Garrido-García, L., Camacho-Reyes, L., Valencia-Salazar, G., Paredes, R., Romero, L., Osnaya, H., Villarreal-Calderón, R., Torres-Jardón, R., Hazucha, M.J., Reed, W. (2007). Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. *Environ Health Perspect.*, 115,1248-53.
- Courtois, A., Andujar, P., Ladeiro, Y., Ducret, T., Rogerieux, F., Lacroix, G., Baudrimont, I., Guibert, C., Roux, E., Canal-Raffin, M., Brochard, P., Marano, F., Marthan, R., Muller, B. (2010). Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 245, 203-10.
- Ducret, T., El Arrouchi, J., Courtois, A., Quignard, J.F., Marthan, R., Savineau, J.P. (2010). Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium.* 48, 251-9.
- Freund-Michel, V., Guibert, C., Dubois, M., Courtois, A., Marthan, R., Savineau, J.P., Muller, B. (2013). Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther Adv Respir Dis.* 7, 175-200.
- Izikki, M., Guignabert, C., Fadel, E., Humbert, M., Tu, L., Zadigue, P., Dartevelle, P., Simonneau, G., Adnot, S., Maitre, B., Raffestin, B., Eddahibi, S.(2009). Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest.*, 119, 512-23.
- Knuckles, T.L., Buntz, J.G., Paffett, M., Channell, M., Harmon, M., Cherng, T., Lucas, S.N., McDonald, J.D., Kanagy, N.L., Campen, M.J. (2011). Formation of vascular S-nitrosothiols and plasma nitrates/nitrites following inhalation of diesel emissions. *J Toxicol Environ Health A.*, 74, 828-37.
- Miller, M.R., Raftis, J.B., Langrish, J.P., McLean, S.G., Samutrtai, P., Connell, S.P., Wilson, S., Vesey, A.T., Fokkens, P.H.B., Boere, A.J.F., Krystek, P., Campbell, C.J., Hadoke, P.W.F., Donaldson, K., Cassee, F.R., Newby, D.E., Duffin, R., Mills, N.L. (2017). Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano.*11, 4542-4552.
- Nemmar, A., Holme, J.A., Rosas, I., Schwarze, P.E., Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the *in vivo* and *in vitro* studies. *Biomed Res Int.*, 279371.
- Newby, D.E., Mannucci, M., Tell, S.G., Baccarelli A.A., Brook, R. D., Donaldson, K., Forastiere, F., Franchini, M., Franco, O.H., Graham, I., Hoek, G., Hoffmann, B., Hoylaerts, M.F., Künzli, N., Mills, N., Pekkanen, J., Peters, A., Piepoli, M.F., Rajagopalan, S., Storey, R.F. (2015). Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 36, 83-93.

Ce travail est soutenu par la "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM) et le "Fond de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire"