

# Mesure de la survie des macrophages alvéolaires après irradiation $\alpha$ pour l'évaluation de la toxicité des oxydes d'actinides inhalés

C. LIZON\*, I. BAILLY\*, L. LE FOLL\*, F. JOUANNY\*, J.-L. PONCY\*, P. FRITSCH\*

(Manuscrit reçu le 13 mars 1997, révisé le 15 juillet 1997, accepté le 5 octobre 1997)

## RÉSUMÉ

Nous avons mesuré la survie de macrophages alvéolaires de rat après une irradiation  $\alpha$  réalisée *in vitro* à l'aide de sources électrodéposées de  $^{239}\text{Pu}$ . La survie a été évaluée en mesurant, par puits de culture, le nombre de cellules adhérentes par unité de surface comparée à des puits non irradiés. La relation dose effet obtenue suit une fonction exponentielle de la fluence  $\alpha$  émise par la source. Après mesure des surfaces projetées des cellules entières et de leurs noyaux par microscopie optique, et détermination de la forme cellulaire par microscopie confocale, un calcul dosimétrique a été effectué. Environ 550  $\alpha$ /cellule et 150  $\alpha$ /noyau induisent une létalité de 63 % des macrophages alvéolaires, soit une Do de l'ordre de 90 Gy pour la cellule ou le noyau. Ces résultats permettent d'évaluer la survie des macrophages *in vivo* après phagocytose d'oxydes d'actinides, en fonction de la taille et de l'activité  $\alpha$  spécifique de la particule. Après inhalation, une létalité significative des macrophages alvéolaires serait induite pour des particules d'oxydes d'actinides de diamètre aérodynamique supérieur à 1  $\mu\text{m}$  et d'activité spécifique supérieure à celle du  $^{239}\text{PuO}_2$ .

## ABSTRACT

Measurement of alveolar macrophage survival after  $\alpha$  irradiation to evaluate the toxicity of inhaled actinide oxides.

We have studied rat alveolar macrophage survival after *in vitro*  $\alpha$  irradiation with electrodeposited sources of  $^{239}\text{Pu}$ . Survival was estimated by the ratio of the number of adherent cells per unit of area at the end of the irradiation, versus unirradiated cells. The dose effect relationship fit to a single exponential function of fluence. A dosimetric calculation has been performed after measurement of projected areas of entire cells and cell nuclei, and estimate of their shape. The number of  $\alpha$  tracts needed to induce 63% alveolar macrophage lethality was about 550  $\alpha$  per cell and about 150  $\alpha$  per nucleus, corresponding to a Do at about 90 Gy for entire cell or for cell nucleus. Our results allow us to estimate *in vivo* macrophage survival after phagocytosis of actinide oxides as a function of particle size and their  $\alpha$  specific activity. A significant lethality could be induced by actinide oxides with an aerodynamic median activity diameter higher than 1  $\mu\text{m}$  and a specific  $\alpha$  activity higher than that of  $^{239}\text{PuO}_2$ .

\* CEA / DSV / DRR / SRCA Laboratoire de Radiotoxicologie, BP 12, 91680 Bruyères le Châtel, France.

## 1. Introduction

Bien que plusieurs études aient concerné la toxicité des oxydes d'actinides vis-à-vis des macrophages alvéolaires après phagocytose, il n'existe aucune donnée permettant d'évaluer la mort cellulaire en fonction des caractéristiques physico-chimiques de ces particules (activité spécifique, diamètre aérodynamique...) et de la dose délivrée dans la cellule.

Après inhalation de  $^{239}\text{PuO}_2$ , une diminution de la motilité des macrophages alvéolaires a été montrée (Nolibé *et al.*, 1974), une altération de la capacité de phagocytose et une augmentation du nombre de cellules multinucléées ont également été rapportées (Morgan et Talbot, 1992). La capacité de phagocytose ainsi que la viabilité des macrophages sont aussi altérées *in vitro* après addition de  $^{241}\text{AmO}_2$  dans le milieu de culture (Taya et Mewhinney, 1992). Cependant pour toutes ces études, la dose réelle délivrée aux cellules demeure inconnue. Elle est très dépendante de la distribution en taille des particules et du nombre de particules phagocytées par cellule.

Parallèlement, des irradiation  $\alpha$  homogènes ont été réalisées sur des macrophages alvéolaires *in vitro* à l'aide de sources électrodéposées de  $^{238}\text{Pu}$ . À notre connaissance, de telles études ont porté uniquement sur l'induction de micronoyaux (Johnson et Newton, 1994).

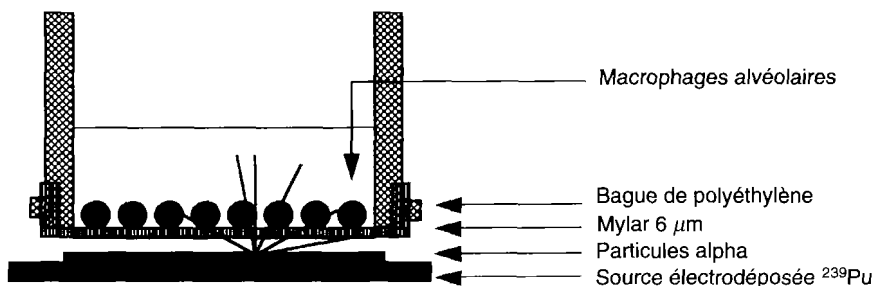
Le but de cette étude consiste à déterminer la survie des macrophages alvéolaires après une irradiation  $\alpha$  homogène réalisée *in vitro*, pour estimer la survie des macrophages *in vivo* après phagocytose d'oxydes d'actinides selon leur activité  $\alpha$  spécifique et leur taille. Les résultats préliminaires de cette étude ont déjà fait l'objet d'une publication (Lizon *et al.*, 1997).

## 2. Matériel et méthodes

Les macrophages alvéolaires ont été isolés par lavage pulmonaire de rats Sprague Dawley âgés de 3 mois (IFFA CREDO, France) après anesthésie (pentobarbital 40 mg/kg). Après extraction du bloc cœur-poumons, ces lavages sont effectués par instillations répétées de sérum physiologique jusqu'à l'obtention d'un volume total de 20 ml. La viabilité cellulaire est évaluée par exclusion du bleu trypan et a toujours été supérieure à 90 %. Après centrifugation (200 g, 10 min), les cellules sont remises en suspension dans du RPMI 1640 complété par 10 % de substitut de sérum (BMS, Seromed), des antibiotiques et de la L-glutamine. Elles sont ensuiteensemencées à une densité de 10000 cellules/mm<sup>2</sup> dans des puits de culture adaptés à l'irradiation  $\alpha$  puis maintenues dans une étuve à 37 °C, saturée en humidité, en atmosphère renfermant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Le système de culture est composé d'une feuille de mylar (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>), d'épaisseur 6  $\mu\text{m}$ , tendue à la base d'un puits de polyéthylène à l'aide d'une bague (Fig. 1).

Durant le temps de l'irradiation, ce système est directement en contact avec une source électrodéposée de  $^{239}\text{Pu}$ . Trois sources ont été utilisées, possédant des fluences  $\alpha$  sur  $4\pi$  de  $6,8 \times 10^{-5}$ ,  $1,2 \times 10^{-4}$  et  $1,4 \times 10^{-4} \alpha \text{ s}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$ , la durée totale des d'irradiations varie entre 2 heures et 3 jours selon la dose délivrée. Une heure après la fin de l'irradiation, la survie cellulaire a été évaluée par le nombre de cellules adhérentes après fixation et coloration des cellules. Elle correspond au rapport de la densité cellulaire après irradiation et de la densité moyenne d'au moins deux puits témoins provenant de la même culture. Au moins deux animaux ont été utilisés pour chaque dose. Par ailleurs, dans certains cas, un suivi des cellules vivantes a été réalisé par observation en contraste d'Hoffman et enregistrement d'images successives. Nous avons étudiés plusieurs puits avant irradiation, à la fin de l'irradiation puis quotidiennement jusqu'à 4 jours après irradiation (temps de culture total : 6 jours).



*Fig. 1. – Système d'irradiation alpha : les macrophages alvéolaires sont adhérents à une fine feuille de mylar, tendue à la base d'un puits de polyéthylène. Le puits est directement déposé sur une source électrodéposée alpha.*

*Irradiation device: alveolar macrophages are adherent to a thin mylar foil maintained by a ring at the bottom of a polyethylene vial. Irradiation is performed by putting the vial on the electrodeposited source.*

La forme des cellules adhérentes a été mesurée à l'aide d'un microscope confocal (MRC 1024, BIORAD) après fixation et coloration par l'iodure de propidium. Les surfaces projetées des cellules entières et de leur noyau ont été mesurées en microscopie conventionnelle après coloration par le Giemsa ou l'hémalun de Mayer. Un grand nombre d'images (120-220) a été traité par un logiciel d'analyse morphométrique développé au Laboratoire pour déterminer les distributions en surface. L'estimation du nombre moyen de traces  $\alpha$  traversant les cibles et de la dose délivrée a été effectuée à l'aide d'un logiciel de simulation également développé au Laboratoire (Le Foll *et al.*, 1997). Ce logiciel est basé sur l'émission aléatoire de particules  $\alpha$  en direction de la cible (considérée comme homogène), et sur les longueurs d'interaction entre particules  $\alpha$  et cible cellulaire. Les longueurs d'interaction sont converties en énergie déposée par un calcul utilisant la courbe d'évolution du transfert d'énergie linéique en fonction de l'énergie.

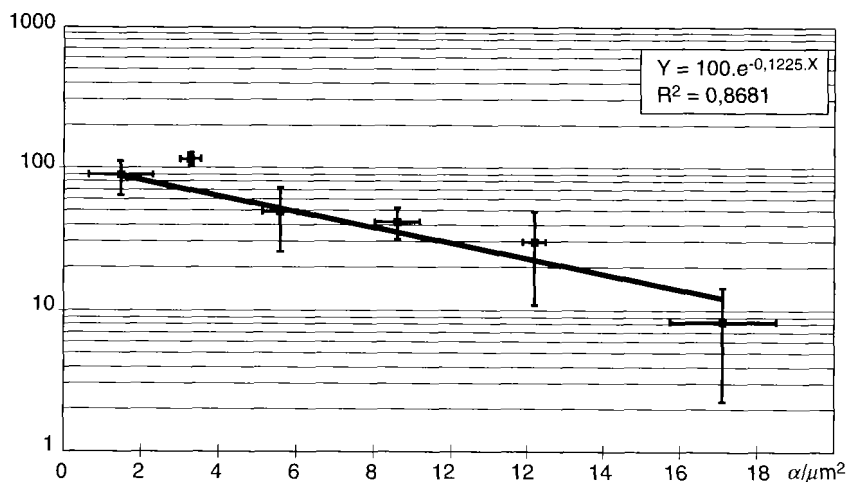


Fig. 2. – Évolution du pourcentage de cellules adhérentes irradiées par rapport aux témoins en fonction de la fluence  $\alpha$  par  $\mu\text{m}^2$  émis par la source dans  $4\pi$ . Valeurs moyennes sur 4 puits  $\pm$  sd sauf pour  $X = 17$ ,  $n = 3$ .

Percent of adherent irradiated cells compared to controls as a function of  $\alpha$  fluence per  $\mu\text{m}^2$  emitted by the source on  $4\pi$ . Mean value for 4 points  $\pm$  sd, except for  $X = 17$ ,  $n = 3$ .

### 3. Résultats

La figure 2 montre qu'après irradiation  $\alpha$ , la survie des macrophages, exprimée en pourcentage des cellules adhérentes par rapport aux témoins suit une loi de décroissance de type exponentielle. L'équation obtenue :

$$\text{Survie} = 100 e^{-0.1225 \times \text{Fluence}} \quad (R^2 = 0,8681)$$

donne une fluence  $\alpha$  de 8,1  $\alpha/\mu\text{m}^2$  pour induire une mortalité de 63 %.

Pour une même fluence, la variabilité de la survie est relativement importante entre les différents puits de culture (écart type environ à 33 % de la valeur moyenne). Les résultats préliminaires de suivi en contraste d'Hoffman de champs identiques de différents puits de culture permettent de diminuer la valeur de l'écart type (10 à 20 % de la valeur moyenne). En effet, l'étude du champ avant irradiation permet l'exploitation d'un témoin interne et donc diminue l'impact de la variabilité interindividuelle. Par ailleurs, le suivi des cellules vivantes en contraste d'Hoffman a montré que les macrophages restent sphériques durant les 4 premiers jours de culture sans variation apparente de leur taille. La figure 3 présente des sections verticales de macrophages alvéolaires adhérents au mylar, obtenues en microscopie confocale, un jour après la mise en culture, qui montre que les cellules ont une forme sphérique. Les noyaux sont

également assimilables à des sphères. Les irradiations ayant lieu entre 1 et 3 jours après mise en culture, nous pouvons donc, durant cette période, assimiler les cellules et leur noyau à des sphères.



*Fig. 3. – Sections verticales de macrophages alvéolaires un jour après mise en culture, obtenues en microscopie confocale après coloration à l'iodure de propidium.*

*Vertical sections of alveolar macrophages obtained by confocal microscopy one day after plating (propidium iodide staining).*

Les distributions des surfaces nucléaires et cellulaires totales sont assimilables à des gaussiennes. Ces surfaces moyennes sont respectivement égales à  $36,17 \mu\text{m}^2 \pm 7,8$  ( $n = 120$ ) et à  $127,41 \mu\text{m}^2 \pm 39,82$  ( $n = 220$ ) correspondant à des diamètres de  $6,78 \mu\text{m} \pm 3,15$  et  $12,74 \mu\text{m} \pm 7,12$ .

TABLEAU I

**Calcul du nombre de traces  $\alpha$  traversant les cibles cellulaires (cellule totale ou noyau) et de la dose délivrée à ces cibles pour une irradiation induisant 63 % de mortalité.**

**Calculation of the number of  $\alpha$  tracts through cellular targets (entire cell or nucleus) and of the delivered dose for an irradiation inducing a 63% lethality.**

	Nombre d'impacts $\alpha$	Dose délivrée (Gy)
Noyau	140	91,6
Cellule Totale	529	91

Ces données morphométriques ont permis d'évaluer le nombre moyen de traces  $\alpha$  traversant les cibles ainsi que la dose délivrée dans ces cibles pour induire 63 % de létalité, les résultats sont montrés dans le tableau I. Pour le

noyau, les calculs ont été effectués en plaçant cette cible au centre de la cellule. De plus, nous avons pris en compte les deux types de milieux traversés par les  $\alpha$  (mylar et milieu cellulaire).

#### 4. Discussion et conclusion

Après une irradiation  $\alpha$  homogène, la survie des macrophages suit une fonction exponentielle simple de la fluence. Cependant, la variabilité observée entre les résultats individuels est importante. Elle peut être expliquée par des différences de comportement cellulaire dépendant du puits de culture. Des résultats préliminaires montrent qu'un suivi des cellules vivantes sur un même puits, en contraste d'Hoffman, permet de limiter la variabilité de la mesure de la mort cellulaire. Cette méthode est d'ores et déjà utilisée afin de mieux caractériser la forme de la relation dose effet et de mettre en évidence un seuil éventuel pour de faibles fluences.

L'estimation dosimétrique a été effectuée à partir de données morphométriques statistiquement représentatives obtenues sur cellules fixées. Cependant, la fixation induisant une rétraction non négligeable des structures cellulaires (Townsend *et al.*, 1990), le nombre de traces  $\alpha$  traversant les cibles pourrait être sous-évalué de 10 à 20 %. Comme les macrophages sont non proliférants (phase Go du cycle cellulaire), il semble plus justifié de considérer l'ensemble de la cellule comme compartiment cible de la mortalité et non le noyau qui est considéré comme cible majeure pour les cellules proliférantes. Ainsi, environ 530  $\alpha$  par cellule totale induisent 63 % de mortalité, soit une Do de 91 Gy. À l'heure actuelle, le calcul n'a pas été appliqué à une source ponctuelle incluse dans la cible. Dans la mesure où l'irradiation correspond au début du parcours des  $\alpha$ , la dose réellement délivrée sera légèrement inférieure à la valeur calculée.

La mesure du nombre de cellules adhérentes une heure après irradiation et les calculs dosimétriques permettent une estimation de la toxicité des oxydes d'actinides faiblement solubles inhalés en fonction de leur activité  $\alpha$  spécifique et de leur taille. Le tableau II présente le temps nécessaire à l'induction d'une mortalité de 63 % des macrophages après phagocytose de particules d'oxyde d'actinide. Des diamètres aérodynamiques médians en activité (AMAD) de 1 et de 5  $\mu\text{m}$  ont été pris en compte car ils correspondent à la taille d'aérosols considérée par la CIPR 66 (ICRP, 1994) pour les travailleurs et pour l'environnement. Ces calculs ont été réalisés en supposant que les macrophages ne renferment qu'une seule particule et que les cellules non irradiées ont une durée de vie infinie. Chez le rat témoin, la durée de vie des macrophages alvéolaires a été estimée à 7-10 jours (Fritsch et Masse, 1992). Aussi, des modifications importantes de cette population cellulaire peuvent être attendues pour des particules induisant 63 % de mortalité des cellules en moins d'une semaine. Elles pourraient contribuer à une altération des paramètres de

l'épuration pulmonaire et/ou modifier l'incidence et/ou la sévérité des lésions pulmonaires radioinduites à moyen et long terme.

D'après le tableau II, des particules ayant un AMAD supérieur à  $1 \mu\text{m}$  et une activité  $\alpha$  spécifique supérieure à celle de  $^{239}\text{PuO}_2$  comme le  $^{238}\text{PuO}_2$ , pourraient induire de tels phénomènes. L'activité spécifique des oxydes mixtes homogènes est généralement inférieure à celle du  $^{239}\text{PuO}_2$ . Cependant, nous avons récemment mis en évidence l'hétérogénéité de poudres oxydes mixtes d'uranium et de plutonium d'origine industrielle (Massiot *et al.*, 1996) et, dans ce cas, l'activité spécifique de certaines particules est très supérieure à celle de  $^{239}\text{PuO}_2$ . Des études sont en cours pour préciser la toxicité potentielle de telles particules. Elles ne seront pas limitées à la survie cellulaire mais porteront également sur la motilité et la libération de cytokines.

TABLEAU II

**Temps nécessaire à l'induction de la mort de 63 % des macrophages alvéolaires après phagocytose d'oxydes d'actinides (en considérant une densité de 10, une seule particule par cellule, aucun renouvellement cellulaire pendant l'exposition : pour des AMAD de 1 et  $5 \mu\text{m}$ ).**

**Time needed to induce 63% alveolar macrophage lethality after phagocytosis of actinides oxides (assuming density = 10, one particle per cell, no cell renewal : for 1 and  $5 \mu\text{m}$  AMAD).**

Temps nécessaire à l'induction de la mort de 63 % des macrophages	$^{238}\text{UO}_2$	$^{237}\text{NpO}_2$	MOX	$^{239}\text{PuO}_2$	$\text{PuO}_2$ industriel	$^{238}\text{PuO}_2$
			« homogène » 5,3 % Pu			
AMAD $1 \mu\text{m}$	34 224 ans	16 ans	8 mois	68 jours	13 jours	6 heures
AMAD $5 \mu\text{m}$	274 ans	48 jours	2 jours	7 heures	2,4 heures	2,8 minutes

## RÉFÉRENCES

- Fritsch P. et Masse R. (1992) Overview of pulmonary alveolar macrophage renewal in normal rats and during different pathological processes. *Env. Health Perspect.*, **97**, 59-67.
- International Commission on Radiological Protection. (1994) ICRP Publication 66. Oxford : Pergamon Press.
- Johnson N.F. et Newton G.J. (1994) Estimation of the dose of radon progeny to the peripheral lung and the effect of exposure to radon progeny on the alveolar macrophage. *Radiat. Research*, **139**, 163-169.
- Le Foll L., Fritsch P. et Bailly I. (1997) Cell dosimetric calculation based on hit simulation after  $\alpha$ -source irradiation : I application to simple geometric targets. *Int. J. Radiat. Biol.* À paraître.

- Lizon C., Bailly I., Guezingar F., Jouanny F., Poncy J.L. et Fritsch P. (1997) Alveolar macrophage lethality induced by a irradiation *in vitro*. *Ann. Occup. Hyg.* **41**, 111-115.
- Massiot P., Fritsch P., Le Naour H., Rateau G., Lizon C. et L'Huillier I. (1996) Electron probe X-ray microanalysis of inhaled (UO<sub>2</sub>, PuO<sub>2</sub>) mixed oxides in alveolar macrophages observed *in toto*. International Congress on Radiation Protection 9, Vienna, Hofburg, Austria, April 14-19, 2, 508-511.
- Morgan A. and Talbot R.J. (1992) Effects of inhaled alpha-emitting actinides on mouse alveolar macrophages. *Env. Health Persp.*, **97**, 177-184.
- Nolibe D., Metivier H., Masse R. and Lafuma J. (1974) Mobilité des macrophages et épuration alvéolaire chez différentes espèces. *Rev. Fran. Mal. Respir.*, **2**, suppl., 128-132.
- Taya A. et Mewhinney J.A. (1992) Cytotoxicity, uptake and dissolution of <sup>241</sup>AmO<sub>2</sub> particles in dog alveolar macrophages *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 81-88.
- Townsend K.M.S., Stretch A., Stevens D.L. et Goodhead D.T. (1990) Thickness measurements on V79-4 cells: a comparison between laser scanning confocal microscopy and electron microscopy. *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 499-508.