Article original

Évaluation d'une double approche pharmacologique pour l'amélioration de la prise en charge thérapeutique de la contamination pulmonaire au plutonium

Sur un modèle de macrophages *in vitro*

A. BOURGOIS[(1)], A. VAN DER MEEREN[(2)], G. COSLER[(3)], C. LE GALLIC[(4)], M. DROUET[(5)], S. FRANÇOIS[(6)], N. GRIFFITHS[(7)], S. LE MAOUT[(8)], D. RICCOBONO[(9)]

(1,3,5,6,9) Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département Effets Biologiques des Rayonnements, Brétigny-sur-Orge
(2,7,8) Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Laboratoire de Radio Toxicologie, Bruyères-le-Châtel
(4) Direction Générale de l'Armement, Maîtrise Nucléaire, Radiologique, Biologique et Chimique, Vert-le-Petit

Auteur correspondant : alexandra.bourgois@def.gouv.fr

Open access DOI
10.17184/eac.8635

Reçu
le 9 janvier 2023

Accepté
le 20 décembre 2023

Publié
le 5 juin 2024

Conflit d'intérêt
Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt.

Résumé :
Les menaces nucléaires et radiologiques sont des sujets d'actualité. Différents scénarios pourraient conduire à des contaminations internes avec du plutonium (Pu) tels que l'utilisation d'armes nucléaires tactiques, des accidents sur des réacteurs nucléaires civils ou militaires, des actes terroristes (bombes sales) ou encore la nécessité de déployer les forces dans des zones radio-contaminées. Après inhalation, les formes peu solubles de Pu sont majoritairement retenues au niveau des poumons dans les macrophages alvéolaires (MPs). L'acide Diéthylène triamine penta acétique (DTPA) est actuellement le traitement de référence dans ce contexte. Néanmoins, son efficacité sur les formes peu solubles de Pu et son effet protecteur contre l'apparition de pathologies retardées (fibroses pulmonaires) ne sont pas bien caractérisés. Des études ont donc été initiées afin de préciser ces aspects et d'améliorer la prise en charge de la contamination interne. L'évaluation est réalisée sur une modèle *in vitro* de macrophages THP-1 (monocytes humains différenciés). Les cellules sont exposées à des colloïdes de Pu (forme peu soluble) durant deux heures avant d'être traitées avec du DTPA et/ou de la dexaméthasone (DEX, molécule anti-inflammatoire) durant sept jours.

La dissolution du Pu par les macrophages augmente après traitement par le DTPA +/- DEX. La contamination au Pu induit une augmentation significative de la sécrétion de MCP-1 et d'IL-8, alors que les traitements DEX +/- DTPA ont significativement diminué les concentrations de ces deux cytokines, démontrant un effet anti-inflammatoire.
En conclusion, nos premiers résultats suggèrent une capacité du DTPA à partiellement dissoudre les formes peu solubles de Pu internalisées par les MPs. De plus, l'utilisation du double traitement DTPA+DEX préserve leurs effets chélatant et anti-inflammatoire respectifs *in vitro*. Il constitue donc une approche prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge thérapeutique en cas de contamination interne.

Mots-clés : Radiotoxicologie. Contamination interne. Contre-mesures médicales. Plutonium. Médecine d'armée.

Abstract:
ASSESSMENT OF A DOUBLE PHARMACOLOGICAL: APPROACH TO IMPROVE THE THERAPEUTICAL MANAGEMENT OF PLUTONIUM PULMONARY CONTAMINATION IN AN *IN VITRO* MACROPHAGE MODEL
Nuclear and radiological threats are currently hot topics. Various scenarios could lead to internal radiological contamination with plutonium (Pu) such as the use of tactical nuclear weapons, accident on civilian or military nuclear reactors, terrorist attacks (dirty bombs) or the deployment of forces in radio-contaminated areas. After inhalation, poorly soluble Pu forms are mainly retained within lungs' alveolar macrophages (MPs). Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) is currently the reference treatment in this context. However, its efficiency towards poorly soluble Pu forms and its protective effect on the delayed development of pulmonray fibrosis have not been characterized yet. Therefore, studies were initiated to specify these points and to improve internal contamination therapeutic management. Assessment is performed on an in vitro model of THP-1 macrophage-like cells (differentiated human monocytes). Cells were exposed to Pu colloids (poorly soluble form) for two hours before treatment with DTPA and/or dexamethasone (DEX, anti-inflammatory drug) for seven days. The dissolution of Pu colloids from Pu loaded macrophages increased after DTPA +/- DEX treatments.
Pu contamination induced significant increase in MCP-1 and IL-8 secretions by cells, while DEX +/- DTPA treatment significantly decreased these cytokines concentrationhighlighting an anti-inflammatory effect.
Thus, our first results suggest that DTPA has the ability to partially dissolve poorly soluble Pu forms internalized by MPs. Moreover, DTPA and DEX combination preserve respectively both their chelating and anti-inflammatory effects in vitro, making it a promising approach for radiological internal contamination management.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Keywords: Radiotoxicology. Internal contamination. Medical countermeasures. Plutonium. Military medicine.

Introduction

L'actualité récente a replacé sur le devant de la scène les menaces nucléaires et radiologiques qui avaient peu à peu fait place à d'autres menaces plus plausibles (menace chimique notamment) depuis la fin de la guerre froide. Cependant, la potentielle utilisation d'armes nucléaires tactiques ou stratégiques et l'endommagement d'installations nucléaires dans le cadre du conflit entre l'Ukraine et la Russie sont une source d'inquiétude croissante aujourd'hui. Ces évènements aboutiraient à des contaminations radiologiques parmi les populations militaires et/ou civiles impliquées dans ce conflit. Par ailleurs, les Forces armées françaises sont également concernées par le risque de contamination interne en cas de dysfonctionnement des chaufferies nucléaires embarquées sur certains bâtiments de la Marine nationale ou de déploiement dans des zones préalablement contaminées, sans oublier la menace terroriste qui pourrait inclure l'utilisation de bombes sales radiologiques. Dans ce contexte où de multiples scénarios pourraient conduire à la contamination interne de personnels, il apparait primordial de disposer de contre-mesures médicales adaptées pour garantir une prise en charge efficace.î

Parmi les radionucléides pouvant être rencontrés dans ces situations, le plutonium, et plus particulièrement son isotope 239 (^{239}Pu), est l'un des plus préoccupants en raison de sa toxicité radiologique élevée, de sa longue période radioactive (24 100 ans) et de ces utilisations dans les domaines civil et militaire (1). En effet, ce radio-élément est un émetteur α(rayonnement très énergétique et peu pénétrant), responsable d'irradiations localisées et hétérogènes en cas de contaminations internes (2). L'inhalation de ^{239}Pu, pouvant résulter des différents scénarios précédemment mentionnés, conduirait à sa pénétration dans les poumons et à son internalisation par les macrophages (MPs) alvéolaires qui constituent son principal compartiment de rétention (2-4).
En effet, le ^{239}Pu est reconnu comme un corps étranger par le système immunitaire, conduisant à sa phagocytose par les MPs et à l'activation de ces derniers. L'irradiation locale et chronique issue de la présence du ^{239}Pu au niveau pulmonaire induit une réponse inflammatoire chronique responsable, par la suite, d'effets retardés, tels que le développement de pathologies cancéreuses (5-7) ou de fibroses pulmonaires (8-10), potentiellement létaux. Afin de réduire l'irradiation chronique consécutive à la contamination interne, la stratégie thérapeutique actuelle consiste en l'utilisation d'un agent chélateur : l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) (11,12).
Ce traitement favorisant l'élimination du ^{239}Pu est produit par la Pharmacie centrale des armées (PCA) et peut être administré par voie intraveineuse, locale ou inhalée dès la suspicion d'une contamination interne. Néanmoins, l'efficacité du DTPA sur les formes peu solubles de ^{239}Pu est limitée, car elles sont internalisées par les MPs, et cette efficacité est peu caractérisée. De plus, son effet bénéfique sur l'apparition des pathologies retardées n'est pas documenté.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Si le développement de nouveaux agents chélateurs se poursuit, peu de candidats ont montré des effets comparables à ceux du DTPA associés à un profil de sécurité acceptable en terme d'effets indésirables (13). L'implication des MPs dans la rétention du ^{239}Pu associée à leur rôle majeur dans la réponse inflammatoire en font des cibles thérapeutiques d'intérêt. Une nouvelle stratégie thérapeutique associant le DTPA et un anti-inflammatoire possédant déjà une Autorisation de mise sur le marché (AMM), la dexaméthasone (DEX), a donc été envisagée (figure 1). Cette dernière est connue pour son effet sur la balance macrophagique se traduisant par une diminution globale de l'activation des macrophages impliqués dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (16,17). *In vivo*, la DEX a aussi permis d'atténuer le développement des fibroses induites par la bléomycine chez la souris (18). Cette nouvelle stratégie pharmacologique permettrait de combiner l'action chélatante du DTPA à l'effet anti-inflammatoire de la DEX, afin de réduire l'irradiation et l'inflammation chroniques et potentiellement, à terme, l'apparition de pathologies cancéreuses ou de fibroses.

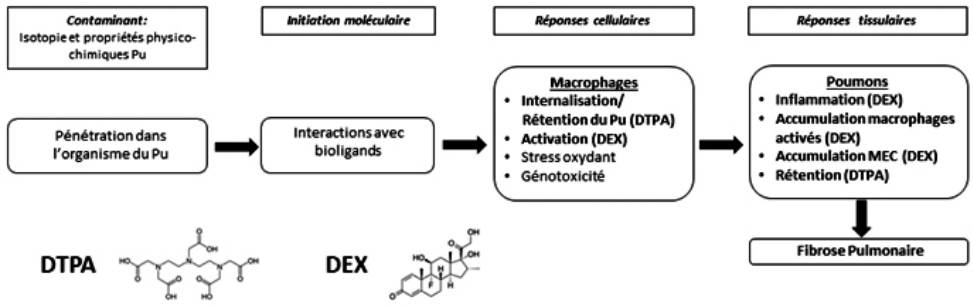


Fig. 1 : Stratégie thérapeutique basée sur la voie d'effet adverse reliant la contamination au plutonium et le développement de fibrose pulmonaire
©Alexandra Bourgois / IRBA et Anne Van der Meeren / CEA

La pénétration du Pu dans l'organisme est dépendante des propriétés physico-chimiques. Par la suite, le Pu interagit avec différents bioligands et est reconnu comme un corps étranger par le système immunitaire. Cette reconnaissance conduit à sa phagocytose par les MPs. Une fois dans le milieu intracellulaire, l'irradiation induite par le Pu est responsable d'une réponse cellulaire se traduisant par l'activation des MPs et la génèration de phénomènes de stress oxydant et de génotoxicité. Une réponse tissulaire est également observée au niveau pulmonaire avec une accumulation de MPs activés, de Matrice extracellulaire (MEC) et l'apparition d'une réponse inflammatoire.
À terme, la chronicité de ces événements conduit au développement de fibrose. Le DTPA permet de limiter l'internalisation et la rétention du Pu. La DEX diminue l'activation des MPs, leur accumulation pulmonaire, ainsi que celle de MEC et réduit la réponse inflammatoire.

Afin de valider la pertinence de cette association thérapeutique, une étude *in vitro* est en cours. Son objectif est d'évaluer la capacité de dissolution du Pu et l'effet anti-inflammatoire des molécules d'intérêt en combinaison avec un modèle précédemment validé pour la phagocytose, la dissolution et le relargage du Pu (lignée monocytaire THP-1 différenciée en macrophages) (19). Les cellules sont cultivées sur des inserts semi-perméables ou dans des plaques de culture pour étudier la dissolution du ^{239}Pu au cours du temps et la cinétique de production des médiateurs inflammatoires dans les surnageants cellulaires durant sept jours. Après présentation des modèles cellulaires et des techniques utilisés, des exemples de résultats préliminaires seront détaillés.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

1 Matériels et méthodes

1.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire monocytaire THP-1 (ATTC numéro TIB-202) est cultivée dans du milieu de culture Roswell Park Memorial Insitute (RPMI 1640) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Pan Biotech) et 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich). Les flasques contenant les cellules sont incubées à 37° C avec 5 % de CO_2 en atmosphère humide. En amont de la réalisation des expériences, les cellules sont ensemencées sur inserts semi-perméables ou dans des plaques de culture 24 puits (figure 2) et différenciées en macrophages par ajout de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 nM, Sigma-Aldrich) au milieu de culture suivi d'une incubation de 72 h (19).

1.2 Solution de contamination

La solution mère de plutonium (Pu) utilisée pour ces expériences provient des stocks du laboratoire de Radio Toxicologie du CEA et contient 94.40 % ^{239}Pu, 0.80 % ^{238}Pu et 4.80 % ^{241}Am en activités. Une forme peu soluble de Pu (colloïde, pH = 11,5) est produite extemporanément pour la réalisation de chaque expérience, comme précédemment décrit (20). La formation de colloïdes est vérifiée par contrôle visuel (formation d'agrégats s'absorbant aux parois) et par filtration (tailles de pores : 10/100/450/800 nm, MerckMilipore) associée à des mesures en Scintillation liquide (SL). Moins de 3 % de l'activité initialement déposée sur le filtre est mesurée après filtration, confirmant la polymérisation du Pu avec une majorité des polymères présentant une taille supérieure à 800 nm (données non montrées).

1.3 Contamination et traitement des cellules

Après différenciation, le milieu contenant le PMA est retiré et remplacé par du milieu de culture contenant les colloïdes de Pu. Les cellules ont été contaminées par ajout de 400 Bq par puit ou par insert (*via* le compartiment apical [figure 2]). La solution de contamination a été laissée deux heures au contact des cellules afin de permettre la phagocytose des colloïdes. À l'issue, elle a été remplacée par du milieu de culture avec ou sans traitement(s).

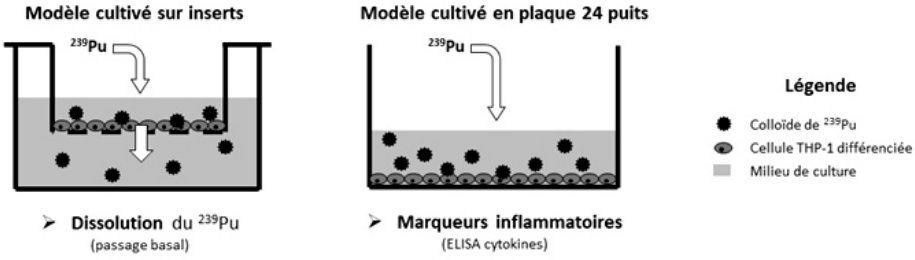


FIG. 2 : Modèles expérimentaux et paramètres étudiés ©Alexandra Bourgois / IRBA

Dans le premier modèle, les cellules THP-1 sont ensemencées dans des inserts afin d'étudier la dissolution du ^{239}Pu au cours du temps en présence ou non de traitement. Après sa dissolution, le ^{239}Pu diffuse de façon passive dans le compartiment basal et peut être mesuré. Dans le second modèle, les cellules THP-1 sont ensemencées dans des plaques de culture 24 puits et des dosages de marqueurs pro-inflammatoires (cytokines) sont réalisés sur les surnageants.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Le DTPA utilisé dans le cadre de ce projet est la forme associée à du trisodium de calcium (Na3[Ca-DTPA]) produite par la Pharmacie centrale des armées (PCA).
Les cellules ont été traitées avec 50 μM de DTPA et/ou 3.57 μM de Dexaméthasone (DEX, Sigma-Aldrich). Les surnageants des plaques de culture 24 puits et le milieu présent dans les compartiments basolatéraux des plaques avec inserts sont prélevés aux jours 1, 2, 4 et 7 post-contamination (24h, 48h, 72h et 168h) pour la réalisation d'analyses. Du milieu de culture complet avec ou sans traitement est ajouté dans les plaques après chaque prélèvement.

1.4 Évaluation de la viabilité cellulaire

L'étude de la viabilité cellulaire est réalisée au moyen d'un test d'intégrité membranaire CytoTox-ONE^{TM} (Promega). Le principe de ce test repose sur le dosage de la Lactate déshydrogénase (LDH). Les mêmes volumes de surnageants et de réactif CytoTox-ONE^{TM} sont mélangés dans des plaques 96 puits et incubés dix minutes à température ambiante avant l'ajout de solution stop comme recommandé par le fabricant. Le signal fluorescent est mesuré aux longueur d'ondes suivantes : λexc = 560 nm et λem = 590 nm, sur un lecteur de plaque multimodes Tristar 5 (Berthold Technologies). L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de LDH présente dans le surnageant. Les résultats sont exprimés en pourcentage de LDH libéré par rapport au contrôle RPMI (cellules non contaminées et non traitées).

1.5 Dissolution et relargage du plutonium

Les cellules THP-1 sont différenciées sur des inserts microporeux (003470, Corning) adaptés pour des plaques de culture 24 puits ($1x10^5$ cellules par insert). L'effet des traitements est suivi au cours du temps en prélevant le milieu de culture présent dans les compartiments basolatéraux 2h, 24h, 48h, 72h et 168h post-contamination. L'activité restant dans les surnageants apicaux après les deux heures de contamination est également mesurée afin de déterminer le pourcentage de phagocytose théorique :

$$Phagocytose\ théorique\ (\%) = \frac{activité\ initiale\ déposée\ (t0) - activité\ compartiment\ apical\ (2h)}{activité\ initiale\ déposée\ (t0)}$$

Après sept jours (168h), les inserts sont rincés avec du *Phosphate Buffered Saline* (PBS) et les cellules lysées au Triton X100 (9 %) afin de mesurer les activités apicales (surnageants) et cellulaires (cellules lysées). Ces données permettent de calculer la phagocytose effective selon la formule suivante :

$$Phagocytose\ effective\ (\%) = \frac{activité\ totale\ mesurée - activité\ compartiment\ apical\ (2h)}{activité\ totale\ mesurée}$$

$$Activité\ totale\ mesurée\ =\ compartiment\ apical\ (ca)\ 2h\ +\ compartiment\ basolatéral\ (cb)\ 24h\ +\ cb\ 48h\ +\ cb\ 72h\ +\ cb\ J7\ +\ ca\ J7\ +\ cellules\ J7$$

Les différents prélèvements sont dilués dans de l'Ultimagold A/B (Packard) avant la mesure en Scintillation liquide (SL) sur un compteur Tricarb (Packard).

Pour chaque expérience, des inserts sans cellules sont contaminés et traités pour assurer que le passage observé en présence des cellules n'est pas uniquement du à la diffusion passive du Pu au travers des inserts (données non montrées).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

1.6 Marqueurs pro-inflammatoires

La sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires et l'effet des traitements sur cette dernière sont évalués dans les surnageants cellulaires prélevés à différents temps post-contamination et traitement. Les cellules THP-1 sont différenciées dans des plaques de culture 24 puits ($3x10^5$ cellules par puits). Les concentrations de différentes cytokines sont mesurées dans les surnageants à l'aide de kits ELISA Duoset Humain (Bio-techne, R&D Systems) pour IL-1β , TNF-α, IL-10, IL-8, MCP-1 et IL-6 (limites de détection respectives = 3,91 pg/mL ; 15,63 pg/mL ; 31,25 pg/mL ; 31,25 pg/mL ; 15,63 pg/mL ; 9,38 pg/mL). Les tests sont effectués selon les instructions du fabricant. Les mesures sont réalisées sur le lecteur de plaque multimode Tristar 5 (Berthold Technologies) à 450 nm avec une correction 540 nm.

2 Résultats

2.1 Cytotoxicité des colloïdes de Pu et des traitements

Les premiers dosages de LDH réalisés sur les surnageants de culture cellulaire ne mettent pas en évidence d'augmentation importante du relargage de LDH suite à la contamination des cellules avec le Pu (figure 3). De même, la DEX n'est pas à l'origine de modification significative de ce paramètre. Néanmoins, les traitements par DTPA seul ou associé à la DEX induisent une augmentation modérée de libération de la LDH, se traduisant par des valeurs moyennes inférieures à 150 % par rapport au contrôle RPMI (figure 3). Enfin, aucune variation de cytotoxicité au cours du temps n'est observée sur le modèle étudié. Des valeurs comparables sont ainsi mesurées à 24h, 48h, 72h et J7 pour chacun des traitements étudiés (figure 3).

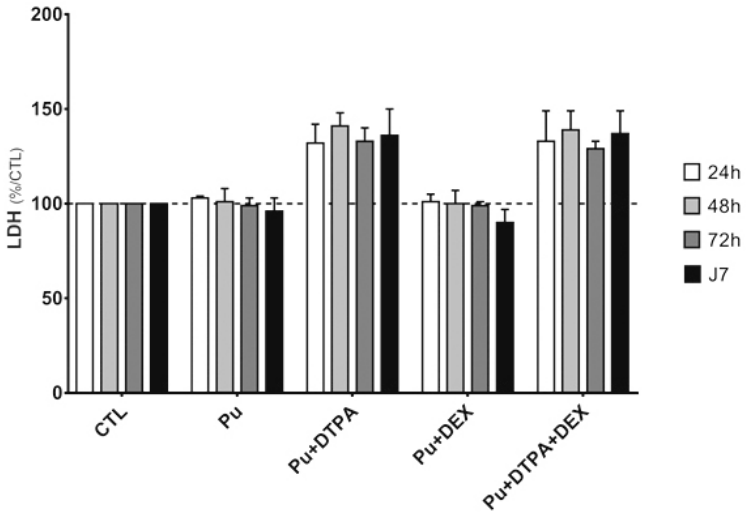


Fig. 3 : Viabilité cellulaire après contamination et traitements
©Alexandra Bourgois / IRBA

Les dosages de LDH ont été réalisés sur les surnageants de culture cellulaire recueillis de 24h à sept jours post-contamination à l'aide de kits CytotoxONE^{TM}. Les résultats sont présentés sous la forme des moyennes ± EC (%) du rapport entre les quantités de LDH mesurées dans l'échantillon et celle mesurée pour le contrôle (CTL).

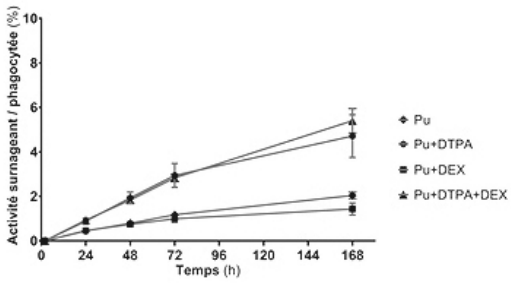
Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

2.2 Dissolution du Pu phagocyté par les MPs

Les mesures d'activités réalisées en SL ont permis de calculer les pourcentages théoriques et effectifs de phagocytose des colloïdes de Pu par les macrophages. Ces valeurs étaient respectivement comprises entre 71 % et 83 % et entre 66 % et 78 % à l'issue des deux heures d'incubation des cellules avec la solution de contamination (données non montrées).

Une augmentation significative de la dissolution des colloïdes de Pu phagocytés est mise en évidence après traitement des cellules par le DTPA (figure 4). Cet effet est visible à partir de 48h (figure 4 A) et s'accentue au cours du temps pour atteindre des valeurs comprises entre 4,71 % et 8,49 % après sept jours (figure 4 B). Aucune modification de la dissolution du Pu n'est observée suite au traitement par la DEX. Des valeurs inférieures à 2 % et similaires à celles obtenues avec les cellules contaminées non traitées sont mesurées (figure 4). Le traitement des cellules par la combinaison DTPA+DEX est à l'origine d'une augmentation significative de la dissolution du Pu dès 48h post-contamination (figure 4 A). Des valeurs de dissolution cumulées sur sept jours supérieures à 5 % ont été mesurées avec ce double traitement (figure 4 B).

A



B

Traitement	Activité Pu surnageant cumulée / activité phagocytée (7 jours post-contamination)	
	Moyenne (%)	EC (%)
Pu	2,04	0,15
	1,59	0,23
	1,46	0,13
Pu+DTPA	4,71	0,96
	8,49	0,54
	5,1	0,32
Pu+DEX	1,43	0,27
	1,47	0,09
	1,19	0,08
Pu+DTPA+DEX	5,4	0,55
	5,87	0,43
	5,25	0,76

FIG. 4 : Dissolution du Pu par les différents traitements ©Alexandra Bourgois / IRBA

Les dosages d'activité par SL ont été réalisés sur les surnageants de culture cellulaire recueillis de 24h à sept jours post-contamination. Les cellules ont été contaminées avec du Pu (colloïdes, 400 Bq/insert) et traitées avec du DTPA (50 μM) et/ou de la DEX (3,57 μM).
La figure A montre les résultats obtenus pour l'une des trois expériences indépendantes de dissolution du Pu réalisées. Elle présente les moyennes ± EC (%) de l'activité mesurée dans les surnageants rapportée à l'activité effective phagocytée par les cellules après deux heures au cours du temps pour chaque traitement (A).
Le détail des valeurs moyennes d'activité cumulée après sept jours dans les surnageants par rapport à l'activité effective phagocytée est présenté dans la figure B (EC = écart-type ; AS = analyse statistique).

2.3 Sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires induite par le Pu et effet anti-inflammatoire des traitements

La contamination des cellules avec le Pu est à l'origine d'une augmentation significative des concentrations en MCP-1 (figure 5) et IL-8 (figure 6) dès 24 h.
Cet effet est encore visible sept jours post-contamination. Le traitement avec du DTPA induit également des augmentations des concentrations en MCP-1 à tous les temps étudiés (figure 5). Des concentrations en IL-8 similaires au contrôle non contaminé sont mesurées 24h après traitement par le DTPA (figure 6 A). Néanmoins, une augmentation est observée en présence du DTPA 72h et sept jours post-traitement

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

(figures 6 B et C). Le traitement avec la DEX, seule ou associée au DTPA, réduit significativement les concentrations de MCP-1 dans les surnageants par rapport à celles mesurées chez les contrôles non contaminés (figures 5 A et B). Un retour à des valeurs similaires au contrôle est observé sept jours post-contamination en présence de DEX et de DEX+DTPA (figure 5 C). Une diminution significative des concentrations en IL-8 est constatée 24h après la contamination et le traitement (figure 6 A). La DEX, seule ou associée au DTPA, est à l'origine d'une diminution des concentrations d'IL-8 par comparaison au contrôle à 72h (figure 6 B) et des valeurs similaires à celles du contrôle sont retrouvées sept jours après la contamination (figure 6 C).

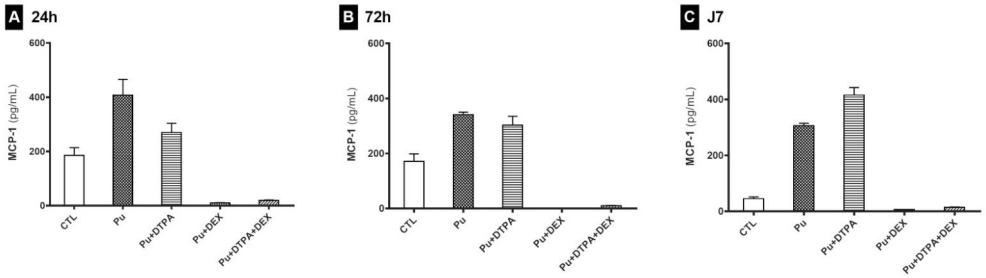


Fig. 5 : Concentrations en MCP-1 mesurées dans les surnageants cellulaires à différents temps post-contamination pour les traitements étudiés ©Alexandra Bourgois / IRBA

Les dosages des concentrations de MCP-1 ont été réalisés par méthode ELISA sur les surnageants de culture cellulaire recueillis à différents temps post-contamination et traitement. Les cellules ont été contaminées avec du Pu sous forme peu soluble (colloïdes, 400 Bq/puits) et traitées avec du DTPA (50 μM) et/ou de la DEX (3,57 μM). Les résultats sont présentés sous la forme des concentrations moyennes $\pm$ EC (pg/mL) pour les différentes conditions expérimentales 24h (A), 72h (B) et sept jours (C) après la contamination.

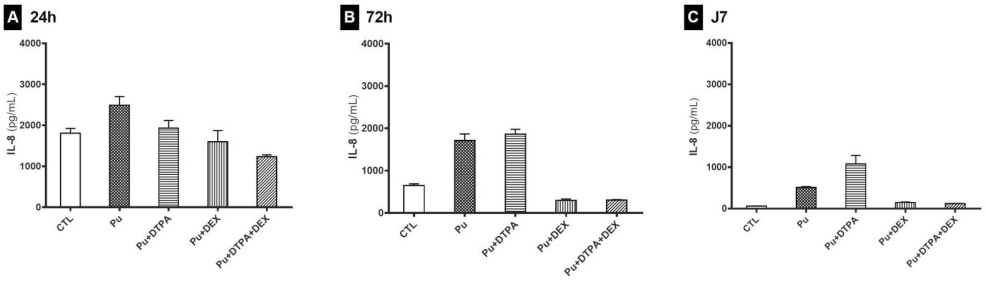


Fig. 6 : Concentrations en IL-8 mesurées dans les surnageants cellulaires à différents temps post-contamination pour les traitements étudiés ©Alexandra Bourgois / IRBA

Les dosages des concentrations d'IL-8 ont été réalisés par méthode ELISA sur les surnageants de culture cellulaire recueillis à différents temps post-contamination et traitement. Les cellules ont été contaminées avec du Pu sous forme peu soluble (colloïdes, 400 Bq/puits) et traitées avec du DTPA (50 μM) et/ou de la DEX (3,57 μM). Les résultats sont présentés sous la forme des concentrations moyennes $\pm$ EC (pg/mL) pour les différentes conditions expérimentales 24h (A), 72h (B) et sept jours (C) après la contamination.

Aucune modification significative des concentrations en TNF-α, IL-1, IL-6 et IL-10 n'est mesurée au cours des sept jours d'analyse (données non montrées).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

3 Discussion

L'objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer la pertinence d'un double traitement pharmacologique associant le DTPA et la DEX en cas de contamination interne avec une forme peu soluble de ^{239}Pu. Le choix de ces molécules repose sur leurs propriétés complémentaires (pouvoir chélatant du DTPA et effet anti-inflammatoire de la DEX) qui pourraient permettre de limiter le développement de fibroses pulmonaires post-contamination. Deux modèles cellulaires de THP-1 différenciées en MPs (cultivés dans des inserts semi-perméables ou dans des plaques de cultures 24 puits) sont mis en œuvre afin de déterminer l'effet de ce double traitement sur la dissolution du Pu et sur la sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires.

Les deux méthodes de calcul utilisées pour quantifier le pourcentage de phagocytose des colloïdes de Pu par les macrophages (phagocytose théorique et effective) ont conclu à des valeurs similaires et cohérentes, respectivement comprises entre 71 % et 83 % et entre 66 % et 78 %. Ces résultats confirment la pertinence du modèle utilisé pour étudier l'effet intracellulaire du DTPA, car la majorité du Pu est internalisé par les MPs. La différence observée entre les deux méthodes de calcul pourrait être liée à l'adsorption des colloïdes de Pu aux parois de leur contenant au cours de leur préparation, conduisant à une surestimation de l'activité initiale déposée par rapport à l'activité totale mesurée en fin d'expérimentation.

Les résultats obtenus lors de l'analyse de la viabilité cellulaire ont mis en évidence une augmentation modérée des concentrations de LDH dans toutes les conditions expérimentales contenant du DTPA (figure 3). Ces observations suggèrent une légère cytotoxicité du DTPA à la concentration étudiée (50 μM). L'étude de la dissolution du Pu et de la sécrétion de marqueurs inflammatoires reste néanmoins possible dans ces conditions expérimentales, comme précédemment démontré lors d'expérimentations sur des cellules Calu-3 traitées avec la même concentration de DTPA (20).

Le traitement des cellules contaminées avec le DTPA permet la solubilisation d'une partie du Pu phagocyté (figure 4). Or, les résultats rapportés dans la littérature mentionnent un effet du DTPA majoritairement sur la fraction acellulaire du Pu (25). Certaines publications mentionnent néanmoins la capacité du DTPA à chélater du Pu intracellulaire. Cependant, elles ne détaillent pas la forme physico-chimique de Pu et ne présentent aucune donnée quantitative (12). Les résultats obtenus dans le cadre de notre étude confirment cette capacité du DTPA à partiellement remobiliser du Pu précédemment phagocyté par des MPs. Elle reste néanmoins marginale, avec moins de 10 % de dissolution (figure 4) et confirme la nécessité d'améliorer la prise en charge thérapeutique de la contamination interne au Pu avec des formes peu solubles.

Le panel de cytokines pro et anti-inflammatoires étudié (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 et TNF-α) a été sélectionné après étude de la littérature concernant les phénomènes inflammatoires pulmonaires et le rôle des MPs. IL-8 possède des propriétés chémoattractantes et activatrices des polynucléaires neutrophiles (PNN) (26).
MCP-1 induit, quant à lui, le recrutement des monocytes (27). De façon intéressante, les deux cytokines du panel testé dont les concentrations sont augmentées en présence de Pu, MCP-1 et IL-8, ont déjà été identifiées dans des LBA de patients souffrants de sarcoidose, pneumopathie d'hypersensibilité ou de fibrose pulmonaire (28, 29).

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Les augmentations des concentrations de MCP-1 et IL-8 mesurées lors de nos expérimentations semblent donc cohérentes avec la physiopathologie de la contamination au Pu observée chez l'Homme et pouvant aboutir au développement de pathologies fibrotiques. L'effet de la combinaison thérapeutique étudiée sur ces biomarqueurs, diminution de leurs concentrations, pourrait donc se traduire par une réduction du développement tardif de fibroses pulmonaires *in vivo*. D'autant plus qu'*in vivo*, les pneumocytes de type II participent également à la sécrétion de ces deux cytokines au niveau pulmonaire (30), faisant de ces dernières des cibles thérapeutiques primordiales.

Actuellement, le développement de nouveaux agents chélateurs se poursuit (13), mais peu de molécules prometteuses ont pu être identifiées jusqu'à présent.
Le 4,3-LI (1,2-HOPO) constitue une piste d'intérêt car il possède une forte affinité pour le Pu tout en induisant peu d'effets indésirables (14, 15). Pour pallier le manque de nouvelles molécules, des études visant à optimiser l'utilisation du DTPA (nouvelles formes galéniques ou voies d'administration) sont également en cours.
Dans ce contexte, la perspective de recours à des associations pharmacologiques basées sur des molécules déjà commercialisées pourrait, donc, constituer une alternative intéressante pour l'amélioration de la prise en charge de la contamination interne à court terme.

Conclusion

L'étude réalisée a permis de confirmer la pertinence théorique de l'association DTPA et DEX dans un contexte de contamination au Pu. En effet, les résultats obtenus ont mis en évidence une conservation du pouvoir chélatant et de l'effet anti-inflammatoire respectifs des molécules en cas d'association. De plus, aucune augmentation marquée de toxicité n'a été rapportée dans le cas du double traitement. Ces observations devront être confirmées *in vivo* sur un modèle de rats contaminés avant d'envisager une utilisation chez l'Homme. De plus, l'association du DTPA et de la DEX avec une troisième molécule au mécanisme d'action complémentaire est également envisagée : l'ambroxol (AMB). Cette dernière possède des propriétés mucolytiques et expectorantes qui permettraient de favoriser l'élimination mécanique du Pu après inhalation en complément de la décorporation et de la limitation de l'inflammation.
L'objectif final de ces travaux sera d'améliorer la prise en charge thérapeutique en cas de contamination radiologique interne.

Financements

Ce projet de recherche est financé par la Direction Générale de l'Armement (DGA) *via* le budget BIOMEDEF NBC-5-NR-4308.

Contributions des auteurs

AB a réalisé les expérimentations, analysé les données, interprété les résultats et rédigé l'article. GC a réalisé les expérimentations et a participé à l'analyse des données.
CLG a pris part à une partie des expérimentations. MD, NG et AVDM ont initié ce projet et rendu possible la collaboration entre l'IRBA et le CEA. DR, MD, SF, NG, SLM et AVDM ont participé à la supervision du projet. DR, SF et AVDM ont contribué aux relectures et aux corrections de ce manuscrit.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

Approbation éthique et consentement à la participation

Non applicable aux recherches réalisées *in vitro*.

Remerciements à la linguiste relectrice : France Lepez.

Références bibliographiques

1. Rump A, Stricklin D, Lamkowski A, Eder S, Abend M, Port M. Reconsidering Current Decorporation Strategies after Incorporation of Radionuclides. Health Phys. 2016 ;111(2) :204-11.

2. Van der Meeren A, Gremy O, Renault D, Miroux A, Bruel S, Griffiths N, *et al.* Plutonium behavior after pulmonary administration according to solubility properties, and consequences on alveolar macrophage activation. J Radiat Res. 2012 ;53(2) :184-94.

3. Gremy O, Tsapis N, Bruel S, Renault D, Van der Meeren A. Decorporation approach following rat lung contamination with a moderately soluble compound of plutonium using local and systemic Ca-DTPA combined chelation. Radiat Res. 2012 ;178(3) :217-23.

4. Van der Meeren A, Tourdes F, Gremy O, Grillon G, Abram MC, Poncy JL, *et al.* Activation of alveolar macrophages after plutonium oxide inhalation in rats : involvement in the early inflammatory response. Radiat Res. 2008 ;170(5) :591-603.

5. Sanders CL, Lauhala KE, McDonald KE. Lifespan studies in rats exposed to ^{239}PuO2 aerosol. III. Survival and lung tumours. Int J Radiat Biol. 1993 ;64(4) :
417-30.

6. Wilson DA, Mohr LC, Frey GD, Lackland D, Hoel DG. Lung, liver and bone cancer mortality after plutonium exposure in beagle dogs and nuclear workers. Health Phys. 2010 ;98(1) :42-52.

7. Gilbert ES, Koshurnikova NA, Sokolnikov ME, Shilnikova NS, Preston DL, Ron E, *et al.* Lung cancer in Mayak workers. Radiat Res. 2004 ;162(5) :505-16.

8. Azizova T, Moseeva M, Grigoryeva E, Zhuntova G, Bannikova M, Sychugov G, *et al.* Registry of Plutonium-induced Lung Fibrosis in a Russian Nuclear Worker Cohort. Health Phys. 2020 ;118(2) :
185-92.

9. Newman LS, Mroz MM, Ruttenber AJ. Lung fibrosis in plutonium workers. Radiat Res. 2005 ;164(2) :
123-31.

10. Bair WJ, Park JF, Dagle GE, James AC. Overview of biological consequences of exposure to plutonium and higher actinides. Radiation Protection Dosimetry. 1989 ;26(1-4) :125-35.

11. IAEA. Medical Management of Persons Internally Contaminated with Radionuclides in a Nuclear or Radiological Emergency. Vienna : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ; 2018.

12. Menetrier F, Grappin L, Raynaud P, Courtay C, Wood R, Joussineau S, *et al.* Treatment of accidental intakes of plutonium and americium : guidance notes. Appl Radiat Isot. 2005 ;62(6) :829-46.

13. Fattal E, Tsapis N, Phan G. Novel drug delivery systems for actinides (uranium and plutonium) decontamination agents. Adv Drug Deliv Rev. 2015 ;90 :40-54.

14. Choi TA, Furimsky AM, Swezey R, Bunin DI, Byrge P, Iyer LV, *et al.* In vitro metabolism and stability of the actinide chelating agent 3,4,3-LI(1,2-HOPO). J Pharm Sci. 2015 ;104(5) :1832-8.Plus loin

15. Bunin DI, Chang PY, Doppalapudi RS, Riccio ES, An D, Jarvis EE, *et al.* Dose-dependent efficacy and safety toxicology of hydroxypyridinonate actinide decorporation agents in rodents : towards a safe and effective human dosing regimen. Radiat Res. 2013 ;179(2) :171-82.

16. Sang X, Wang Y, Xue Z, Qi D, Fan G, Tian F, *et al.* Macrophage-Targeted Lung Delivery of Dexamethasone Improves Pulmonary Fibrosis Therapy *via* Regulating the Immune Microenvironment. Front Immunol. 2021 ;12 :613907.

17. Kim BY, Son Y, Lee J, Choi J, Kim CD, Bae SS, *et al.* Dexamethasone inhibits activation of monocytes/macrophages in a milieu rich in 27-oxygenated cholesterol. PLoS One. 2017 ;12(12) :e0189643.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nucleaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427

18. Shi K, Jiang J, Ma T, Xie J, Duan L, Chen R, *et al.* Dexamethasone attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice through TGF-beta, Smad3 and JAK-STAT pathway. Int J Clin Exp Med. 2014 ;7(9) :2645-50.

19. Van der Meeren A, Moureau A, Laurent D, Laroche P, Angulo JF. In vitro assessment of plutonium uptake and release using the human macrophage-like THP-1 cells. Toxicol In Vitro. 2016 ;37 :25-33.

20. Van der Meeren A, Drouet G, Devilliers K, Laurent D, Moureau A, Feray A, *et al.* Evidence for a differential translocation of actinides across human lung epithelial cell monolayer in vitro according to their physicochemical properties and the presence of a chelating agent. Toxicol In Vitro. 2021 ;70 :105035.

21. Boyken J, Frenzel T, Lohrke J, Jost G, Schutz G, Pietsch H. Impact of Treatment With Chelating Agents Depends on the Stability of Administered GBCAs : A Comparative Study in Rats. Invest Radiol. 2019 ;54(2) :76-82.

22. Prasse A, Muller-Quernheim J. Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis. Respirology. 2009 ;14(6) : 788-95.

23. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1 : chemoattractant with a role beyond immunity : a review. Clin Chim Acta. 2010 ;411(21-22) :1570-9.

24. Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 1994 ;149(3 Pt 1) :655-9.

25. Willems S, Verleden SE, Vanaudenaerde BM, Wynants M, Dooms C, Yserbyt J, *et al.* Multiplex protein profiling of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. Ann Thorac Med. 2013 ;8(1) :38-45.

26. Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. J Immunol. 2007 ;178(1) :463-73.

Published in : SERVICE DE SANTÉ DES ARMÉES, - (dir.), *Médecine et Armées Vol.50 No.2. Menace nuclaire et radiologique*, Editions des archives contemporaines, ISBN : 9782813005427, doi : 10.17184/eac.9782813005427