

Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux : le DTPA et l'uranium

D. MULLER^{1,2}, P. HOUPERT¹, M.H. HENGE NAPOLI^{1,4}, H. MÉTIVIER³,
F. PAQUET¹

(Manuscrit reçu le 21 avril 2006, accepté le 25 juin 2006)

RÉSUMÉ Le traitement recommandé en cas de contamination accidentelle par un composé hybride d'oxydes de plutonium et d'uranium (MOX) est l'administration d'acide diéthylène-triamine-pentaacétate (DTPA) afin d'accélérer l'excrétion du plutonium. L'uranium et le DTPA étant deux composés néphrotoxiques, l'administration de DTPA consécutif à une contamination par un composé contenant de l'uranium, est susceptible de potentialiser les effets néphrotoxiques de l'uranium. L'objectif de ce travail a été d'étudier *in vitro* sur une lignée de cellules tubulaires proximales de rein (LLC-PK₁) la cytotoxicité induite par des concentrations croissantes d'uranium en présence ou en absence de 3 formes chimiques de DTPA. Les résultats ont montré que le DTPA, utilisé seul, n'induisait aucune toxicité à la concentration testée (420 µM). Cependant, l'administration de DTPA augmentait le taux de mortalité cellulaire induit par l'uranium. Cette augmentation était maximale pour les concentrations en uranium proches de la concentration létale pour 50 % des cellules et atteignait respectivement 37, 31 et 28 % pour le DTPA anhydre, le Na₃CaDTPA et le Na₃ZnDTPA. Ces résultats suggèrent que le DTPA est un composé susceptible de potentialiser la néphrotoxicité induite par l'uranium.

ABSTRACT Potential synergy between two renal toxicants: DTPA and uranium.

At present, the most appropriate therapeutic approach to treat an accidental contamination with plutonium and uranium oxide mixture (MOX) is administration of diethylene-triamine-pentaacetate acid (DTPA) in order to accelerate plutonium excretion. As uranium and DTPA are both nephrotoxic compounds, the administration of DTPA after a contamination containing uranium could enhance the nephrotoxic effects of uranium. The aim of the present work was to study *in vitro* on a kidney proximal tubule cell line (LLC-PK₁) the cytotoxicity induced by increasing concentrations of uranium in presence of 3 different chemical forms of DTPA. The results showed that the DTPA used alone induced no cytotoxicity at the concentration used here (420 µM). However, this concentration of DTPA increased the cytotoxicity induced by uranium. This increase was maximal for uranium concentrations close to the lethal concentration for 50% of the cells and reached 37, 31 and 28% for anhydrous DTPA, Na₃CaDTPA and Na₃ZnDTPA, respectively. These results suggest that administration of DTPA could enhance the nephrotoxicity induced by uranium.

Keywords: uranium / DTPA / kidney / toxicity / *in vitro*

¹ IRSN, Direction de la radioprotection de l'homme, Service de radiobiologie et d'épidémiologie, Laboratoire de radiotoxicologie expérimentale, B.P. 166, 26702 Pierrelatte, France.

² Adresse actuelle : King's College London, School of Health and Biomedical Sciences Division of Reproductive Health, Endocrinology and Development Beta Cell Function and Development Group Hodgkin Building, London SE1 1UL, UK.

³ IRSN, B.P. 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

⁴ Adresse actuelle : CEA/DEN/Valrhô-Dir-CVAR, B.P. 17171, 30207 Bagnols-sur-Cèze Cedex, France.

1. Introduction

En cas de contamination interne, il est recommandé d'utiliser des chélateurs afin d'accélérer l'excrétion des radionucléides et ainsi de réduire les doses délivrées à l'organisme. À l'heure actuelle, les médecins ne disposent d'aucun produit performant pour traiter une contamination accidentelle par des composés hybrides d'oxydes d'uranium et de plutonium (MOX) couramment manipulés aux postes de travail de nombreuses usines du cycle du combustible. Le seul traitement proposé est le DTPA (acide diéthylène-triamine-pentaacétate), utilisé pour traiter les contaminations au plutonium, alors que son efficacité pour augmenter l'excrétion du plutonium incorporé sous forme de MOX est encore mal connue (Bhattacharyya *et al.*, 1995 ; Wood *et al.*, 2000). De plus le DTPA est néphrotoxique lorsqu'il est administré en grande quantité (Doolan *et al.*, 1967 ; Morgan et Smith, 1974). L'uranium étant également néphrotoxique dès qu'il atteint une concentration de 3 µg/g de rein (Diamond *et al.*, 1989), la question est de savoir si le DTPA, administré pour réduire les risques dus au plutonium, ne risque pas de potentialiser la néphrotoxicité induite par l'uranium. L'objectif de cette étude est d'apporter un premier élément de réponse. Cette étude a été réalisée *in vitro* sur une lignée de cellules tubulaires proximales de rein, tissu cible de la toxicité de l'uranium (Diamond *et al.*, 1989). La survie des cellules a été évaluée après 24 heures d'incubation en présence d'uranium et de DTPA.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs et matériels

Le sérum de veau fœtal (SVF), l'HEPES, les flacons de cultures, la L-glutamine, la streptomycine et la pénicilline ont été obtenus chez Sigma (l'Isle d'Abeau Chesnes, France) et le nitrate d'uranyl chez Merk Eurolab (Lyon, France). Le DTPA anhydre a été obtenu chez Sigma (l'Isle d'Abeau Chesnes, France), tandis que les formes zincique et calcique de DTPA ont été obtenues respectivement par le service médical du travail de COGEMA (Pierrelatte, France) et par le Service de protection radiologique des Armées (Clamart, France). Les cellules LLC-PK₁ ont été obtenues à l'*European Collection of Cell Culture* (Wilshire, Angleterre).

2.2. Culture cellulaire

La croissance cellulaire a été effectuée en milieu de culture nutritionnel supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal (SVF), 10 mM d'HEPES, 1 mM de L-glutamine, 50 mg/l de streptomycine et 10⁴ UI/l de pénicilline en atmosphère humide composée de 5 % de CO₂ et de 95 % d'air à 37 °C. À confluence,

les cellules ont été détachées et séparées mécaniquement avant d'être repiquées soit à une densité de 10^6 cellules par flacon de culture soit à une densité de 10^3 par puits sur plaque de micro-titration.

2.3. Préparation des solutions d'uranium

Les cristaux de nitrate d'uranium ont été dissous dans une solution de bicarbonate à 0,1 M afin d'obtenir une solution mère en uranium de 10 mM (Mirto *et al.*, 1999). À partir de cette solution, une gamme de concentration a été réalisée en milieu bicarbonate 0,1 mM. Les solutions obtenues ont été ajustées à pH 7,4.

2.4. Études de cytotoxicité

Les cellules ont été amenées à confluence dans des puits de plaque de micro-titration en milieu complété avec 10 % de SVF. Elles ont alors été incubées avec une gamme de concentrations croissantes en uranium pendant 24 heures, en présence ou en absence de DTPA anhydre, de Na_3CaDTPA ou de Na_3ZnDTPA à la concentration de 420 μM . Cette concentration est une extrapolation de la posologie employée en cas de contamination humaine par le plutonium. En effet, l'injection de 30 $\mu\text{mol/kg}$ de DTPA à un homme moyen possédant un volume sanguin de 5 litres conduit à une concentration sanguine immédiate de 420 μM de DTPA. Le taux de lactate déshydrogénase (LDH) relarguée dans le milieu par les cellules endommagées a été mesuré à l'aide d'un kit de détection enzymatique (Boehringer Mannheim, Allemagne). La consommation de nicotine adénine dinucléotide en présence de pyruvate a été évaluée par spectrométrie d'absorbance à 490 nm. Le taux de cytotoxicité a été calculé à partir des densités optiques à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de cytotoxicité} = \frac{(\text{DO cellules testées} - \text{DO témoin négatif})}{(\text{DO témoin positif} - \text{DO témoin négatif})} \times 100.$$

3. Résultats

3.1. Toxicocinétique de l'uranium

En présence d'une concentration de 1 mM d'uranium, le taux de LDH relargué dans le milieu extracellulaire par les cellules endommagées augmente pendant les premières heures d'incubation pour atteindre 100 % en 20 à 25 heures (Fig. 1). La mortalité cellulaire étant alors maximale, les études ultérieures ont été réalisées après 24 heures d'incubation.

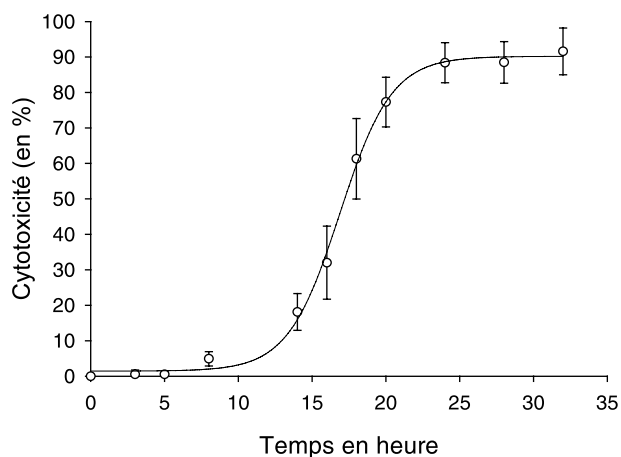


Figure 1 – Toxicocinétique de l'uranium (1 mM) sur les cellules LLC-PK₁.
Uranium toxicokinetics on LLC-PK₁ cells.

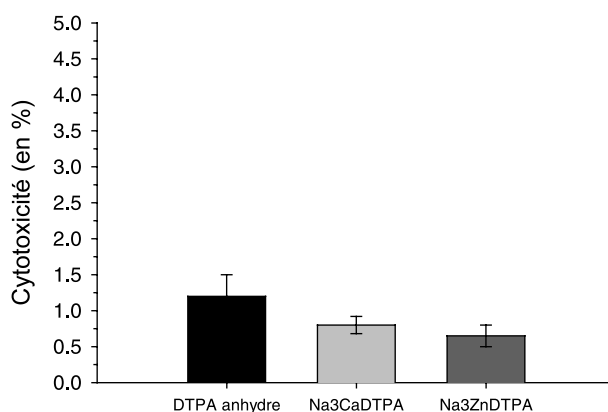


Figure 2 – Le DTPA sous forme anhydre, calcique ou zincique à la concentration de 420 μM n'induit pas de cytotoxicité significative sur les cellules LLC-PK₁ en 24 heures d'incubation.
Anhydrous, calcium or zinc salts of DTPA used at a concentration of 420 μM did not induce any significant toxicity on LLC-PK₁ cells after 24 h of incubation.

3.2. Potentialisation de la cytotoxicité de l'uranium par le DTPA

L'incubation pendant 24 heures des cellules LLC-PK1 en présence de 420 μM de DTPA, qu'il soit sous forme anhydre, calcique ou zincique, n'a pas induit d'effet cytotoxique significatif (Fig. 2).

SYNERGIE POTENTIELLE ENTRE DEUX TOXIQUES RÉNAUX

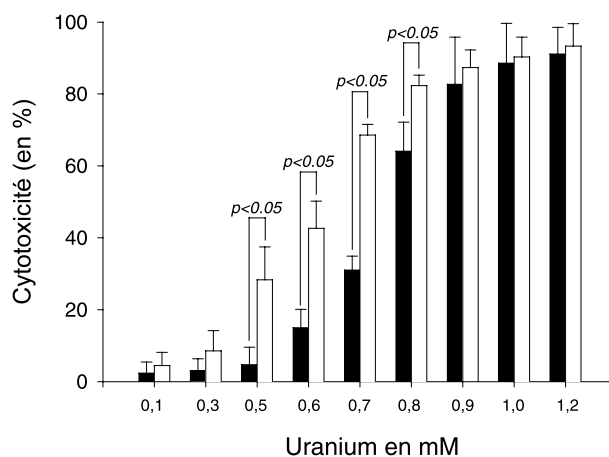


Figure 3 – *Le DTPA anhydre à la concentration de 420 μ M augmente la cytotoxicité induite par l'uranium sur les cellules LLC-PK₁ après 24 heures d'incubation (■ : uranium, □ : uranium + DTPA).*
Anhydrous DTPA used at a concentration of 420 μ M increased the uranium cytotoxicity on LLC-PK₁ cells after 24 h of incubation.

En revanche, lorsqu'il est associé avec l'uranium, le DTPA a augmenté significativement le taux de mortalité cellulaire et ce pour les 3 formes chimiques de DTPA testées (Figs. 3 à 5). Cette augmentation était maximale pour les concentrations en uranium proches de la concentration létale pour 50 % des cellules qui se situait aux alentours de 700 μ M d'uranium. L'augmentation de la toxicité de l'uranium était alors de 37,5, 30,9 et 27,8 % respectivement pour le DTPA anhydre, le Na₃CaDTPA et le Na₃ZnDTPA.

4. Discussion

L'objectif de cette étude était de tester *in vitro* sur culture cellulaire une synergie potentielle de l'uranium et du DTPA sur la toxicité rénale. Les cultures cellulaires sont en effet largement utilisées dans l'étude des processus physiopathologiques des molécules thérapeutiques ou des toxiques (Takano *et al.*, 1994 ; Endo *et al.*, 1996 ; Decorti *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 1999). Les deux modèles de cellules tubulaires proximales de rein les plus fréquemment utilisées dans ces études sont les lignées cellulaires immortalisées LLC-PK₁ et OK. Les précédentes études *in vitro* de toxicité de l'uranium ayant été effectuées sur la lignée cellulaire LLC-PK₁ (Mirto *et al.*, 1999), nous avons choisi ce modèle pour notre étude.

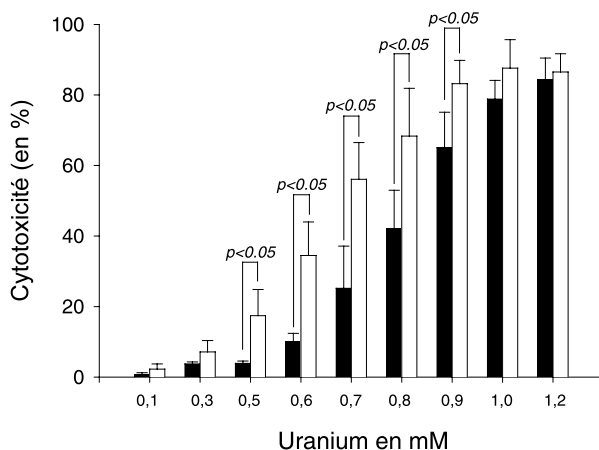


Figure 4 – Le $\text{Na}_3\text{Ca}_3\text{DTPA}$ à la concentration de $420 \mu\text{M}$ augmente la cytotoxicité induite par l'uranium sur les cellules LLC-PK₁ après 24 heures d'incubation (■ : uranium, □ : uranium + DTPA).
 Calcium salts of DTPA used at a concentration of $420 \mu\text{M}$ increased the uranium cytotoxicity on LLC-PK₁ cells after 24 h of incubation.

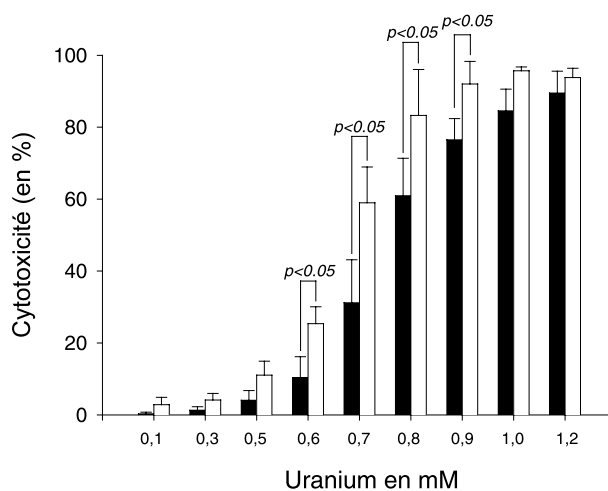


Figure 5 – Le Na_3ZnDTPA à la concentration de $420 \mu\text{M}$ augmente la cytotoxicité induite par l'uranium sur les cellules LLC-PK₁ après 24 heures d'incubation (■ : uranium, □ : uranium + DTPA).
 Zinc salts of DTPA used at a concentration of $420 \mu\text{M}$ increased the uranium cytotoxicity on LLC-PK₁ cells after 24 h of incubation.

Le premier résultat de notre étude a montré que le DTPA à une concentration de 420 μM , équivalente à la concentration thérapeutique utilisée chez l'homme, quelle que soit la forme chimique utilisée (DTPA anhydre, Na_3CaDTPA et le Na_3ZnDTPA), n'engendre pas d'effets cytotoxiques après une période d'incubation de 24 heures. Ces résultats, obtenus *in vitro*, sont en accord avec les résultats de la littérature obtenus *in vivo*. En effet, *in vivo* le DTPA n'est toxique que pour de fortes concentrations (Doolan *et al.*, 1967) et à la dose thérapeutique de 30 $\mu\text{mol/kg}$, il n'altère ni les fonctions ni la cytologie des reins ou du foie chez le singe (Fritsch *et al.*, 1994).

Le second résultat de notre étude a montré que la cytotoxicité de l'uranium était augmentée par le DTPA. Pour des concentrations de 700 μM d'uranium, voisines de la concentration létale pour 50 % des cellules, l'adjonction de DTPA dans le milieu de culture a augmenté la mortalité cellulaire d'environ 30 %. Or le DTPA seul n'induisant pas d'effet toxique, cette augmentation de cytotoxicité peut s'expliquer soit par une potentialisation de la toxicité de l'uranium par le DTPA, soit par la chélation d'éléments essentiels à l'homéostasie cellulaire, tels le zinc, le manganèse ou le calcium (Dvorak, 1970 ; Havlicek, 1967). Cette dernière hypothèse semble peu probable. En effet, le milieu de culture utilisé était dépourvu de zinc et de manganèse et de plus, les formes zincique et calcique de DTPA induisaient des effets tout à fait similaires à ceux de la forme anhydre de DTPA. Il semble donc plus probable que le DTPA potentialise un ou plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité de l'uranium.

En conclusion, cette étude montre que le DTPA augmente la mortalité cellulaire induite par l'uranium sur une lignée de cellules tubulaires proximales de rein, la lignée LLC-PK₁. Ces résultats suggèrent une potentialisation de la néphrotoxicité de l'uranium par le DTPA. Cependant, avant de déconseiller l'utilisation du DTPA pour traiter une contamination au MOX, ces résultats devront être confirmés *in vivo* afin de prendre en compte les biocinétiques respectives de l'uranium et du DTPA. En effet, les transformations physico-chimiques subies par l'uranium et le DTPA avant d'atteindre les cellules tubulaires rénales ainsi que le temps de contact entre les cellules tubulaires rénales et l'uranium ou le DTPA pourraient moduler les résultats obtenus *in vitro*.

RÉFÉRENCES

- Bhattacharyya M.H., Breitenstein B.D., Métivier H., Stradling G.N., Volf V. (1995) Traitement de la contamination interne accidentelle des travailleurs. Rapport IPSN, Fontenay-aux-Roses.
- Choi J.S., Kim K.R., Ahm D.W., Park Y.S. (1999) Cadmium inhibits albumin endocytosis in opossum kidney epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharm.* **161**, 146-152.
- Decorti G., Malusà N., Furlan G., Candussio L., Klugmann F.B. (1999) Endocytosis of gentamicin in a proximal tubular renal cell line, *Life Sci.* **65**, 1115-1124.

- Diamond G.L., Morrow P.E., Panner B.J., Gelein R.M., Baggs R.B. (1989) Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fund. Appl. Toxicol.* **13**, 65-78.
- Doolan P.D., Schwartz S.L., Hayes J.R., Mullen J.C., Cummings N.B. (1967) An evaluation of the nephrotoxicity of ethylenediaminetetraacetate and diethylenetriaminepentaacetate in the rat. *Tox. Appl. Pharmacol.* **10**, 481-500.
- Dvorak P. (1970) Metabolism and toxicity of therapeutic agents. 8. Excretion of sodium, potassium, magnesium and zinc. *Strahlentherapie* **139**, 611-618.
- Endo T., Kimura O., Sakata M. (1996) Comparative studies of cadmium and mercury accumulation by LLC-PK₁ cells: effects of pH on uptake and efflux. *Toxicol. Lett.* **87**, 77-83.
- Fritsch P., Herbreteau D., Moutairou K., Lantenois G., Richard-Le Naour H., Grillon G., Hoffschir D., Poncy J.L., Laurent A., Masse R. (1994) Comparative toxicity of 3,4,3-LIHOPO and DTPA in baboons: preliminary results. *Radiat. Prot. Dosim.* **53**, 315-318.
- Havlicek F. (1967) Metabolism and toxicity of therapeutic chelating agents. 3. Effect of EDTA and DTPA on the excretion of endogenous zinc. *Strahlentherapie* **134**, 296-305.
- Mirto H., Hengé-Napoli M.H., Gibert R., Ansoborlo E., Fournier M., Cambar J. (1999) Intracellular behaviour of uranium (VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK₁): influence of uranium speciation. *Toxicol. Lett.* **104**, 249-256.
- Morgan R.M., Smith H. (1974) Histological changes in kidney, liver and duodenum of the mouse following the acute and subacute administration of diethylenetriaminepentaacetic acid. *Toxicology* **2**, 153-163.
- Takano M., Ohishi Y., Okuda M., Yasuhara M., Hori R. (1994) Transport of gentamicin and fluid-phase endocytosis markers in the LLC-PK₁ kidney epithelial cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 669-673.
- Wood R., Sharp C., Gourmelon P., Le Guen B., Stradling G.N., Taylor D.M., Hengé-Napoli M.H. (2000) Decorporation treatment – Medical overview. *Radiat. Prot. Dosim.* **87**, 51-57.