

Modèles bronchiques pour la compréhension du mécanisme d'action des polluants atmosphériques



Pr Armelle BAEZA-SQUIBAN



- ❑ Les polluants atmosphériques
- ❑ L'appareil respiratoire: ses spécificités
- ❑ L'évaluation de la toxicité respiratoire des polluants
- ❑ Des modèles biologiques représentatifs *in vitro*
- ❑ Mécanismes d'action identifiés



Les principales catégories de polluants de l'air ambiant et intérieur

Gaz : SO_2 , NO_x , O_3 ,

COV: composés organiques volatils

Particules

COV:

Acétaldéhyde
Formaldéhyde
Hexaldéhyde
Toluène
Xylène





Les principales catégories de polluants de l'air ambiant et intérieur

Gaz : SO_2 , NO_x , O_3 ,....

COV: composés organiques volatils

COV:

Acétaldéhyde
Formaldéhyde
Hexaldéhyde
Toluène
Xylène

Particules

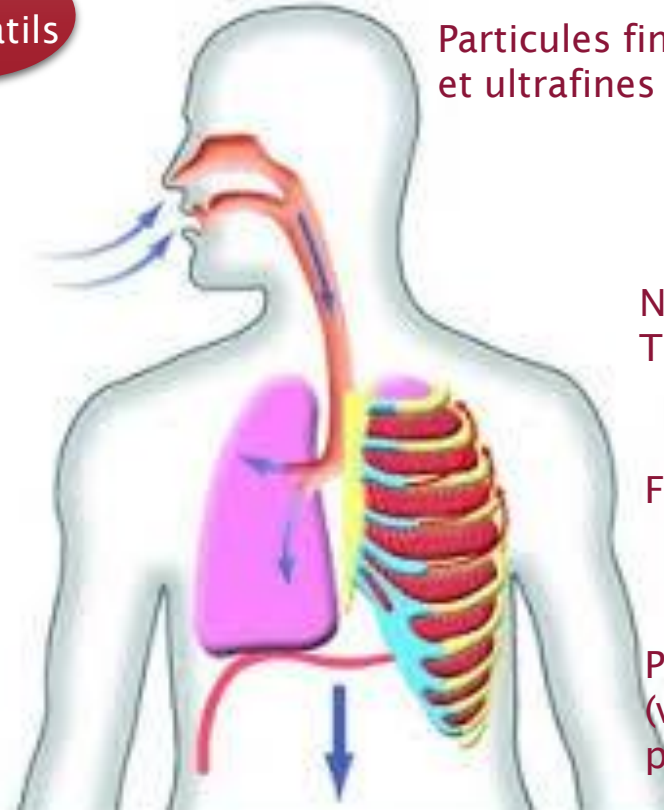
Particules fines ($\text{PM}_{2.5}$)
et ultrafines ($\text{PM}_{0.1}$)

	Moyenne annuelle
PM_{10}	$40 \mu\text{g}/\text{m}^3$
$\text{PM}_{2.5}$	$25 \mu\text{g}/\text{m}^3$

Nanoparticules manufacturées
 TiO_2 , SiO_2 , NTC.....

Fibres minérales
(amiante, 5f /L)

Particules biologiques
(virus, bactéries,
pollens...)

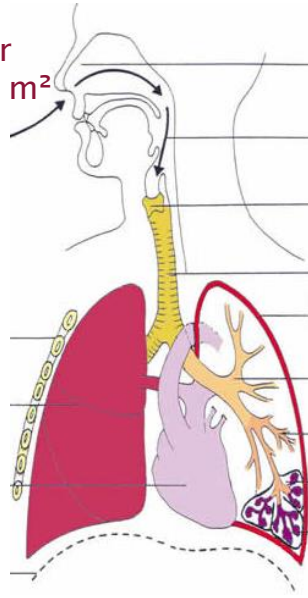
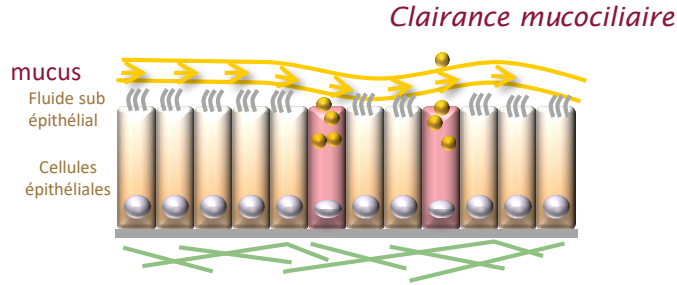




L'appareil respiratoire: cible et voie d'entrée des polluants de l'air

15 m³ d'air inhalé/jour
Surface alvéolaire 100 m²

Voies aériennes





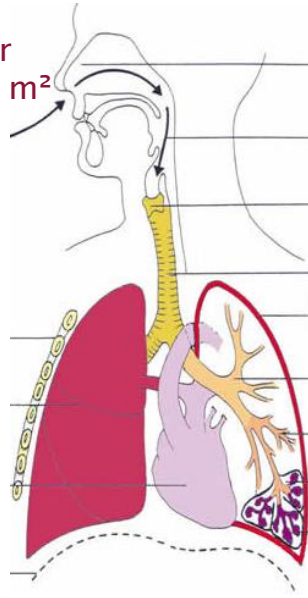
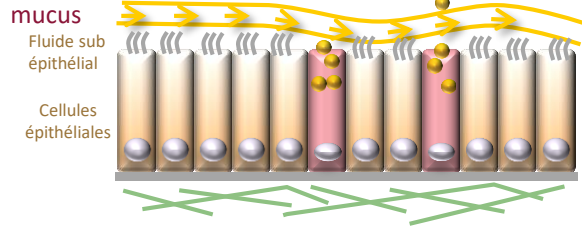
L'appareil respiratoire: cible et voie d'entrée des polluants de l'air

6

15 m³ d'air inhalé/jour
Surface alvéolaire 100 m²

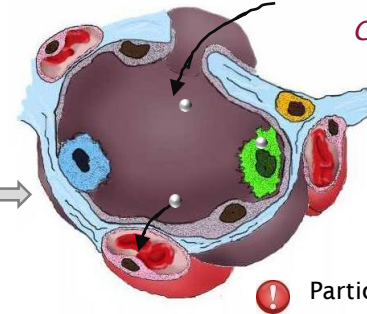
Voies aériennes

Clairance mucociliaire



Alvéoles

Clairance macrophagique



Particules ultrafines, nanoparticules

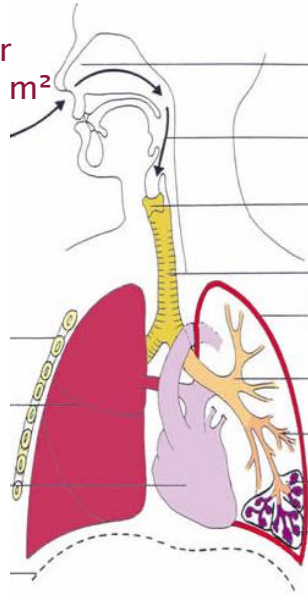
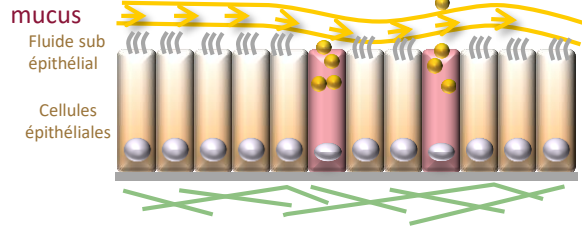


L'appareil respiratoire: cible et voie d'entrée des polluants de l'air

15 m³ d'air inhalé/jour
Surface alvéolaire 100 m²

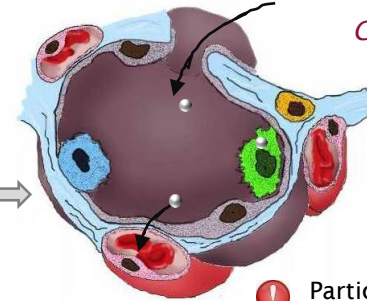
Voies aériennes

Clairance mucociliaire



Alvéoles

Clairance macrophagique



Particules ultrafines, nanoparticules

	Gaz/COV	Particules
Région naso-pharyngée	Vapeurs d'acide	5 à 30 µm
Arbre trachéo-bronchique	Composés solubles (SO ₂ , formaldéhyde)	1 à 5 µm
Alvéoles	Composés peu solubles (O ₃ , NOx, benzène)	1 µm

- ➡ Action locale
- ➡ Voie d'entrée

Exposition contrôlée de volontaires (sains, malades)

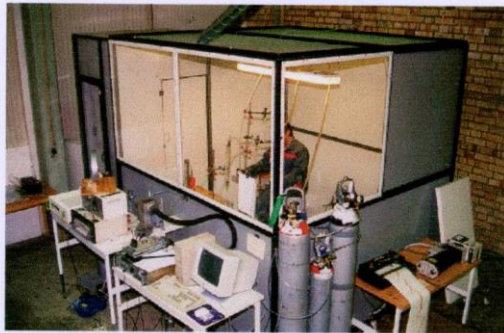
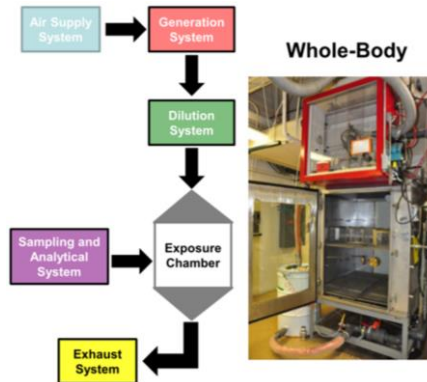


Figure 4. Exposure chamber for controlled exposure with diluted diesel exhaust. PM, Nox, O₃

Inhalation corps entier

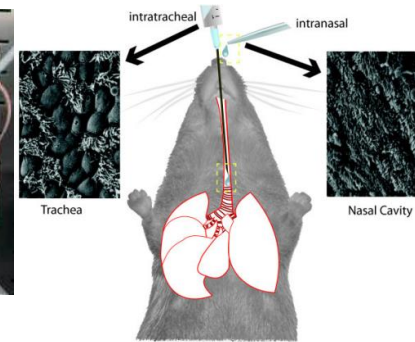


Etudes chez l'animal

Inhalation nez seulement



instillation



Exposition contrôlée de volontaires (sains, malades)

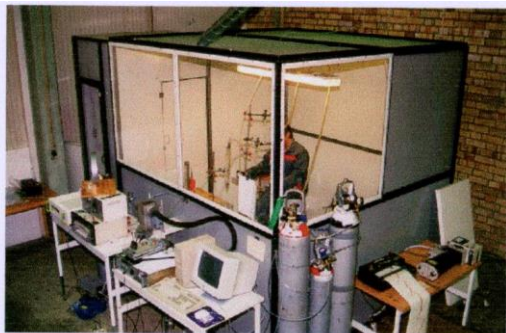
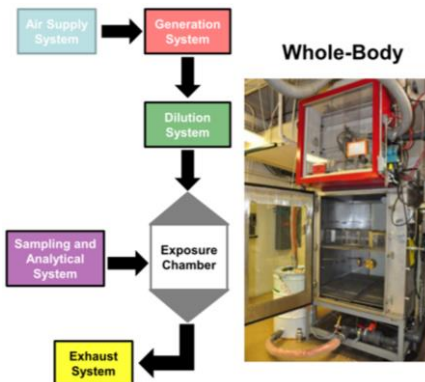


Figure 4. Exposure chamber for controlled exposure with diluted diesel exhaust.

PM, Nox, O₃

Inhalation corps entier

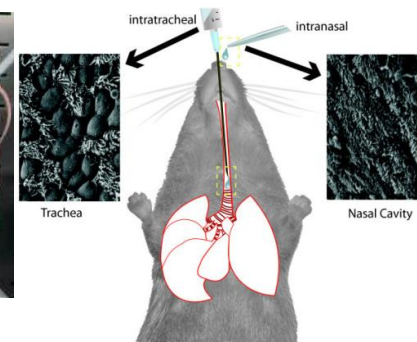


Etudes chez l'animal

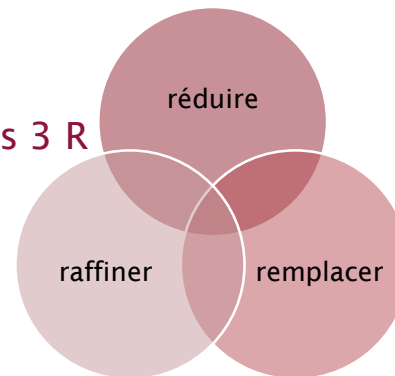
Inhalation nez seulement



instillation



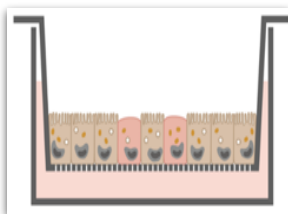
Respect des 3 R



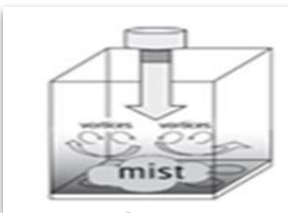
➡ Caractériser et reproduire les atmosphères



Les challenges de l'évaluation de la toxicité des polluants inhalés, *in vitro*



Modèles biologiques
représentatifs



Mimer l'exposition par la voie
respiratoire



un environnement complexe à
recréer (gaz + particules,
contaminants biologiques)



Étudier les effets chroniques



- Cellules épithéliales nasales, bronchiques, alvéolaires
- Macrophages

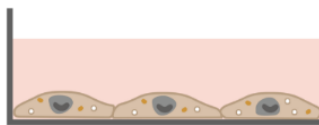


Des modèles biologiques représentatifs (1)

- Cellules épithéliales nasales, bronchiques, alvéolaires
- Macrophages

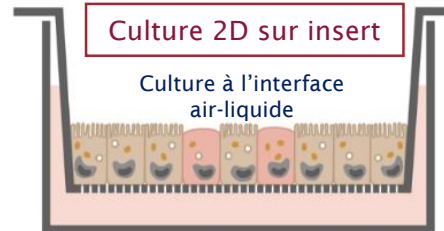
- Lignées cellulaires:
 - 16HBE, BEAS-2B, NCI-H291, Calu-3....
 - A549, hAELVi, NCI-H441..

Culture 2D sur plastique

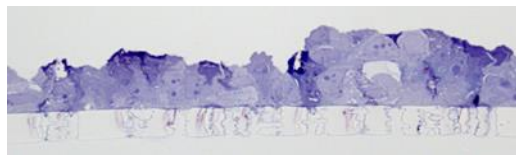


Culture 2D sur insert

Culture à l'interface air-liquide

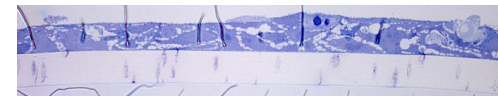


Calu-3



Sanchez-Guzman et al, Sci reports, 2021

hAELVi, type 1



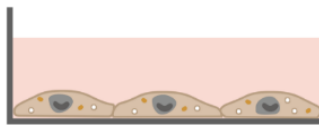
Brookes et al, Plos one, 2021



Des modèles biologiques représentatifs (1)

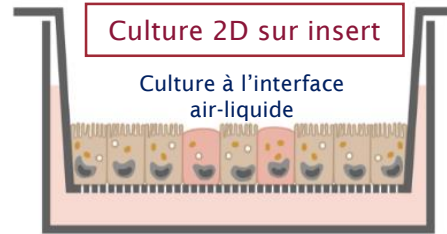
- Cellules épithéliales nasales, bronchiques, alvéolaires
- Macrophages

Culture 2D sur plastique



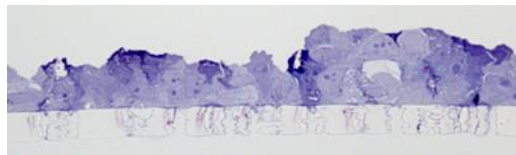
Culture 2D sur insert

Culture à l'interface air-liquide



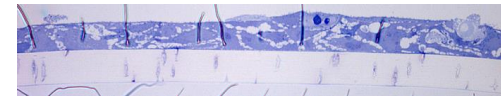
- Lignées cellulaires:
 - 16HBE, BEAS-2B, NCI-H291, Calu-3....
 - A549, hAELVi, NCI-H441..
- Cultures primaires
Production d'épithéliums bronchiques, bronchiolaires, alvéolaires
- Co-cultures (fibroblastes, cellules endothéliales)

Calu-3



Sanchez-Guzman et al, Sci reports, 2021

hAELVi, type 1

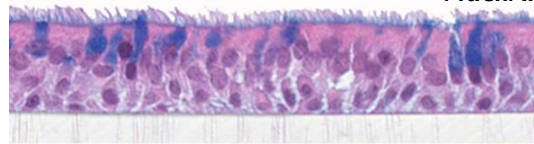


Brookes et al, Plos one, 2021

Épithéliums sains ou pathologiques



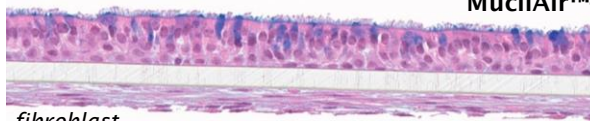
MucilAir™



SmallAir™



MucilAir™-HF



fibroblast



EpiAlveolar™



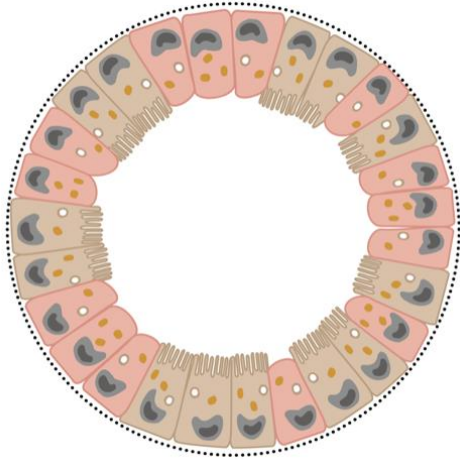
fibroblast

Alveolar Epithelial cell

Endothelial cell

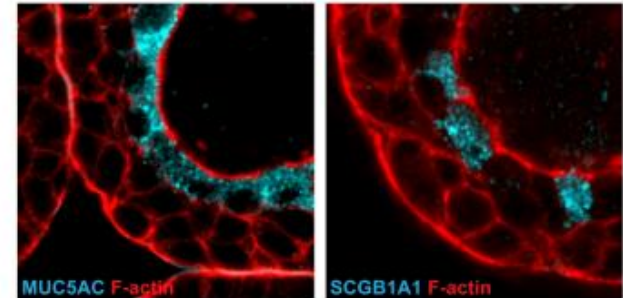
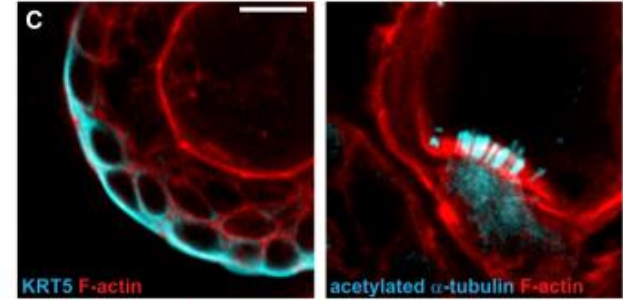
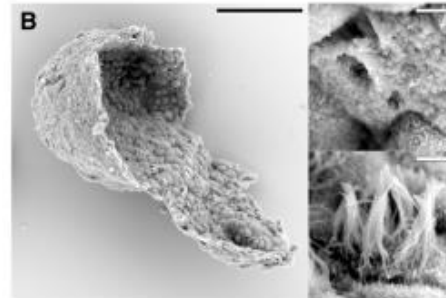
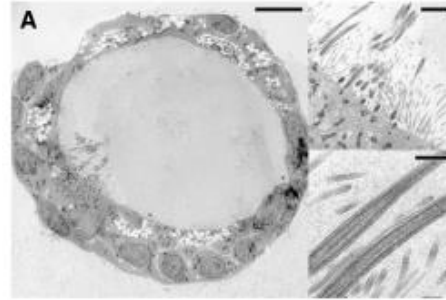
50 μm

Culture 3D organoïde



A partir

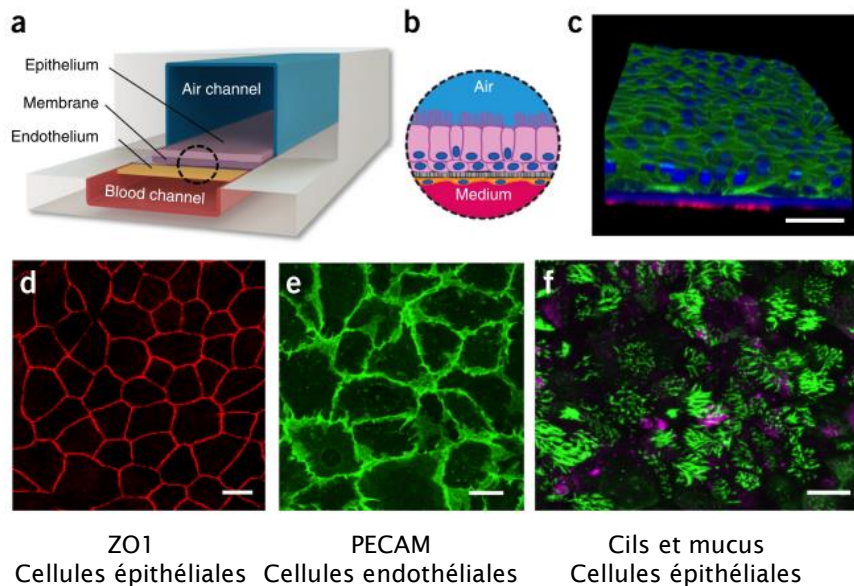
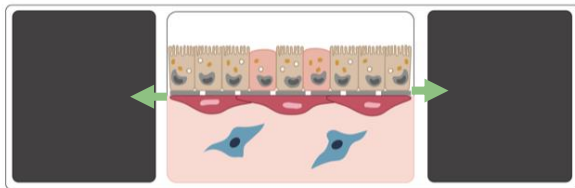
- de cellules primaires
- d'iPSC





Des dispositifs pour reproduire les forces d'étirement

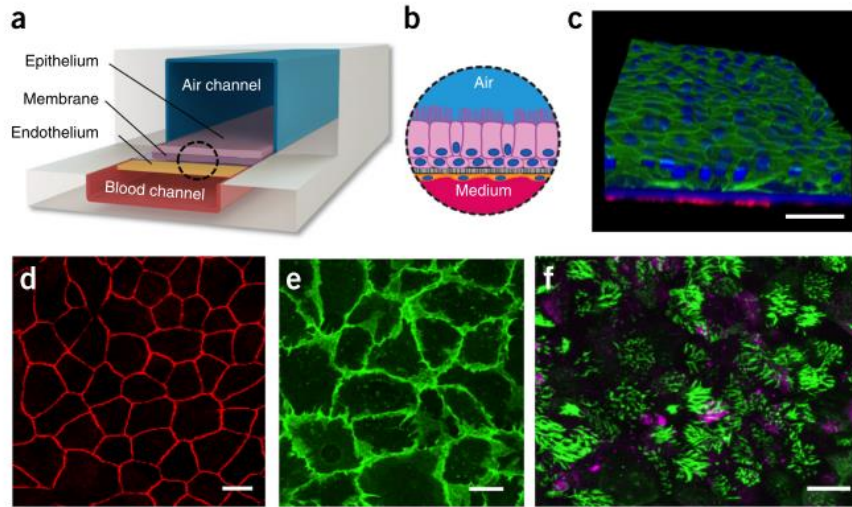
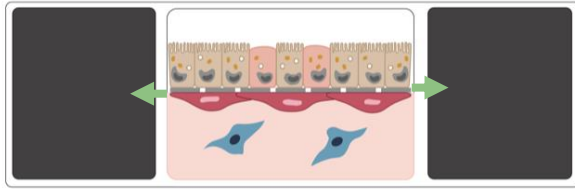
Co-culture en dispositif microfluidique





Des dispositifs pour reproduire les forces d'étirement

Co-culture en dispositif microfluidique

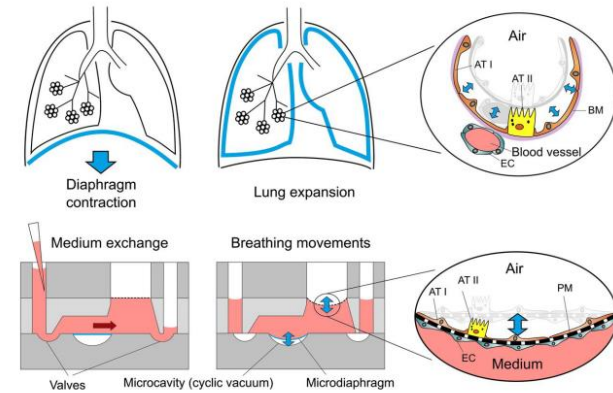


ZO1
Cellules épithéliales

PECAM
Cellules endothéliales

Cils et mucus
Cellules épithéliales

AlveoliX
In-vitro models inspired by nature



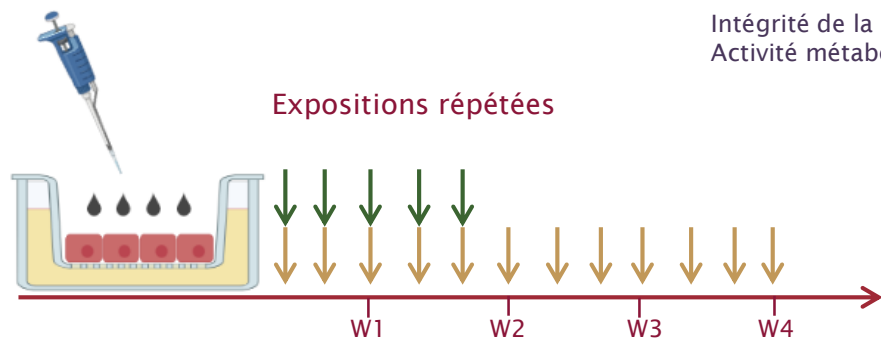
Primary human alveolar epithelial cells
(hAEPcs)

Membrane 3,5 μm , pores $\varnothing$ 3 μm
Endothelial cells

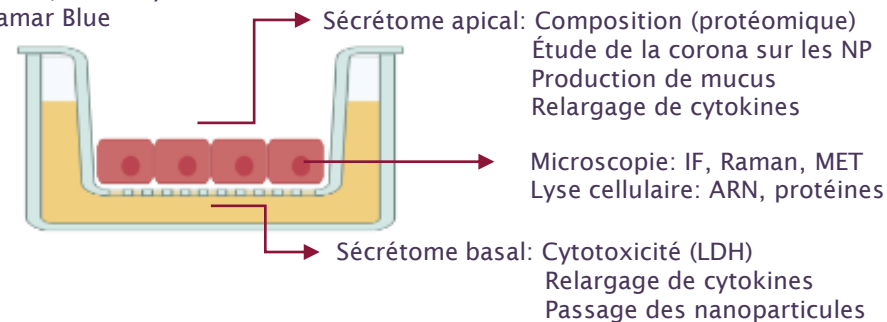


Exposition aux particules en semi-interface Air-Liquide (ALI)

➞ Vers l'évaluation de la toxicité chronique



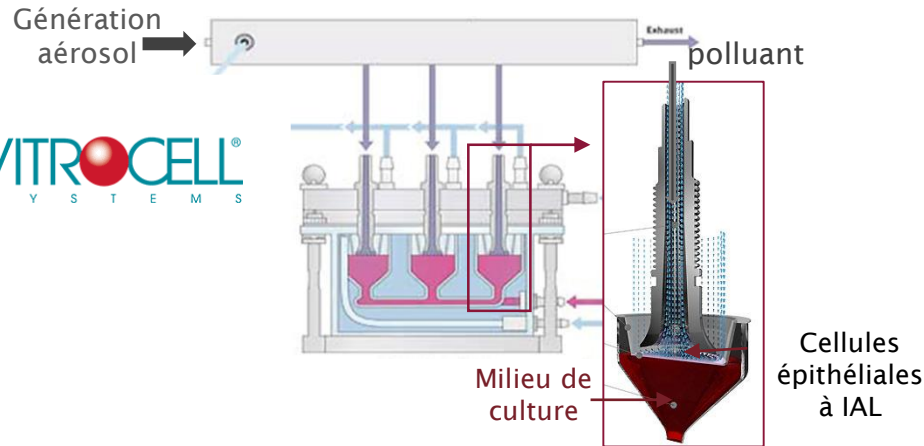
Intégrité de la barrière: TEER, Lucifer yellow
Activité métabolique: Alamar Blue





Des dispositifs pour procéder aux expositions aux polluants

Exposition à l'interface Air-Liquide (ALI) en dynamique (avec un flux d'air)



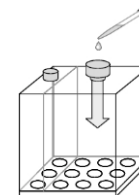
Exposition à l'interface Air-Liquide (ALI) en statique (par déposition)

Cloud™ : chambre unique pouvant accueillir de 3 à 6 inserts

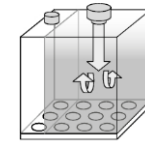
VITROCELL® Cloud



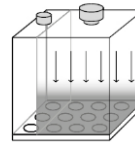
nebulization of
solutions and
suspensions



Phase 1:
Emission of
Cloud



Phase 2:
Homogeneous
Mixing



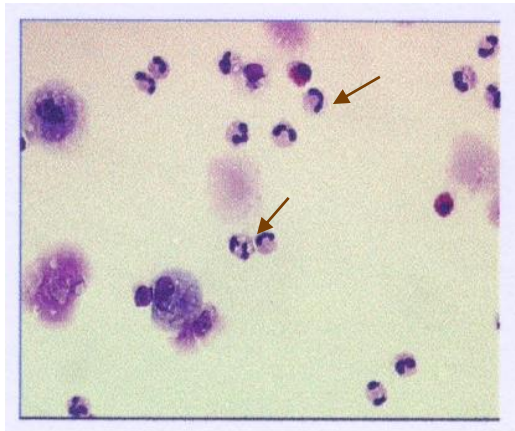
Phase 3:
Gravitational
Settling



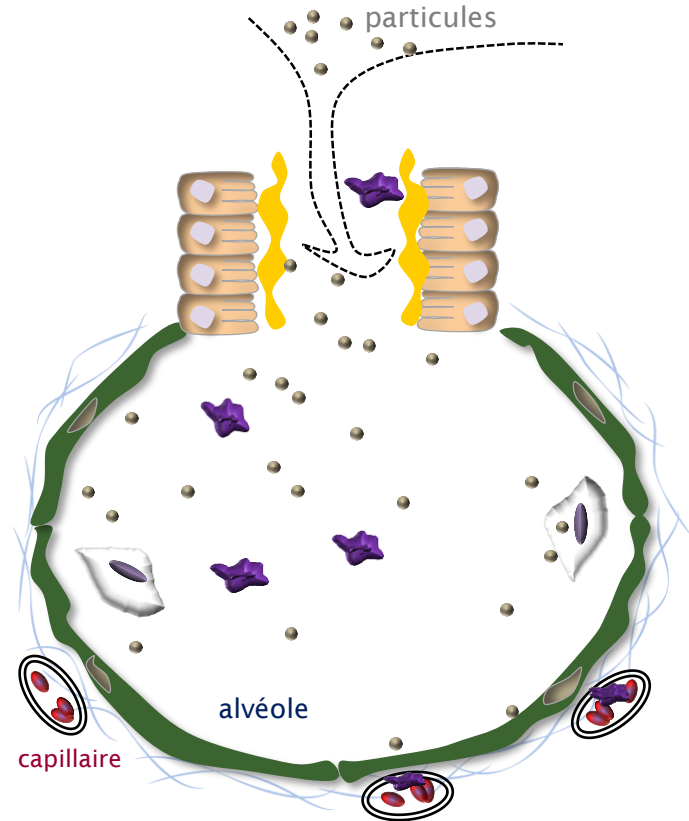
Epidémiologie: lien entre exposition aux PM et effets sanitaires

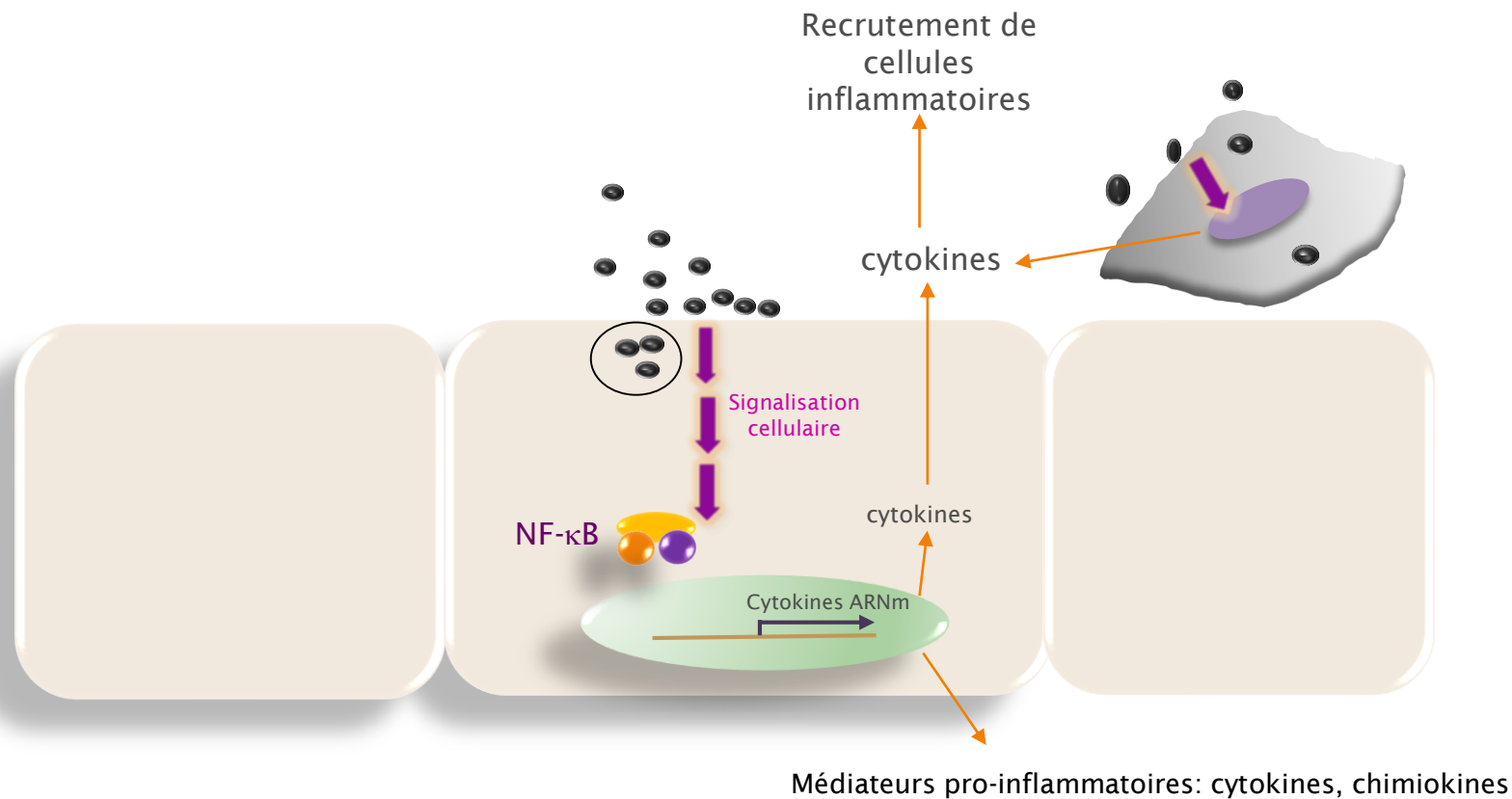
Etudes *in vivo*:

- Infiltration par cellules immunitaires (neutrophiles)
- Libération de médiateurs pro-inflammatoires

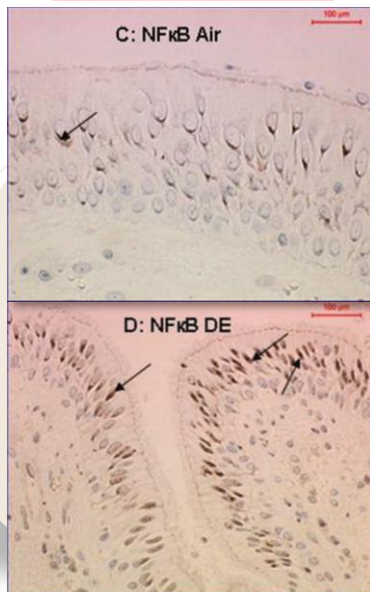


Lavage bronchoalvéolaire

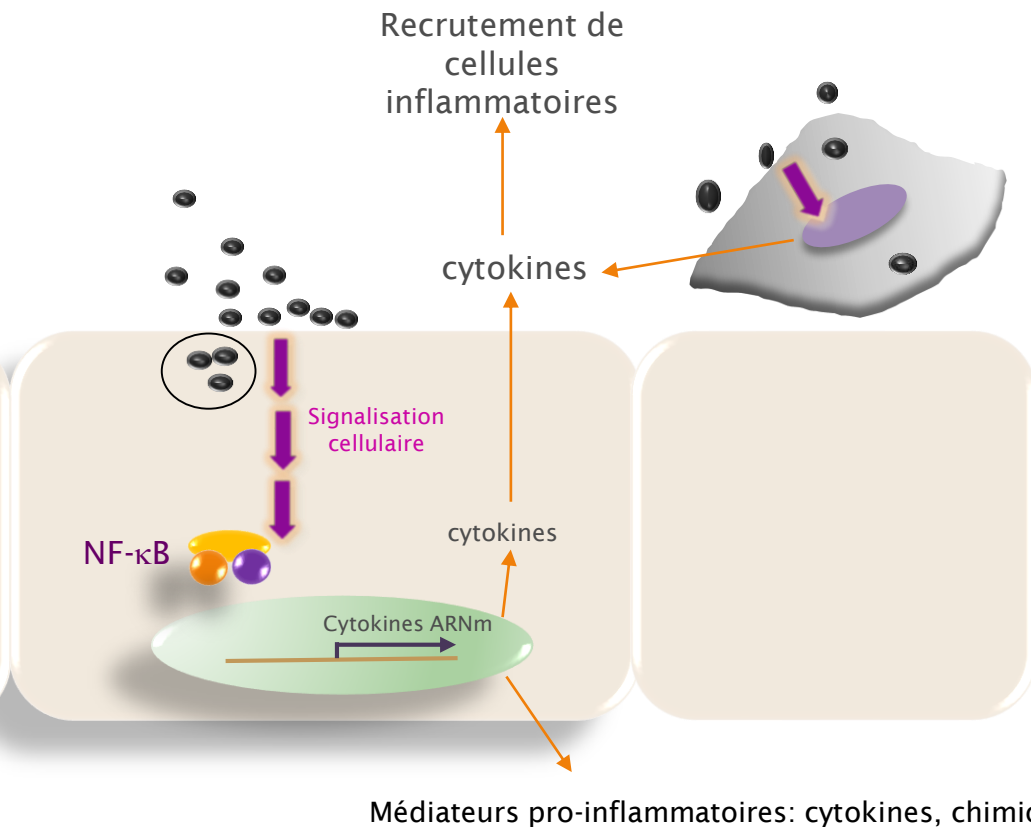




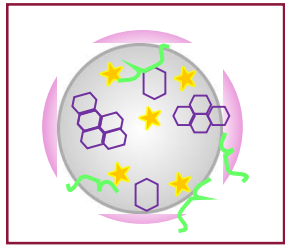
Expo humaine
DEP: 300µg/m³
1h expo
Fixation 6h post-expo



Pourazar et al., AJP, 2005



Rôle du stress oxydant



Cœur carboné



Composés biologiques
(endotoxines....)



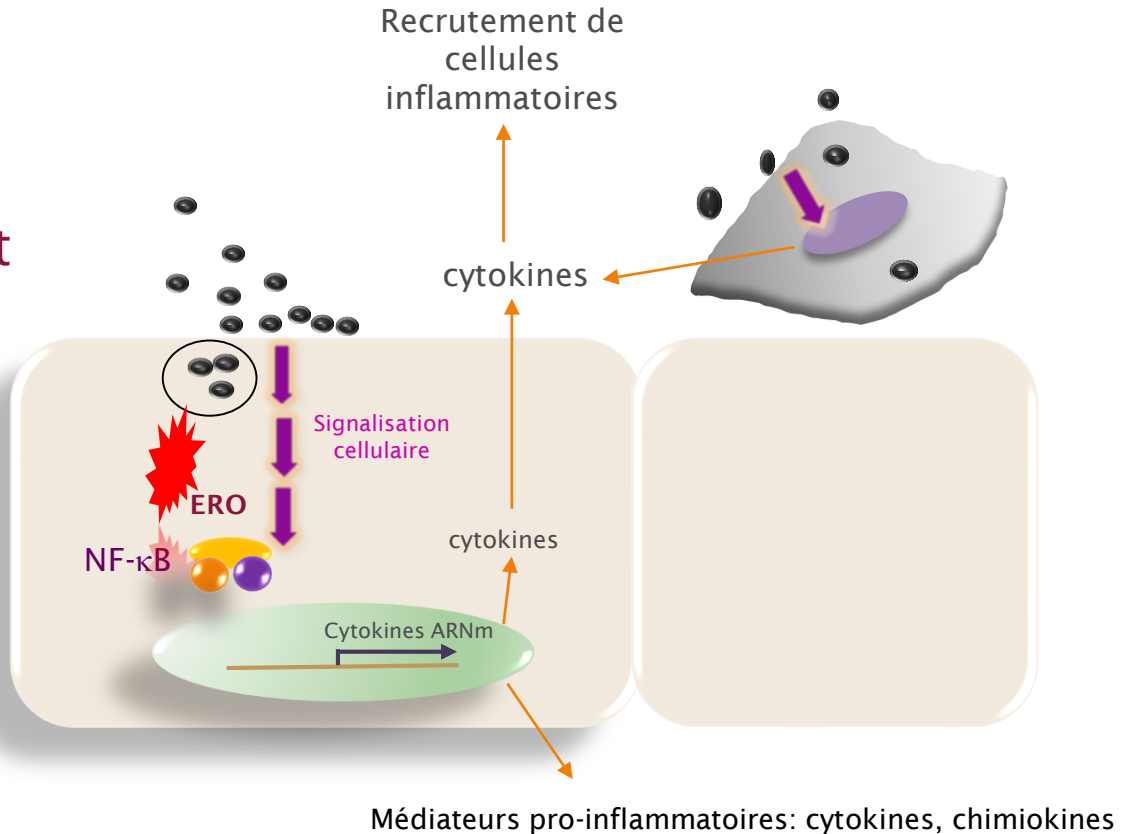
Ions (sulfates, nitrates)



Métaux

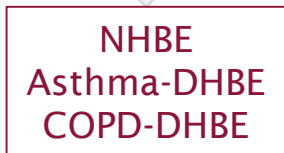


Composés organiques

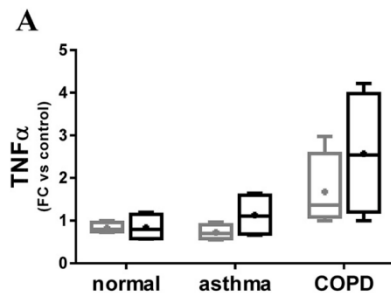




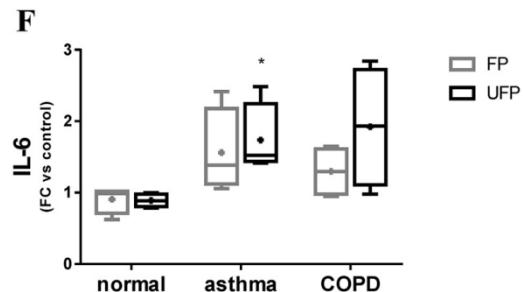
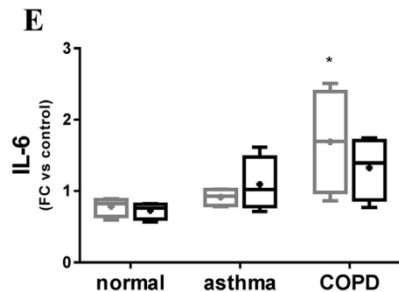
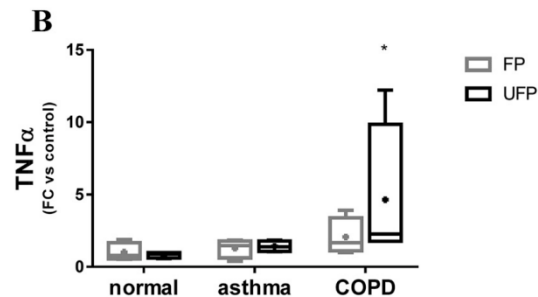
1 exposition
3 expositions



1 exposition



3 expositions



Lonza

- Disponibilité de lignées et de cultures primaires pour les différents niveaux de l'appareil respiratoire
- Une grande diversité de modèles (2D - 3D – microfluidique) à sélectionner en fonction des questions de recherche posées
- Des outils disponibles commercialement pour exposer les cellules à des gaz/COV et aérosols
- Possibilité d'étudier les expositions répétées et les effets à moyen/long terme
- Ont permis de préciser le mécanisme d'action des particules inhalées