

EFFETS CEREBRAUX D'UNE COEXPOSITION CHIMIQUE ET RADIOLOGIQUE CHEZ LE RAT : INHALATION D'UN AEROSOL DE TUNGSTENE ET IRRADIATION A FAIBLE DOSE

T. Frécharde^{*1}, C. Brizais¹, V. Monceau¹, V. Ménard³, C. Gloaguen¹, F. Voyer², F. Bachelot¹, D. Klovov¹ et C. Ibanez¹

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRTOX, Fontenay-aux-Roses, France

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, GSEA, Fontenay-aux-Roses, France

³CEA/DRF/ IRCM/ Plateforme d'Irradiation, Fontenay-aux-Roses, France

*Courriel de l'orateur : theo.frecharde@irsn.fr

TITLE

Cerebral effects of a chemical and radiological co-exposure in rat: inhalation of a tungsten aerosol and low dose irradiation

RESUME

Notre projet porte sur les facteurs d'expositions professionnelles en lien avec les activités nucléaires. Dans ce contexte, les travailleurs peuvent être exposés à des polluants chimiques, en particulier sous forme d'aérosols particuliers, mais également des stressseurs radiologiques. Ainsi, des rats adultes ont été exposés à l'inhalation d'un aérosol polydispersé de particules de tungstène et/ou une irradiation gamma à faible dose. Notre objectif est de déterminer si des effets différentiels sont observés selon les schémas d'exposition sur des processus cibles impliqués dans la toxicité cérébrale. Ces processus comprennent, en particulier, l'intégrité neuronale et la neuroinflammation, analysées 24 heures et 28 jours après exposition dans le cortex frontal et le bulbe olfactif. Les résultats révèlent des différences significatives entre les groupes coexposés et contrôles pour plusieurs paramètres (densité cellulaire corticale et densité microgliale), mais pas entre les groupes exposés à un seul stressseur et les groupes contrôles. Ces résultats suggèrent une synergie entre nos deux stressseurs, hypothèse qui va faire l'objet d'études complémentaires. De plus, nous observons une pérennité de ces effets à 28 jours, ce qui implique de potentiels effets sur le long terme.

ABSTRACT

Our project focuses on occupational exposures linked to nuclear facilities. In this context, workers may be exposed to chemical pollutants, especially in the form of particulate aerosols, but also to radiological stressors. Thus, male adult rats were exposed to the inhalation of a polydisperse tungsten particle aerosol and/or a low dose gamma irradiation. Our goal is to determine if differential effects can be observed on target processes involved in cerebral toxicity depending on our exposure protocols. These processes include, in particular, neuronal integrity and neuroinflammation, analyzed at 24 hours and 28 days after exposure in the frontal cortex and olfactory bulb. Our results reveal significant differences between co-exposed and control groups for several parameters (cortical cellular density and microglial density), but not between single stressor and control groups. These results suggest a synergy between our two stressors. This hypothesis will be further studied. In addition, we also observe a persistence of our effects after 28 days, which could imply long-term effects.

MOTS-CLÉS : Coexposition, Inhalation, Irradiation, Cerveau / **KEYWORDS**: Co-exposure, Inhalation, Irradiation, Brain

1. INTRODUCTION

L'étude des facteurs de risques d'expositions professionnelles en lien avec les activités nucléaires fait partie des préoccupations majeures de notre Institut. Dans ce contexte, le personnel peut être exposé à des polluants de nature radiologique et chimique. La principale cause de contamination inhérente à ces activités est l'inhalation de polluants particuliers dont le cerveau est une cible directe. En effet, de nombreuses études mettent en avant l'existence d'un passage de contaminants particuliers directement vers le compartiment cérébral par l'intermédiaire des nerfs olfactifs, que l'on appelle « voie nez-cerveau » (Oberdorster, Sharp et al. 2004).

Différents scénarios d'expositions sont envisageables pour les travailleurs du nucléaire. L'un d'eux est l'inhalation de particules de tungstène. En effet, lors du fonctionnement normal de réacteurs à fusion, des boucliers en tungstène, appelés *divertors*, sont érodés par le flux du plasma entraînant la formation de particules. Ces particules pourraient être aérosolisées et être source d'exposition des travailleurs lors d'opération de démantèlement ou d'accidents entraînant une perte de vide.

Les travailleurs du nucléaire peuvent également être amenés à évoluer dans un environnement dosant, ajoutant ainsi une exposition de nature radiologique à celle d'origine chimique liée à l'inhalation de particules. Cette coexposition fait que notre projet intègre le concept d'exposome qui vise à prendre en compte l'ensemble

des substances et stress auquel un individu sera exposé de sa conception in utéro jusqu'à sa fin de vie (Wild 2005).

L'objectif de notre étude est de déterminer si une coexposition radiologique (rayons gamma faible dose) et chimique (aérosol de tungstène) cause des effets différentiels sur les paramètres de toxicité cérébrale *in vivo* chez le rat en comparaison à des expositions à un contaminant unique.

Notre projet s'inscrit à la suite d'un projet précédent étudiant l'effet de l'inhalation de particules de tungstène seules selon différents modes et concentrations nous permettant de cibler des paramètres de toxicité cérébrales précis (Macé 2021). L'hypothèse de la « voie nez-cerveau » nous permet également de focaliser notre attention sur les structures frontales du cerveau : le bulbe olfactif et le cortex frontal.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Modèle animal et habitude

Des rats mâles, adultes de souche Sprague-Dawley (souche RjHan:SD) ont été choisis pour cette étude. Les rats sont un modèle animal de référence pour l'inhalation *nose-only* qui a pour caractéristique de cibler les voies aériennes supérieures. Les inhalations mettant en œuvre des tubes à contention, tous les rats ont subi une habitude avec des passages en tube de durée croissante jusqu'à 60 minutes afin de limiter leur stress le jour de l'exposition. Dans une démarche de réduction des biais, tous les animaux ont fait des passages de durée équivalente dans les tubes à contention et les boîtes d'irradiation. L'accord du comité d'éthique local a été obtenu, référencé sous le numéro APAFIS #33361-2021100608276923 v1. Les expositions par irradiation se font au sein de la plateforme d'irradiation de l'IrCM au CEA, et couvertes par un projet autorisé (APAFIS#17091-201810121157684 v3).

2.2. Exposition chimique et radiologique

Les expositions par inhalation se font dans une chambre d'inhalation située dans une boîte à gant (BAG) disposant d'un générateur à brosse de type RBG1000 (PALAS®) qui génère notre aérosol polydispersé de particules de tungstène métal composé de 20% de particules d'intérêt (A20 (ALMT-Corp A20) et 80% de particules de gros diamètre W-25 (TEKNA W-25) (Macé, Ibanez et al. 2021).

La métrologie de notre aérosol a été précédemment caractérisée et nos concentrations cibles maîtrisées (Macé 2021). Au sein de la BAG, notre aérosol est monitoré par un TSI® Aerodynamic Particle Sizer (APS Model 3321) ainsi que par un prélèvement sur porte filtre gravimétrique disposant d'un filtre de nitrocellulose. Notre concentration d'exposition pour ce projet est de 80 mg.m⁻³ durant 30 minutes.

L'exposition radiologique se fait au sein d'un irradiateur Césium auto blindé GSRD 1® GSM qui permet d'irradier à 50mGy.min⁻¹ durant 1 minute en mode corps entier (irradiation gamma). Durant cette exposition, les animaux sont placés dans des boîtes d'irradiation.

Les rats sont répartis en 4 groupes d'exposition pour chaque temps post-exposition (24 heures (24H) et 28 jours (28J)) en suivant le schéma de la figure 1.

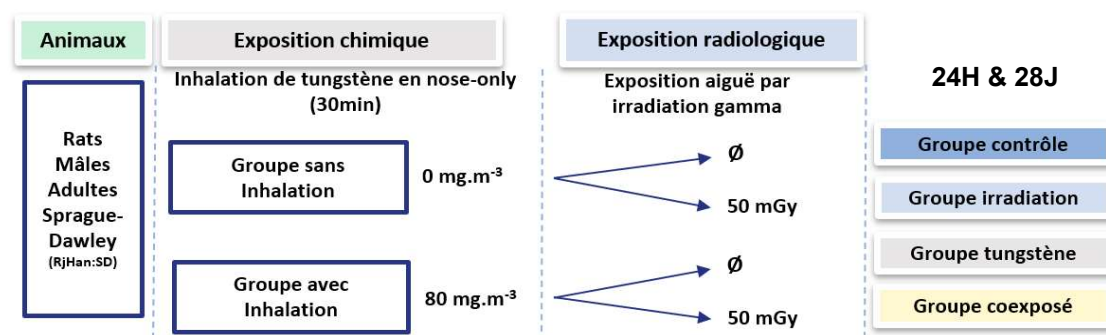


Figure 1 : Schéma de répartition des groupes d'animaux

2.3. Préparation des tissus et études histologiques

Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'une dose sub-léthale d'un mélange de kétamine/xylazine avec injection préalable de buprénorphine en sous-cutané 15 min avant, selon les préconisations internes (Flecknell 2015) à 24H et 28J. Les tissus sont fixés par perfusion intracardiaque de formaldéhyde 4%. Le cerveau, est prélevé post euthanasie et cryoprotégé une nuit dans une solution de sucrose 30% à 4°C puis inclus en OCT Compound (Sakura), par congélation à l'aide d'un FlashFREEZE (Microm Microtech). Des coupes de cerveaux de 14µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat.

Le protocole d'immunohistochimie est réalisé comme suit : les sites aspécifiques sont bloqués par une incubation avec du sérum 5% (45 minutes à température ambiante), puis incubation avec l'anticorps primaire (1/200 à 4°C toute la nuit) dirigé contre des marqueurs spécifiques avant d'incuber avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre l'anticorps primaire (1/200 à température ambiante pendant 2 heures). Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre : NeuN (marqueur de neurones matures, Millipore, MAB377), Iba1 (marqueur de la microglie, Abcam, ab5076), Casp3 (Forme clivée de la caspase 3, Millipore, AB3623). Les anticorps secondaires ont été commandés chez Jackson ImmunoResearch. Les coupes sont ensuite scannées à l'aide d'un NanoZoomer (Hamamatsu). Deux coupes de cerveau sont quantifiées pour chaque animal pour chaque marquage. Les quantifications sont toutes réalisées en aveugle.

2.4. Etudes statistiques

Nos résultats ont été analysés sur GraphPad Prism 8.2.4. Afin de traiter les 2 réplicas par animaux, nous avons réalisé une Nested One-Way Anova mettant en œuvre un Fisher LSD Test.

3. RESULTATS

3.1. Densité de cellules totales dans le cortex frontal

La densité des cellules totales a été étudiée à court et moyen terme, à 24H et 28J post-exposition respectivement. Le cortex frontal est composé de plusieurs couches abritant des populations cellulaires représentées en proportions différentes selon les couches (neurones, cellules gliales en particulier). La quantification du marquage DAPI (marqueur des noyaux cellulaires) dans la couche 2 de l'apex du cortex frontal a cependant révélé une augmentation significative du nombre de cellules chez les groupes coexposés par rapport aux groupes contrôle et tungstène à 24H et 28J (figure 2).

3.2. Densité de neurones totaux et « donut-like » dans le cortex frontal

A l'issu de ces analyses, nous avons décidé de déterminer les effets sur les neurones matures. Nous avons choisi d'étudier la densité de neurones totaux et un phénotype qualifié de « donut-like » (DL), souvent associé à une souffrance cellulaire (Dehghani, Karatas et al. 2018).

La figure 3 présente des microphotographies de neurones sains et de neurones DL. Les quantifications révèlent qu'il n'y a pas de modification de la densité neuronale totale dans l'apex du cortex frontal à 24H ou à 28J. Il y a cependant une modulation à 24H et 28J de la densité de neurones au phénotype DL. A 24H, on constate en effet une baisse statistiquement significative chez le groupe coexposé en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe tungstène seul. Tandis qu'à 28J, on observe un phénomène contraire, avec une augmentation de la proportion de phénotypes DL pour le groupe coexposé par rapport au contrôle. A 24H et 28J, il n'y a pas de différence significative des groupes exposés à un stresser seul (aérosol de tungstène ou irradiation) en comparaison à leur contrôle respectif.

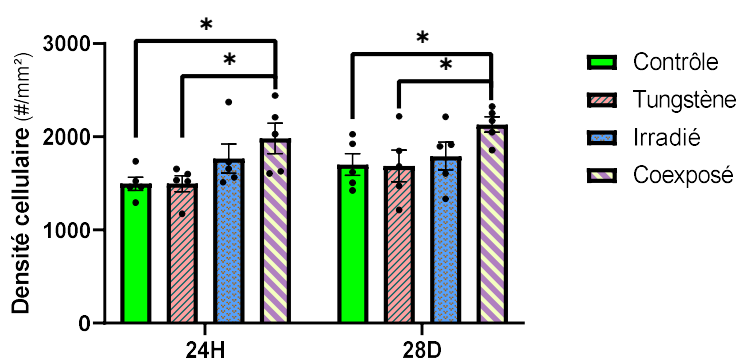


Figure 2 : Densité cellulaire totale dans l'apex du cortex frontal

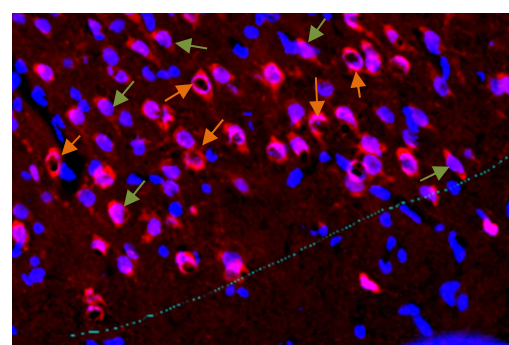


Figure 3 : Illustration de phénotypes neuronaux sains et « donut-like »

3.3. Analyse de la microglie dans le cortex frontal et le bulbe olfactif

Les cellules microgliales sont les acteurs principaux du processus de neuroinflammation locale dans le cerveau. Leur densité et leur morphologie peuvent être modifiées en réponse à un stresser. Ces deux paramètres ont été quantifiés.

Nous constatons, à 24H, une augmentation statistiquement significative de la densité microgliale, dont une photo d'illustration est visible en figure 4, dans la couche 2 du cortex frontal en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe irradié seul (figure 5). A 28J, on constate, en revanche, une diminution de ce même

paramètre pour le groupe coexposé en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe tungstène seul. A l'image de la quantification neuronale, à 24H et 28J, il n'y a pas de différence significative des groupes exposés à un stresser seul en comparaison à leur contrôle respectif. Dans le bulbe olfactif, compte tenu de la complexité anatomique de cette structure, une méthode de scoring de la densité et de la morphologie microgliale a été mise au point. Cette méthode révèle une augmentation à 24H pour le groupe tungstène seul par rapport au groupe contrôle et, à 28J, une augmentation des groupes coexposés et irradiés par rapport au groupe contrôle.

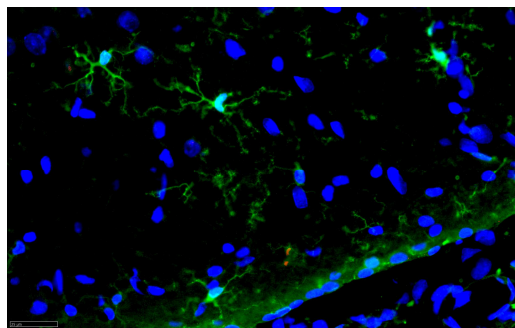


Figure 4 : Illustration de microglie (en vert) dans le cortex frontal

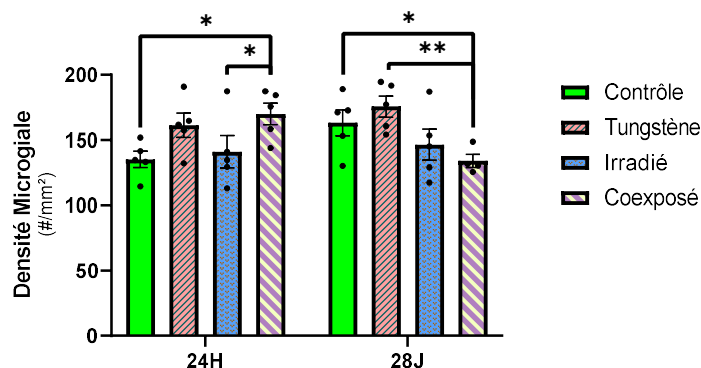


Figure 5 : Densité microgliale dans l'apex du cortex frontal

4. DISCUSSION

L'objectif de notre projet est de déterminer les effets cérébraux différentiels d'une coexposition radiologique et/ou chimique selon les schémas d'exposition. Mais nous avons aussi pour but d'étudier la potentielle persistance de ces effets à 28 jours, ce qui n'avait pas été réalisé auparavant, même pour le tungstène seul. Nos résultats actuels montrent de manière récurrente des différences significatives entre les groupes contrôles et coexposés, mais aussi entre les groupes coexposés et les groupes exposés à un seul des stressers. Cela suggère donc des effets additifs ou synergiques entre nos deux stressers. Cette hypothèse sera étudiée plus en détail dans la suite de ce projet.

L'observation d'une persistance des effets est renforcée par plusieurs résultats tel que le maintien de l'augmentation de la densité cellulaire totale dans la couche 2 de l'apex du cortex frontal entre 24H à 28J, les modulations à 24H et 28J de la densité de phénotypes DL, ainsi que l'augmentation à 28J de la densité et/ou de l'activation microgliale dans le cortex frontal et le bulbe olfactif.

Dans le futur, nous étudierons d'autres marqueurs histologiques permettant de quantifier des populations cellulaires précises (infiltration de cellules immunitaires périphériques en particulier) et de quantifier les dommages à l'ADN (marquage TUNEL). De plus, nous réaliserons des études de biologie moléculaire et de biochimie afin de suivre les expressions géniques et protéiques impliquées dans des processus inflammatoires, anti-oxydants et anti/pro-apoptotiques.

5. REMERCIEMENTS

Nous tenions à remercier Chloé Havet et Théo Teulade pour leurs contributions respectives et précieuses.

6. REFERENCES

- Dehghani, A., H. Karatas, et al. (2018). "Nuclear expansion and pore opening are instant signs of neuronal hypoxia and can identify poorly fixed brains." *Sci Rep* **8**(1): 14770.
- Flecknell, P. (2015). *Laboratory animal anaesthesia*, Academic press.
- Macé, L. (2021). Impact cérébral précoce de l'inhalation chez le rat, le tungstène comme contaminant émergent, université Paris-Saclay.
- Macé, L., C. Ibanez, et al. (2021). "Design of an Inhalation Chamber and Metrology Assessment to Study Tungsten Aerosol Neurotoxic Effects." *Aerosol and Air Quality Research* **21**(7): 200504.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, et al. (2004). "Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain." *Inhal Toxicol* **16**(6-7): 437-445.
- Wild, C. P. (2005). "Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(8): 1847-1850.