PRÉSIDENCE DU CONSEIL

COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

Fixation du cérium radioactif (^{144}Ce) sur les globules blancs. Possibilité d'emploi en physiopathologie

par

A. AEBERHARDT

Rapport CEA n° **1044**

1958

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY
SERVICE DE DOCUMENTATION
Boite postale n° 2 - Gif-sur-Yvette (S.-et-O.)

AEBERHARDT A.

Rapport CEA n° 1 044

Fixati n du cérium-144 radi a tif sur les gl bules blancs possibilités d' mploi n physiopathol gie.

Sommair . — L'étude du mode de transport du cérium dans le sang chez différents animaux de laboratoire, après injection intra-veineuse de ^{144}Ce-^{144}Pr sans entraîneur, nous a permis de mettre en évidence le rôle des globules blancs dans le transport de ce produit de fission au cours de son passage dans le sang.

Cette constatation nous a conduit à étudier, in vitro, les modalités de la fixation du cérium sur les globules blancs afin de préciser les possibilités d'utilisation de cette propriété pour le marquage des globules blancs, les méthodes employées jusqu'ici ne donnant pas entière satisfaction.

Disposant de la méthode de séparation des éléments figurés du sang que nous avons proposée en 1956, nous avons étudié la fixation du cérium, dans diverses conditions :
— sur des suspensions de globules blancs de lapin,
— sur une suspension de globules blancs humains,
— sur les globules blancs dans le sang total de lapin.

1958 10 pages

AEBERHARDT A.

Report CEA n° 1 044

Fixation of radioactive cerium-144 on white blood cells. Possibilities for use in physiopathology.

Summary. — From the study of the means of transport of cerium in the blood of various laboratory animals, after intra-veinous injection of ^{144}Ce-^{144}Pr without carrier, we have been able to show up the part played by the white cells in the transport of this fission product during its passage in the blood.

This observation has led to the study, in vitro, of the methods of cerium fixation on the white cells, with a view to determining the possibilities of using this property for white cell labelling, the methods used up to the present not being entirely satisfactory.

Using the method for the separation of the known constituents of the blood proposed by us in 1956, we have studied the cerium fixation under various conditions :
— on suspensions of white cells from the rabbit,
— on a suspension of human white cells,
— on the white cells in whole from the rabbit.

1958 10 pages

FIXATION DU CERIUM 144 RADIOACTIF SUR LES GLOBULES BLANCS

POSSIBILITES D'EMPLOI EN PHYSIOPATHOLOGIE

Dr. A. AEBERHARDT(*)

(Service de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay, France)

L'étude du mode de transport du Cérium dans le sang chez différents animaux de laboratoire, après injection intra-veineuse de Ce_{144}-Pr_{144} sans entraineur, nous a permis de mettre en évidence le rôle des globules blancs dans le transport de ce produit de fission au cours de son passage dans le sang.

Cette constatation nous a conduit à étudier, in vitro, les modalités de la fixation du Cérium sur les globules blancs afin de préciser les possibilités d'utilisation de cette propriété pour le marquage des globules blancs, les méthodes employées jusqu'ici ne donnant pas entière satisfaction.

Disposant de la méthode de séparation des éléments figurés du sang que nous avons proposée en 1956 (1), nous avons étudié la fixation du Cérium, dans diverses conditions :

- sur des suspensions de globules blancs de lapin,
- sur une suspension de globules blancs humains,
- sur les globules blancs dans le sang total de lapin.

(*) Services de Santé des Armées, détaché au Commissariat à l'Energie Atomique.

METHODES EXPERIMENTALES

1 Préparation des suspensions globulaires.

Lapin : la méthode de séparation des éléments figurés du sang que nous avons utilisée permet le fractionnement de quantités de sang de l'ordre de 5 à 10 ml en trois fractions : plasma, globules blancs et globules rouges, sans addition de substances étrangères. La souillure par les globules rouges résiduels, de la suspension de globules blancs obtenue, est très faible. Les cellules ont subi le minimum de manipulations dans des conditions telles que leur état physiologique n'est pas altéré.

Notre méthode de séparation des éléments figurés du sang met en oeuvre une centrifugation contrôlée dans un dispositif spécial composé de deux tubes concentriques communiquant à leur partie inférieure. Le sang est maintenu dans le tube central, pendant la centrifugation, par une petite quantité de mercure introduite au fond des tubes Après centrifugation, l'introduction contrôlée de mercure dans le tube extérieur provoque l'ascension lente du contenu du tube central et permet la séparation successive, à la partie supérieure, des différentes fractions plasmatiques et globulaires.

10 à 20 ml de sang sont prélevés chez un lapin hépariné. Le sang est recueilli au moyen d'un trocart hépariné ou siliconé, dans un tube siliconé, maintenu à 0° C.

Immédiatement après prélèvement, le sang est placé dans le dispositif de séparation, centrifugé pendant 20 minutes à 1500 g dans une centrifugeuse refroidie. Les différentes fractions sont séparées Les globules blancs isolés, lavés au sérum physiologique isotonique, sont mis en suspension dans 1 ml de sérum physiologique NaCl à 9 ‰ à pH 7,4.

Globules blancs humains : la suspension de globules blancs humains utilisée (500.000 globules blancs par mm^3), nous a été fournie par le Centre de Transfusion de l'Armée (Clamart). Elle a été obtenue à partir d'une quantité importante de sang provenant de nombreux donneurs. Elle ne contient pratiquement pas de globules rouges.

2 Fixation du Cérium sur les suspensions globulaires.

Lapin : la solution d'origine de Ce_{144}-Pr_{144} sans entraineur, est diluée à la concentration convenable dans du sérum physiologique, NaCl à 9 ‰ et amenée au pH désiré. A 1 ml de la suspension d'éléments blancs, on ajoute 0,1 ml de la solution diluée de Ce_{144}-Pr_{144}. L'incubation, de durée variable, est assurée à température constante (37° C) avec agitation continue. Les globules blancs sont ensuite séparés par centrifugation, lavés deux fois au sérum physiologique et remis en suspension dans 0,5 ml de sérum

physiologique La radioactivité des globules blancs, du surnageant (milieu d'incubation) et des eaux de lavage est déterminée au moyen d'une installation de comptage courante (compteur Geiger-Muller à fenêtre mince).

Dans une autre série d'expériences, la solution de Ce_{144}-Pr_{144} a été utilisée pour marquer le plasma recueilli au cours du fractionnement. A 5 ml de ce plasma marqué, on ajoute la suspension globulaire et l'incubation est conduite dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Globules blancs humains : 1 ml de la suspension de globules blancs humains est additionné de 19 ml de sérum physiologique NaCl à 9 ‰, pH 7,4. A cette suspension diluée, on ajoute 1 ml de solution diluée de Ce_{144}-Pr_{144} ($CeCl_3$) en milieu physiologique, NaCl à 9 ‰. L'incubation, la séparation des globules blancs et la détermination de la répartition de la radioactivité sur les différentes fractions sont réalisées dans les mêmes conditions que pour les globules blancs de lapin.

3. Fixation du Cérium sur les globules blancs dans le sang

Le sang de lapin est prélevé dans les conditions citées précédemment. A 10 ml de sang, on ajoute 0,1 ml de la solution diluée de Ce_{144}-Pr_{144} (chlorure ou nitrate sans entraineur). L'incubation est conduite pendant des durées variables (30 minutes à 2 h.30) avec agitation continue. La radioactivité spécifique du sang total est mesurée avant et après incubation afin de préciser l'importance d'une adsorption éventuelle sur les parois au cours de l'incubation. Après incubation, les fractions du sang sont séparées. Les globules blancs sont lavés deux fois au sérum physiologique et la répartition de la radioactivité entre les différentes fractions séparées est déterminée par comptage de fractions aliquotes du plasma et des globules rouges et de la totalité des globules blancs recueillis, après destruction au mélange nitrique-perchlorique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

1. Fixation du Cérium sur les globules blancs de lapin, in vitro.

La fixation du Cérium sur les globules blancs séparés de lapin a été étudiée dans des conditions diverses, faisant varier soit le milieu d'incubation (nature et pH), soit la durée d'incubation.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I Ils sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans les différentes fractions : globules blancs, milieu d'incubation, eaux de lavage.

TABLEAU I

FIXATION DU CERIUM SUR LES GLOBULES BLANCS DE LAPIN, IN VITRO

CONDITIONS D'INCUBATION					REPARTITION (% de radioactivité totale)			
NATURE DU SEL	MILIEU	pH	DUREE	TEMPE-RATURE	G.B.	MILIEU	EAUX DE LAVAGE	
							1ères	2èmes
$CeCl_3$	Sérum physiologique NaCl à 9 ‰	5-6	1 h.	37° C	25 (a)	75	1 à 3	1
$Ce(NO_3)_3$	d°	4	1 h.	37° C	25	75	1 à 2	1
$Ce(NO_3)_3$	d°	7,5	1 h.	37° C	20 à 25	65 à 70	5 à 10	2
$CeCl_3$	Citrate/phosphate	5	1 h.	37° C	1 à 2	98	-	-
$CeCl_3$	d°	7,5	1 h.	37° C	1 à 2	98	-	-
$CeCl_3$	d°	8	1 h.	37° C	15	85	1 à 2	1
$CeCl_3$	Plasma	-	2h.30	37° C	25	75	1 à 3	1

(a) fraction fixée après lavages.

G.B. : globules blancs.

2. Fixation du Cérium sur les globules blancs humains.

Compte tenu des résultats obtenus avec les globules blancs de lapin, la fixation sur les globules blancs humains a été étudiée dans les conditions nous ayant donné les meilleurs résultats, c'est-à-dire en utilisant une solution de $CeCl_3$ dans le sérum physiologique NaCl à 9 ‰ à pH 6.

La répartition a été étudiée en fonction de la durée et de la température d'incubation. Les résultats expérimentaux ont été rassemblés dans le tableau II. La fraction fixée sur les globules blancs est exprimée en pourcentage de la dose initiale dans la suspension étudiée.

La fixation sur les globules blancs humains, dans ces conditions, est rapide après incubation à 37° C. Elle atteint 25 à 35 % de la radioactivité initiale, après deux lavages. A 20° C, la fixation est lente. Elle n'est que de 10 % après un contact de 60 minutes et est maxima après 24 heures de contact.

La fraction entrainée par les lavages successifs est nettement plus importante après incubation à 20° C qu'après incubation à 37° C. Elle est d'autre part plus grande, proportionnellement, après une incubation de courte durée qu'après une incubation prolongée, quelle que soit la température d'incubation.

3. Fixation du Cérium sur les globules blancs dans le sang total de lapin, in vitro.

La fixation du Cérium par les éléments blancs, par incubation de sang total de lapin, a été étudiée en fonction de la nature de l'anion ($CeCl_3$ et $Ce(NO_3)_3$) et du pH de la solution de Ce_{144}-Pr_{144} utilisée, pour une durée d'incubation de 1 h.30.

La durée d'incubation a varié de 30 minutes à 2 h 30 pour la solution de $CeCl_3$ à pH 5-6.

Les solutions en milieu tamponné n'ont pas été étudiées compte tenu des résultats obtenus au cours des expériences in vitro sur les globules blancs de lapin.

Les résultats expérimentaux sont groupés dans le tableau III. Ils sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale retrouvée dans les différentes fractions et dans les eaux de lavage.

Après incubation de sang total de lapin à 37° C, la fixation du Cérium sur les globules blancs est comparable à celle constatée au cours des expériences analogues à partir de suspensions de globules blancs en milieu physiologique NaCl à 9 ‰ ou en milieu plasmatique homologue.

Cependant certaines différences dans le taux de fixation et dans la vitesse de fixation sont constatées.

TABLEAU II

FIXATION DU CERIUM SUR LES GLOBULES BLANCS HUMAINS IN VITRO APRES INCUBATION DANS UNE SOLUTION DE CeCl3 DANS LE SERUM PHYSIOLOGIQUE A 9 ‰ A pH 6

DUREE DE L'INCUBATION	TEMPERATURE D'INCUBATION	REPARTITION % de la dose initiale			
		Globules blancs	Milieu d'incubation	Eaux de lavage 1ères	Eaux de lavage 2èmes
15 mn	37° C	35	57	5	2,7
30 mn	37° C	29	62	8	1
60 mn	37° C	28	60	8	4
120 mn	37° C	38	59	1	1
60 mn	20° C	10	85	5	1
24 h.	20° C	31	48	13	7

TABLEAU III

REPARITION DU CERIUM DANS LE SANG TOTAL DE LAPIN, IN VITRO (SOLUTIONS DE SELS DE CERIUM EN SERUM PHYSIOLOGIQUE NaCl A 9 ‰)

CONDITIONS D'INCUBATION				REPARTITION (% de la radioactivité totale)				
NATURE DU SEL	pH	DUREE	TEMPERATURE	G.B.	PLASMA	G.R.	EAUX DE LAVAGE DES G.B. 1ères	EAUX DE LAVAGE DES G.B. 2èmes
CeCl3	5-6	30 m.	37° C	5	95	1	1	1
CeCl3	5-6	60 m.	37° C	10	90	1	1 à 2	1
CeCl3	5-6	1h30	37° C	15 à 25	73 à 85	1 à 2	1 à 2	1
CeCl3	5-6	2h30	37° C	15 à 25	70 à 85	1 à 5	1 à 2	1
CeCl3	4	1h30	37° C	20 à 30	30 à 60	20 à 40	1 à 3	1
CeCl3	11	1h30	37° C	40 à 50	variable		1	5
$Ce(NO_3)_3$	4	sans incubation	-	10	90	1 à 2	1 à 2	1
$Ce(NO_3)_3$	4	1h30	37° C	20 à 25	75 à 80	1 à 8	1 à 4	1
$Ce(NO_3)_3$	8	1h30	37° C	30	variable		5 à 10	1 à 2

G B. : globules blancs G.R. : globules rouges

La fixation sur les globules blancs dans le sang total est plus lente : elle nécessite une incubation prolongée pendant 1 h.30 pour atteindre le maximum de 15 à 25 %.

Elle est stable : les lavages successifs n'entrainent que quelques pour-cents de la radioactivité retrouvée avant lavage sur les globules blancs.

Le taux de fixation n'est pas constant, tout en restant important (15 à 25 %), en relation semble-t-il avec l'origine du sang utilisé (lapins différents)

Lorsque le Cérium est colloïdal dans la solution utilisée ($CeCl_3$ à pH 11 et $Ce(NO_3)_3$ à pH 8), la fixation est plus importante sur les globules blancs (elle atteint 30 à 50 %), mais une certaine quantité de Cérium est retrouvée dans les globules rouges La répartition entre le plasma et les globules rouges est très variable d'une expérience à l'autre ; ce fait parait lié à l'état colloïdal du Cérium, qui, dans ce cas, est réparti d'une façon non homogène entre ces deux fractions. La radioactivité retrouvée dans les globules rouges est éliminée très facilement par dilution suivie d'une centrifugation légère, montrant que le Cérium n'est pas fixé sur les globules rouges.

La fixation sur les globules blancs est durable : elle résiste non seulement à deux lavages successifs au sérum physiologique, mais également à un contact de 24 h. dans le sérum physiologique à la température du laboratoire et à une incubation de 2 h.30 à 37° C dans le plasma homologue non marqué, séparé au cours du fractionnement de sang non marqué. Dans ce cas, 96 % de la radioactivité fixée initialement sur les globules blancs sont retrouvés sur ces cellules et 4 % seulement sont libérés dans le plasma.

INTERPRETATION & DISCUSSION.

Les résultats expérimentaux exposés ci-dessus montrent une fixation importante du Cérium sur les globules blancs, fixation constatée aussi bien après incubation d'une suspension de globules blancs isolés que sur les globules maintenus dans leur milieu.

Cette fixation est importante (25 % de la radioactivité initiale), durable. Les conditions optima de fixation sont réalisées par incubation d'une suspension de globules blancs isolés, en suspension en milieu NaCl à 9 ‰, la solution de sel céreux étant à pH 6 ($CeCl_3$) ; l'incubation est prolongée pendant 1 h. à 37° C avec agitation continue.

L'absence de fixation en milieu tamponné à base de citrate est due à la formation d'un complexe stable du Cérium avec cet anion, empêchant la fixation du Cérium sur les globules blancs.

En milieu NaCl à 9 ‰, en l'absence d'agents complexants, la fixation du Cérium sur les globules blancs peut être attribuée à la formation d'un complexe de ce cation avec les acides nucléiques,

existant en quantité importante dans les globules blancs.

Aux pH alcalins de la solution de marquage, un autre mécanisme peut jouer un rôle mal précisé : en effet, aux pH neutre et alcalin, le Cérium est partiellement transformé en $Ce(OH)_3$, à l'état colloïdal. L'étude du comportement physico-chimique des solutions de différents sels céreux aux concentrations "traceuses" (10^{-8} à 10^{-10}M) nous a montré que pour des solutions de chlorure céreux à pH compris entre 5 et 7, celui-ci était pratiquement ionique, alors qu'il n'est totalement colloïdal que pour un pH de 11. Par contre, les solutions de Cérium (nitrate) sans entraineur, sont ioniques pour les pH inférieurs à 4 et colloïdales à un pH de 7. Aux pH utilisés au cours de ces expériences, la forme physico-chimique des sels de Cérium est différente. En particulier, dans les solutions de $CeCl_3$ à pH 11 et dans celles de $Ce(NO_3)_3$ à pH 8, le Cérium est certainement colloïdal. Dans ces conditions, un entrainement par adsorption peut intervenir : le fait de l'entrainement par les lavages d'une fraction notable de la radioactivité initialement retrouvée sur les globules blancs, est en faveur de cette hypothèse.

Dans le sang total, les autres constituants du sang entrent en compétition avec les globules blancs pour la fixation du Cérium. A l'état ionique, le Cérium se fixe sur les protéines du plasma et sur les globules blancs. Cependant ceux-ci fixent lentement une fraction importante de Cérium (initialement lié aux protéines) et l'équilibre ne parait atteint qu'après un certain temps de contact : ce fait est démontré par la fixation du Cérium par les globules blancs en milieu plasmatique marqué et par le rôle de la durée d'incubation, lorsque des protéines plasmatiques existent dans le milieu d'incubation.

Dans les conditions précisées ci-dessus, le marquage des globules blancs est électif après une durée d'incubation de 1 h 30.

POSSIBILITES D'EMPLOI EN PHYSIOPATHOLOGIE.

Le marquage des globules blancs par les radioéléments a été réalisé jusqu'ici soit :

- in vivo, par injection de P32 (WEISBERGER & Coll.(2)) ou de S_{35} (WEISBERGER & LEVINE (3)) chez l'animal. Ces deux éléments sont incorporés, par les processus métaboliques normaux, aux acides nucléiques ou aux acides aminés des cellules,

- soit in vitro, par incubation de suspensions de globules blancs dans un milieu contenant du P_{32} (JULLIARD & Coll. (4)) ou du Cr_{51}, (chromate de sodium)(Mc CALL & Coll. (5)).

La propriété des globules blancs de fixer le Cérium, mise en évidence au cours des expériences relatées ci-dessus, met à la

disposition des chercheurs une nouvelle méthode de marquage in vitro des globules blancs. Elle présente des avantages importants sur les méthodes de marquage de ces cellules par les radioéléments, proposées jusqu'à maintenant.

En effet, la fixation in vitro du P_{32} sur les globules blancs est peu importante (1 à 6 % de la radioactivité initiale) et celle du Cr_{51} est inconstante et très variable (5 à 85 %). Dans ces deux cas, la fixation est précaire : MAUPIN (6) fixe la durée de l'expérimentation au moyen de globules blancs marqués au P_{32} à 20 minutes.

Au contraire, la fixation du Cérium par les globules blancs isolés est importante, constante et durable. Elle peut être obtenue soit par incubation en sérum physiologique, soit par incubation dans le plasma du donneur, marqué au préalable. Après une centrifugation douce, le plasma marqué peut être remplacé par du plasma homologue non marqué. Dans ces conditions, le séjour des globules blancs en milieu artificiel est réduit au minimum, limitant au maximum les altérations de ces cellules particulièrement fragiles.

Par une technique analogue, il est possible d'obtenir un échantillon de sang du donneur, dans lequel seuls les globules blancs sont marqués.

En pratique, chez l'animal de laboratoire, l'utilisation simultanée des méthodes de séparation des globules blancs et du marquage par le Cérium radioactif, permet l'étude du temps de séjour intravasculaire des globules blancs et celles du devenir de ces cellules dans l'organisme, dans de meilleures conditions que celles résultant de l'emploi des autres méthodes de marquage par les radioéléments. Des études en cours chez le lapin ont confirmé la disparition rapide des éléments blancs marqués du sang circulant, une localisation importante de la radioactivité dans les poumons 7 minutes après la réinjection, par voie veineuse, des globules blancs marqués.

Chez l'homme, le marquage des globules blancs par l'une ou l'autre des méthodes proposées, peut apporter des renseignements précieux, en particulier au cours des affections de type leucémique L'intérêt réside dans la possibilité de marquer les propres globules blancs du malade, à partir d'une quantité de sang peu importante, et de les réinjecter dans un bref délai, après un séjour hors de l'organisme de courte durée et dans des conditions peu traumatisantes pour les cellules blanches.

Cependant, le Cérium 144 ne parait pas pouvoir être utilisé sans risque chez l'homme : la période radioactive longue (290 jours), l'énergie maximum des rayons béta émis par son descendant en équilibre, le Pr_{144} (2,98 MeV), les localisations hépatique et osseuse, la période biologique importante reconnue à ce produit de fission, interdisent son emploi en clinique humaine.

Par contre, deux autres radioisotopes du Cérium, le Ce_{141} et le Ce_{143} paraissent pouvoir être utilisés sans risque chez

l'homme ; leurs périodes sont respectivement de 32 jours et de 32 heures et l'énergie des rayons béta émis est faible (0,57 MeV)

BIBLIOGRAPHIE

1 AEBERHARDT, A. Méthode nouvelle de séparation des éléments figurés du sang, Revue d'Hématologie 11 : 426 -33, (1956)

2 WEISBERGER, A.S., HEINLE,R.W., STORAASLI, J.P., HANNAN, R. Transfusion of leucocytes labelled with radioactive phosphorus, J. Clin. Invest. 29 : 336, (1950)

3 WEISBERGER, A.S. et LEVINE, B. Incorporation of radioactive L-cystine by normal and leukemic leucocytes in vivo, Blood 9 : 1082, (1954)

4 JULLIARD, J., MAUPIN, B., CHARY, R., THEILLEUX, R., VAU, P , LOVERDO, A. Transfusion au lapin de leucocytes et de plaquettes du sang humain après marquage par le radio-phosphore, C.R. Soc Biol. 146 : 211, (1952)

5. McCALL, M.S., SUTHERLAND, D.A., EISENTRAUT, A.M., LANZ, H. The tagging of leukemic leucocytes with radioactive chromium and measurement of the in vivo cell survival, J. Lab. and Clin Med 45 : 717 -24, (1955)

6 MAUPIN, B., LOVERDO, A., CHARY, R., THEILLEUX, R., STORCK, J Marquage par le radiophosphore des leucocytes humains. Transfusion à l'homme et à l'animal. Résultats de trois années d'expérience, Revue de Path. Gen. et Comp. 666 : 450 - 61, (1955)

- - - - -