Interactions uranium - cellule cible : exemple de la transformation de particules d' UO_4 dans le macrophage alvéolaire

M.H. HENGÉ-NAPOLI*, E. ANSOBORLO*. V. CHAZEL*,
R. GIBERT*, P. HOUPERT*, F. PAQUET*, L. ZHANG**

(Manuscrit reçu le 17 mars 1997, révisé le 23 juin 1997, accepté le 30 août 1997)

RÉSUMÉ

La compréhension des mécanismes intervenant dans la dissolution *in vivo* des particules inhalées est une étape nécessaire pour modéliser les paramètres de la transférabilité d'un composé. Dans cette optique, nous avons étudié la transformation intracellulaire de particules d' UO_4 . Ce composé est rencontré dans le cycle du combustible et il existe très peu de données à son sujet. Les observations ont été effectuées sur macrophages alvéolaires de rats obtenus par lavage broncho-alvéolaire et sur coupes pulmonaires après instillation de particules d' UO_4 . Dans les deux cas, nous avons pu observer que les particules se désagrègent très rapidement en particules ultrafines et que, dans certains cas, ce mécanisme est accompagné par la formation d'un précipité sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle. Ce phénomène intervient très précocement, dès les premières 24 heures suivant l'instillation. Quelques observations ont été effectuées 24 heures après phagocytose *in vitro* et fixation des macrophages directement sur la boîte de culture. Elles ont permis en particulier de confirmer l'action corrosive exercée par les macrophages sur les particules d' UO_4 .

ABSTRACT

Interactions between uranium and target cells: example of UO_4 particle transformation within alveolar macrophages.

The understanding of the mechanisms involved in the *in vivo* dissolution of inhaled particles is necessary to improve the model for determining the absorption parameters of a compound and to compute its parameters. With that perspective, the intracellular transformation of UO_4 particles has been investigated. Indeed, very few is known about this compound encountered in the nuclear fuel cycle. After instillation of UO_4 particles in rats, alveolar macrophages and lung tissues have been observed. The particles break up very quickly in ultrafine particles and, in some cases, this mechanism is accompanied by the formation of uranyl phosphate needles. This phenomenon takes place at very early stage, i.e. within the first 24 hours after the instillation. Particles phagocytised by macrophages *in vitro* have been observed after inclusion of the cells directly on the culture dish. These observations have confirmed the corrosive action exerted by the macrophages on the UO_4 particles.

* Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, département de protection de la santé de l'homme et de dosimétrie, service de dosimétrie, IPSN, BP. 38, 26701 Pierrelatte Cedex, France.

** CNRS, Université de Paris XI, Laboratoire de physique des solides, Faculté des sciences, 91405 Orsay Cedex.

1. Introduction

L' UO_4 est un des nombreux composés que l'on peut rencontrer dans l'industrie nucléaire. Il est obtenu, pendant le cycle d'enrichissement de l'uranium, après oxydation et acidification de déchets d' UO_2 et d' U_3O_8 . Le procédé conduit à l'obtention de nitrate d'uranyle qui est ensuite précipité au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 pour former un tetroxyde d'uranium hydraté, $\text{UO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Cet UO_4 est ensuite séché et réduit en UO_3 puis en UO_2 , réutilisable dans la fabrication des pastilles de combustible. Il n'existe à l'heure actuelle que très peu de données biocinétiques sur ce composé.

Les nouvelles recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR 66) (ICRP, 1994) soulignent l'importance de la modélisation de la clairance des particules inhalées et décrivent les trois voies d'épuration pulmonaire : le transfert des particules dissoutes vers le sang, l'élimination par voie gastro-intestinale des particules ayant suivi la remontée mucociliaire et l'accumulation dans les nodules lymphatiques. Dans ce nouveau modèle pulmonaire, les paramètres cinétiques de transfert vers le sang jouent un rôle prépondérant pour le classement des particules suivant les types F, M, ou S proposés par la CIPR 66. Ils décrivent en effet la fraction rapidement dissoute (f_r) et les taux de transfert rapide (s_r) et lent (s_s) vers le sang, ainsi que la fraction du composé dite liée (f_b) et son taux de transfert (s_b). Ces paramètres, qui résultent en partie de l'action des macrophages sur les particules présentes dans l'espace alvéolaire, sont déterminés à l'aide de tests *in vitro* et surtout d'études *in vivo* sur la cinétique d'épuration pulmonaire après dépôt de particules. La publication 66 de la CIPR recommande, chaque fois que cela est possible, d'utiliser les Doses Par Unité d'Incorporation spécifiques des composés. Il faut donc, pour chaque composé, déterminer les paramètres décrivant sa cinétique d'épuration pulmonaire. Dans ce contexte, les études *in vitro* prennent toute leur importance. Elles fournissent rapidement les données concernant la solubilité du produit et limitent le recours aux études *in vivo* en permettant de mieux les cibler. Du fait du rôle important joué par les macrophages alvéolaires, il est utile de comprendre leur mécanisme d'action sur la transformation des composés inhalés, afin de pouvoir modéliser leur effet.

De nombreuses études ont été effectuées sur le rôle joué par les macrophages alvéolaires sur la transformation des métaux. Les macrophages peuvent augmenter la solubilité du composé, ainsi que cela a été observé pour l'oxyde de cobalt (Kreyling *et al.*, 1990) ou certains composés de l'arsenic (Marafante *et al.*, 1987). Ils peuvent au contraire le concentrer dans leurs lysosomes sous forme d'un précipité insoluble. Ce second mécanisme a en particulier été observé pour l'aluminium, le cérium et le chrome, (Berry, 1996) et pour l'uranium (Hengé-Napoli *et al.*, 1994, 1996; Ansoborlo *et al.*, 1992; Poncy *et al.*, 1992). Dans le cas d'oxydes très peu solubles d'uranium tels que UO_2 ou U_3O_8 (Hengé-Napoli *et al.*, 1994, 1996), on a pu observer soit une dissolution partielle

du composé suivie d'une précipitation immédiate dans les lysosomes. Au contraire, lorsque l'uranium est administré sous une forme très soluble telle que le nitrate d'uranyle, les macrophages le concentrent partiellement sous forme d'un précipité dans leurs lysosomes (Berry *et al.*, 1988). Ce mécanisme tend à limiter la transférabilité du composé.

Nous avons étudié la biocinétique et la transformation dans des macrophages alvéolaires de rats d'un oxyde d'uranium sur lequel il existe peu de données bibliographiques : l' UO_4 . Ce composé est obtenu après acidification de déchets d' UO_2 et d' U_3O_8 et précipitation par H_2O_2 . La transférabilité de ce composé déterminée *in vivo* après instillation du composé à des rats est de 43,5% pendant les premières 24 heures puis la cinétique de transférabilité ralentit pour atteindre un total dissous de 74% du dépôt initial au bout de 90 jours.

Afin d'évaluer le rôle joué par les macrophages alvéolaires dans la transformation d' UO_4 , nous avons étudié l'évolution morphologique (en microscopie électronique en transmission) et chimique (à l'aide d'une technique de microanalyse de dispersion d'énergies) le devenir de particules d' UO_4 phagocytées *in vivo* à la suite d'un dépôt intratrachéal. Des observations ont également été effectuées après exposition *in vitro* de macrophages aux particules d' UO_4 et fixation des cellules directement sur la boîte de culture.

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux

Les instillations et les prélèvements de macrophages alvéolaires ont été effectués sur des rats mâles Sprague Dawley Ico OFA-SD (IOPS-Caw) pesant approximativement 300 g. L'eau et la nourriture étaient distribuées *ad libitum*.

2.2. Préparation des échantillons d'uranium

Les échantillons d' UO_4 ont été prélevés aux postes de travail. La poudre a été broyée à l'aide d'un broyeur Retsch puis reprise dans l'éthanol et décantée. Les particules obtenues après filtration du surnageant ont un diamètre inférieur à 1 μm .

2.3. Exposition des macrophages à l' UO_4

Les cellules ont été exposées à l'uranium soit *in vitro*, soit *in vivo* après instillation intratrachéale.

2.3.1. Exposition *in vitro*

Les macrophages ont été obtenus par lavage bronchoalvéolaire selon une technique précédemment décrite (Hengé-Napoli *et al.*, 1994) et mis en culture en boîte de pétri dans du milieu 199 additionné de 5 % d'Approsera. Un dépôt de 40 μg de particules par million de cellules a été effectué dans le milieu de culture. La suspension de particules a été préalablement homogénéisée aux ultrasons pendant 10 minutes. 1 heure 30 plus tard, le milieu de culture contenant les particules non phagocytées et les cellules non adhérentes a été remplacé par du milieu neuf. Après 24 heures de culture, le surnageant a été éliminé et les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde, traitées à l'osmium et déshydratées par passages successifs à l'alcool puis incluses dans de l'épon directement sur la boîte de culture.

2.3.2. Instillation

500 μg d' UO_4 en suspension dans une solution de NaCl à 0,9 % ont été administrés aux animaux par instillation intratrachéale. La suspension était homogénéisée aux ultrasons pendant 10 minutes immédiatement avant l'instillation de façon à disperser les agrégats.

2.4. Préparation des échantillons biologiques

Les animaux ont été sacrifiés par exanguination après injection intrapéritonéale de 500 mg kg^{-1} de pentobarbital sodique (Sanofi). Deux types de tissus ont été étudiés : les cellules obtenues par lavage broncho-alvéolaire et les coupes de poumon.

Les macrophages alvéolaires obtenus après centrifugation du liquide de lavage pendant 10 minutes à 800 g sont fixés au glutaraldéhyde à 1 % dans un tampon cacodylate à pH 7,2 pendant 1 heure puis post-fixés au tétroxyde d'osmium avant d'être inclus dans de l'épon. Les coupes ultrafines réalisées (environ 65 nm) sont déposées sur grilles de cuivre et n'ont pas été colorées.

Les poumons sont fixés par injection *in situ* de glutaraldéhyde avant d'être prélevés ; ils sont ensuite préparés suivant la même technique que celle décrite ci-dessus.

2.5. Observation et analyse des échantillons

La taille et la forme des particules initiales ont été observées en microscopie à balayage (JEOL JSM-35 CF). L'analyse chimique a été effectuée par spectrométrie de dispersion d'énergies (TRACOR Northern, TN-5400).

L'ultrastructure des coupes de poumons et des coupes de macrophages a été étudiée en microscopie électronique en transmission (PHILIPS, CM 120 Bio-twin) à une tension d'accélération de 80 kV.

La composition chimique des particules a été analysée à l'aide d'une microsonde couplée à un microscope électronique en transmission (CAMEBAX). Les cristaux utilisés, pentaerythritol, phtalate d'acide de thallium et fluorure de lithium, permettent d'étudier les longueurs d'ondes des émissions X caractéristiques des éléments de numéro atomique supérieur à 11.

3. Résultats

3.1. Morphologie des particules

Fig. 1. – Particule d' UO_4 ($\times 5400$) - Microscopie électronique à balayage.

UO_4 particle ($\times 5400$) - Scanning electron microscopy.

Les particules, initialement agrégées sous forme de sphères (Fig. 1), ont, après homogénéisation aux ultrasons, l'aspect de petits cristaux allongés d'environ 500 nm.

Fig. 2. – Coupe pulmonaire observée 48 h après instillation (x 7000).

Lung slide 48h after instillation (x 7000).

Fig. 3. - Particules d' UO_4 dans un macrophage alvéolaire ($\times 27\ 000$).

UO_4 particles in a macrophage ($\times 27\ 000$).

3.1.1. Études *in vivo*

Les observations effectuées sur macrophages alvéolaires obtenus par lavage et sur coupes pulmonaires ont montré au bout de 24 heures que des amas de particules sont concentrés dans des phagosomes (Fig. 2). Dans certaines cellules, les particules semblent pulvérisées en fragments très fins (Fig. 3).

Fig. 4. – Lysosome contenant des aiguilles d'uranyle dans un macrophage observé sur une coupe pulmonaire 24 heures après instillation (x 37 000).

Lysosome containing uranyl needles within a macrophage observed on a lung slide 24 hours after instillation (x 37 000).

Dans d'autres macrophages, on a pu observer dès les premières 24 heures la présence d'aiguilles dont l'analyse X montre qu'elles étaient constituées d'uranium, alors que la cellule ne contient plus du tout de cristaux d'uranium sous leur forme initiale (Fig. 4). Les observations faites sur les coupes de poumons 48 heures après instillation ont permis d'observer un certain nombre de particules encore intactes et des lysosomes secondaires contenant des aiguilles d'uranium en forme « d'oursin ».

12 jours après l'instillation, on observe encore sur les échantillons la présence de particules encore non modifiées et/ou de précipités sous forme d'aiguilles dans certains macrophages.

3.1.2. Études *in vitro*

La Photo 5, réalisée sur les cellules cultivées *in vitro* et fixées directement sur la boîte de culture, montre une particule phagocytée par deux macrophages simultanément. On peut observer que la particule se fragmente principalement à ses deux extrémités, dans les cellules. On n'observe pas encore à ce stade de précipité sous forme d'aiguille.

3.2. Analyse

L'analyse de la composition chimique des particules initiales a montré la présence d'un mélange d' $\text{UO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sous forme orthorhombique et d' $\text{UO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sous forme monoclinique.

Des spectres d'émission X ont été obtenus sur des particules non encore transformées présentes dans les macrophages 24 heures après instillation. Ils n'ont pas permis de mettre en évidence de signal dû à la présence de phosphore. Les spectres obtenus sur les aiguilles d'uranium en forme d'oursin présentes dans les macrophages 5 jours après l'instillation ont au contraire confirmé la présence d'un pic dû au phosphore. Les résultats sont regroupés dans le tableau I.

On peut donc en conclure que les différences morphologiques observées reflètent bien une modification de composition chimique.

TABLEAU I

Résultats de microanalyse X (Camebax, en nombre de coups).

Results of microanalysis investigations (Camebax, in number of counts).

<i>Échantillon</i>	URANIUM (Mα)	PHOSPHORUS (Kα)
Particules	146	5
24 heures après instillation	154 170	8 7
Structure en forme « d'oursin » 5 jours après instillation	48 44 22	144 130 145

Bruit de fond : 3 à 8 coups/5 secondes. (Temps de comptage : 5 secondes).

4. Discussion

Diverses études ont déjà montré que les macrophages jouent un rôle important dans la transformation intrapulmonaire des particules inhalées, en particulier en précipitant certains oxydes d'uranium sous forme de sels de phosphate insolubles (Berry *et al.*, 1997 ; Hengé-Napoli *et al.*, 1996).

La transformation des particules d' UO_4 dans les macrophages alvéolaires semble être la résultante de deux processus.

Fig. 5. – Particule phagocytée par 2 macrophages alvéolaires observés in vitro après 24 h de culture (x 15 000).

Particle phagocytised by 2 alveolar macrophages observed in vitro after 24 hours in culture (x 15 000).

D'une part, les particules se dissocient en fragments de plus en plus petits. Cette pulvérisation des particules initiales se produit dans les phagosomes très rapidement après la mise en contact des particules d' UO_4 avec les macrophages. Ceci a été observé aussi bien dans les macrophages ayant phagocyté l'uranium *in vivo* que dans ceux exposés *in vitro*. De plus, il apparaît clairement sur la figure 5 que les macrophages exercent une action corrosive sur les particules. Cet effet corrosif peut être la conséquence de l'action de divers enzymes et de celle des radicaux oxygènes présents dans les phagolysosomes.

D'autre part on observe, dans les lysosomes de certains macrophages ne contenant plus de particules sous leur forme initiale, des amas en forme d'oursins identifiés comme étant des aiguilles de phosphate d'uranyle. Ces formations en « oursin » sont observées de façon très précoce, dès les premières 24 heures suivant le dépôt de particules. Les conditions acides régnant dans les lysosomes où le pH est voisin de 5 permettent à l'ion uranyle obtenu par dissolution des particules d'uranium de précipiter à nouveau sous forme d'anion phosphate entre pK 2,1 et pK 7,2.

La transférabilité de ce composé déterminée *in vivo* après instillation à des rats est de 43,5 % pendant les premières 24 heures puis la cinétique de transférabilité ralentit pour atteindre un total dissous de 74 % du dépôt initial au bout de 90 jours (soumis à publication). Ces résultats le classent parmi les composés de type M de la CIPR. La grande transférabilité observée *in vivo* après instillation intratrachéale d' UO_4 indique cependant que ce mécanisme de précipitation dans les lysosomes n'est pas majoritaire et que l'uranium peut atteindre le compartiment sanguin avant d'avoir subi cette insolubilisation. Ceci confirme que, dans le cas de composés très solubles, l'action des macrophages alvéolaires ne constitue pas le facteur limitant de la dissolution dans les premières heures suivant le dépôt pulmonaire (ICRP, 1994). Par contre, la partie lente de la cinétique d'absorption (correspondant aux taux s_s de la CIPR) ainsi que la cinétique correspondant à la fraction liée (f_b , s_b) peuvent s'expliquer par la nouvelle précipitation d'une partie du composé observée dans les lysosomes des macrophages alvéolaires.

5. Conclusion

Cette étude a montré la coexistence de deux phénomènes de transformation de l' UO_4 dans les macrophages alvéolaires : fragmentation et dissolution, ces deux mécanismes intervenant de façon très précoce. D'autres études demeurent nécessaires pour déterminer sous quelle forme la fraction dissoute traverse les différents constituants de la barrière pulmonaire : épithélium, interstitium et endothélium vasculaire. La connaissance de ces mécanismes permettra en effet de modéliser de façon fiable les paramètres qui gouvernent la transférabilité d'un composé.

Remerciements. Les auteurs remercient les Professeurs Galle et Berry pour leur contribution active à cette étude ainsi que les techniciens du LEAR ayant participé à sa réalisation.

RÉFÉRENCES

- Ansoborlo E., Chalabreysse J., Hengé-Napoli M.H., Pujol E. (1992) *In vitro* chemical and cellular tests applied to uranium trioxide with different hydration states. *Environ. Health Persp.*, **97**, 139-143.
- International Commission on Radiological Protection (ICRP) - Human respiratory tract model for radiological protection. (ICRP publication 66) Oxford: Pergamon press. Ann. ICRP, 1994, **24** (1/4).
- Berry J.P., The role of lysosomes in the selective concentration of mineral elements. (1996) A microanalytical study. *Cell. mol. Biol.*, **42**, 395-412.
- Berry J.P., Meignan P., Escaig F., Galle P. (1988) Inhaled soluble aerosols insolubilised by lysosomes of alveolar cells. Application to some toxic compounds; electron microprobe and ion microprobe studies. *Toxicology*, **52**, 127-139.
- Berry J.P., Zhang L., Galle P., Ansoborlo E., Hengé-Napoli M-H., Donnadieu-Claraz M. (1997) Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification. *Microsc. Res. Tech.*, **36**, 313-323.
- Hengé-Napoli M.H., Ansoborlo E., Claraz M., Berry J.P., Gibert R., Pradal B. (1994) Solubility and transferability of several industrial forms of uranium oxides. *Radiat. Prot. Dosim.*, **53**, 157-162.
- Hengé-Napoli M.H., Ansoborlo E., Claraz M., Berry J.P., Cheynet M.C. (1996) Role of alveolar macrophages in the dissolution of two different industrial uranium oxides. *Cell. mol. Biol.*, **42**, 413-420.
- ICRP (1994) Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection, ICRP publication 66. Elsevier Science Ltd, Oxford.
- Kreyling W.G., Godleski J.J., Kariya S.T., Roser M., Brain J.D. (1990) *In vitro* dissolution of uniform cobalt oxide particles by human and canine alveolar macrophages. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1990, **2**, 413-422.
- Marafante E., Lundborg M., Vahter M., Camner P. (1987) Dissolution of two arsenic compounds by rabbit alveolar macrophages. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1987, **8**, 382-388.
- Poncy J.L., Metivier H., Dhilly M., Verry M., and Masse R. (1992) *In vitro* dissolution of uranium oxide by baboon alveolar macrophages. *Environ. Health Persp.*, 1992, **97**, 127-130.