

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 ———
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 ———
 PARIS
 ———

①1 N° de publication : **2 636 645**
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **88 12100**

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 Q 1/02 // (C 12 Q 1/02, C 12 R 00:91).

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 16 septembre 1988.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
 demande : BOPI « Brevets » n° 12 du 23 mars 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
 rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE, Etablissement de Caractère Scientifique Technique et Industriel. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Daniel Nolibe ; Pierre-Noël Lirsac ; Henry Metivier.

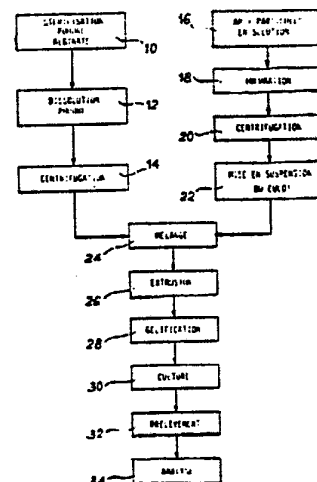
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Brevatome.

⑤4 Billes d'alginate contenant des cellules vivantes et leur procédé d'obtention.

⑤7 Le procédé consiste à préparer 10, 12, 14 une suspension d'alginate de sodium dans un milieu de culture appropriée à la culture de macrophages alvéolaires; à préparer 16, 18, 20, 22 une suspension de macrophages alvéolaires AM, ayant au préalable phagocyté des particules respirables, dans une solution contenant le milieu de culture et le sérum de veau fœtal; à mélanger 24 la suspension d'alginate et la suspension cellulaire; à extruder 26 le mélange pour former des gouttelettes; à gélifier 28 ces gouttelettes dans un milieu gélifiant contenant du milieu de culture, du sérum de veau fœtal et du chlorure de calcium puis à disperser les billes d'alginate obtenues dans un milieu de culture additionné de sérum de veau fœtal et de chlorure de calcium.

Les billes d'alginate obtenues sont utilisées pour étudier la dissolution de particules par les macrophages alvéolaires.



FR 2 636 645 - A1

D

**BILLES D'ALGINATE CONTENANT DES CELLULES VIVANTES ET
LEUR PROCÉDE D'OBTENTION**

DESCRIPTION

L'invention se rapporte à des billes d'alginate contenant une forte densité de cellules animales de mammifères vivantes et au procédé d'obtention de ces billes.

Plus spécialement, l'invention concerne des billes d'alginate contenant des cellules susceptibles de phagocyter des particules solides.

Elle permet en particulier d'étudier, in vitro, la dissolution de particules solides par des cellules animales phagocytaires telles que les macrophages alvéolaires ou péritonéaux ou les granulocytes, ou la production et l'analyse des produits excrétés par tout type de cellules animales telles que les leucocytes et plus spécialement les lymphocytes. Elle s'applique principalement dans le domaine médical.

Dans le suivi médical du personnel travaillant en milieu toxique empoussiéré ou corrosif, par exemple dans les usines et les mines (beryllium, silice, uranium par exemple), il est primordial de connaître la quantité de poussières toxiques inhalée par le personnel.

Lorsque la mesure directe est impossible, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance du devenir biologique du toxique et, en particulier, de son coefficient de dissolution au niveau pulmonaire.

Une analyse d'urine permet alors de déterminer la quantité de produits inhalés. Le coefficient de dissolution correspond à la fraction de particules solubilisée in vivo par unité de temps.

Les méthodes actuellement connues pour déterminer le coefficient de dissolution d'un produit donné par un macrophage donné, et de façon générale de tout système biologique cellulaire, présentent un certain

nombre d'inconvénients. Le meilleur moyen pour déterminer ce coefficient de dissolution est la méthode in vivo dans laquelle les excréments des animaux ayant inhalé des particules d'un produit donné sont récoltées. Cependant, cette méthode pose non seulement le problème du choix de l'animal modèle, mais nécessite aussi des études du métabolisme de cet animal longues et coûteuses demandant une collection et une séparation parfaites des excréments.

10 Aussi, pour simplifier ces études et obtenir rapidement des résultats, on utilise des méthodes d'analyse in vitro. Malheureusement, certaines méthodes d'analyses in vitro donnent, dans certains cas, une mauvaise image de ce qui se passe in vivo ; c'est en particulier le cas des méthodes décrites dans l'article de G.M. Kanapilly et al., Health Physics Pergamon Press 1973, vol. 24, pp. 497-507, "Measurement of in vitro dissolution of aerosol particles for comparison to in vivo dissolution in the lower respiratory tract after inhalation".

20 D'autres méthodes, comme celles décrites dans l'article de M. Lundborg et al., Experimental Lung Research 7 : 11-12 de 1984, pp. 11-22, "Ability of rabbit alveolar macrophages to dissolve metals" et dans l'article de S. André et al., Human Toxicol, 1987, 6, pp. 233-240, "Beryllium metal solubility in the lung, comparison of metal and hot-pressed forms by in vivo and in vitro dissolution bioassays", sont basées sur la culture de cellules ayant au préalable phagocytées des particules du produit à analyser.

30 Ces méthodes possèdent deux limitations majeures : la faible durée de vie des cellules dans le milieu de culture limitant la durée des tests sur ces cellules et la faible densité de cellules (quantité de cellules par unité de volume) utilisées lors des

35

analyses. Ces méthodes ne sont donc valables que pour des systèmes biologiques (cellules + produits à analyser) présentant une solubilité élevée et que pour des produits à analyser peu toxiques ; en effet, de façon générale
5 il est difficile d'augmenter la population des cellules dans le milieu de culture sans augmenter le volume de ce dernier et dans le cas de produits toxiques, d'augmenter la quantité de produits phagocytés par chaque cellule sans entraîner une toxicité létale pour ces cellules.

10 Le but de l'invention est donc de trouver un nouveau modèle de dissolution in vitro permettant de remédier à ces inconvénients et permettant en particulier de piéger ou immobiliser les cellules en vue d'en augmenter leur densité et leur durée de vie ; l'augmentation de la durée de vie des cellules permet d'augmenter la durée des tests sur ces cellules et donc d'affiner les résultats.

L'invention a donc pour objet des billes d'alginate renfermant des cellules animales vivantes choisies
20 parmi les macrophages et les leucocytes, dispersées dans un milieu de culture contenant : a) une solution nourricière, tamponnée à pH neutre, additionnée de L-glutamine et éventuellement d'antibiotiques, b) du sérum de veau foetal ou un équivalent fonctionnel et
25 c) au moins un halogénure de cation divalent. Ces cellules sont en particulier des macrophages alvéolaires ou péritonéaux.

L'alginate constituant les billes doit être compatible avec les cellules afin d'assurer leur survie
30 maximum et d'augmenter ainsi la durée des tests. Cet alginate peut être de l'alginate de calcium, de l'alginate de barium, de l'alginate de zinc, de l'alginate de fer (II), de l'alginate de magnésium, de l'alginate de manganèse, de l'alginate de cuivre (II) et de l'alginate de strontium (II), etc. De préférence, on utilise
35

de l'alginate de calcium, de l'alginate de barium ou leur mélange.

Ces billes d'alginate peuvent être conservées à basses températures, par exemple à 4°C, dans un milieu de culture approprié.

Un milieu de culture parfaitement bien adapté aux cellules animales et plus particulièrement aux cellules humaines est le milieu composé a) d'une solution "nourricière" de vitamines, d'acides aminés, de sels minéraux, de sels organiques, appelée milieu 199, tamponnée à pH neutre (6,5-7,5) et notamment 7,4 par de la N'-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-acide éthanesulfonique connue sous le nom d'Hépes, additionnée de 0 à 5 mmol/L de L-glutamine et éventuellement d'antibiotiques à large spectre tels que la kanamycine, la pénicilline, la gentamicine et la streptomycine ; b) de 0 à 20% par exemple 10% en volume de sérum de veau foetal (ou équivalent fonctionnel) ; et c) d'un ou plusieurs halogénures de cations divalents compatibles avec les cellules utilisées, soit par exemple de 3 à 20 mmol/L de chlorure de calcium.

Il est possible de remplacer le chlorure de calcium par du bromure ou du fluorure de calcium ou par tout chlorure, bromure ou fluorure des cations divalents donnés précédemment pour former l'alginate ou leurs mélanges.

La composition exacte du milieu 199 est bien connue de l'homme de l'art.

Bien entendu, d'autres milieux de culture tels que celui donné dans l'article de S. André, ci-dessus, peuvent être utilisés. En outre, le milieu 199 peut être remplacé par le milieu RPMI 1640 bien connu de l'homme de l'art.

Les billes de l'invention peuvent contenir jusqu'à 500 000 cellules chacune, ce qui correspond

à une densité 100 fois plus grande que celle de l'art
antérieur. Dans le cas de cellules macrophages, la déter-
mination de la quantité de produits de dissolution excré-
tés par les cellules se trouve alors facilitée, voire
5 même possible pour des systèmes biologiques à solubilité
faible ou à faible seuil de détection.

En particulier, il est possible, grâce à l'in-
vention, d'étudier la dissolution de particules spirales
d'oxyde de plutonium PuO_2 (oxyde très insoluble), par
10 des macrophages alvéolaires, ce qui était totalement
impossible jusqu'à ce jour.

L'invention a aussi pour objet un procédé d'ob-
tention des billes d'alginate définies précédemment.

Selon une caractéristique principale, ce procédé
15 consiste à :

(a) préparer une suspension d'un alginate d'un
cation monovalent dans un milieu de culture contenant
une solution nourricière tamponnée à pH neutre, addition-
née de L-glutamine,

20 (b) préparer une suspension des cellules dans
une solution contenant le milieu de culture et du sérum
de veau foetal ou équivalent fonctionnel,

(c) mélanger la suspension d'alginate et la
suspension cellulaire,

25 (d) extruder le mélange pour former des goutte-
lettes dudit mélange,

(e) gélifier les gouttelettes dans un milieu
gélifiant contenant le milieu de culture, du sérum de
veau foetal ou équivalent fonctionnel et au moins un
30 halogénure dont le cation divalent est susceptible de
former un alginate afin de former lesdites billes, et

(f) disperser les billes dans ledit milieu
de culture additionné de sérum de veau foetal ou équiva-
lent fonctionnel et d'au moins un halogénure de cation
35 divalent.

Avantageusement, l'étape (a) consiste à :

- stériliser de l'alginate d'un cation monovalent pulvérulent,
- dissoudre l'alginate stérilisé dans le milieu de culture pour former une suspension, et
- centrifuger cette suspension pour en éliminer les bulles d'air.

La stérilisation peut consister en une irradiation gamma ou en une irradiation ultraviolette ou en une irradiation gamma suivie d'une irradiation ultraviolette.

L'alginate utilisé dans cette étape (a) est de l'alginate de sodium ou de l'alginate de potassium.

L'invention a aussi pour objet un procédé de mesure in vitro de la dissolution de particules solides par des cellules vivantes piégées ou immobilisées dans des billes d'alginate. A cet effet, l'étape (b) ci-dessus, consiste à :

- préparer une suspension de particules et de cellules dans une solution contenant le milieu de culture,
- laisser incuber la suspension, sous agitation, à température ambiante,
- centrifuger la suspension incubée, et
- suspendre le culot issu de la centrifugation dans une solution contenant ledit milieu de culture et du sérum de veau foetal ou équivalent fonctionnel.

Le procédé de dissolution in vitro de particules solides par des cellules vivantes, conformément à l'invention, est extrêmement simple à mettre en oeuvre, à l'inverse des procédés de l'invention.

Les particules à étudier peuvent avoir une forme sphérique de diamètre inférieur à 10 μm ou une forme fibreuse dont la longueur est inférieure à 15 μm ; ces dimensions de sphères ou de fibres

correspondent à la taille de la fraction communément appelée respirable. Ces particules peuvent être, par exemple, des particules de béryllium, de silice, d'oxyde d'uranium, d'oxyde de plutonium, d'oxyde de cobalt, d'amiante, des fibres de verre, des fibres de roche et de toute autre nature.

L'invention a aussi pour objet un procédé de production et d'analyse des produits excrétés par des cellules immobilisées telles que les leucocytes et plus spécialement les lymphocytes.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront mieux de la description qui va suivre, donnée à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés, dans lesquels ;

- la figure 1 indique, schématiquement, les différentes étapes de l'obtention de billes d'alginate selon l'invention,

- la figure 2 donne la courbe de dissolution journalière de particules de $^{57}\text{Co}_3\text{O}_4$ par des macrophages alvéolaires de babouins immobilisés selon l'invention.

La description qui va suivre en référence à la figure 1 se rapporte à la fabrication de billes d'alginate de calcium renfermant des macrophages alvéolaires ayant phagocyté des particules solides bien que l'invention ait un domaine d'application beaucoup plus large, comme on l'a vu précédemment. L'ensemble du procédé peut s'appeler immobilisation.

Les premières étapes du procédé selon l'invention consistent tout d'abord à préparer une suspension d'un alginate. A cet effet, de la poudre d'alginate de sodium et de préférence de l'alginate de sodium type IV, de haute viscosité, provenant de *Macrocystis Pyrifera*, référencé A 7128 et vendu par Sigma, est stérilisée par irradiation gamma à une dose de 5000 Gy suivie

au moment de l'emploi d'une exposition aux ultraviolets pendant 30 minutes à une longueur d'onde de 250 nm et une densité de puissance de 0,083 mW/cm² à 1 mètre. Cette étape de stérilisation porte la référence 10 sur la figure 1.

La poudre d'alginate stérilisée est alors dissoute, comme indiqué par le bloc 12 dans un milieu de culture approprié à la culture des macrophages alvéolaires, notés AM. Cette dissolution est réalisée sous agitation magnétique.

Dans toute la suite du texte, il faudra comprendre par milieu de culture approprié la solution qui contient du milieu 199 de chez Gibco tamponé à pH 7,4 par de l'Hépes 25 mmol/L auquel on a ajouté de la L-glutamine 2 mmol/L et éventuellement des antibiotiques telle que la kanamycine à 75 mg/l environ, de la pénicilline à 12 500 U/l environ et de la streptomycine à 12,5 mg/l environ. La concentration finale de l'alginate de sodium est de 2%. La composition exacte du milieu 199 est donnée dans le document Gibco BRL Life Technologies -catalogue de produits pour biologie cellulaire et les procédés industriels- 1988, page 39 avec la référence 079-00011.

La suspension d'alginate obtenue est alors centrifugée, comme l'indique le bloc 14, afin d'éliminer les bulles d'air de la suspension. Cette centrifugation est réalisée à température ambiante et à 400 g pendant 15 minutes.

Parallèlement à la préparation de la suspension de l'alginate de sodium, on prépare une suspension de macrophages alvéolaires (AM) ayant phagocyté des particules, comme indiqué par le bloc 16.

Les macrophages alvéolaires proviennent en particulier de babouins du type Papio Papio. L'extraction des macrophages est effectuée par des lavages

broncho-alvéolaires en utilisant des sondes à double voie du type Carlen.

Le liquide de lavage est alors centrifugé à 300 g pendant 10 minutes à température ambiante et le culot contenant les cellules est alors lavé deux fois et re-suspendu dans une solution appropriée à la culture des macrophages, formée dudit milieu de culture, avec une densité de 3.10^6 à 40.10^6 cellules/ml.

A la suspension obtenue, on ajoute des particules dispersées au préalable par ultrasons.

La suspension de cellules et de particules ainsi obtenue est alors incubée pendant 1 heure, à température ambiante (supérieure à 20°C) tout en étant agitée doucement à l'aide d'un agitateur oscillant à 60 oscillations/minute afin d'éviter l'adhérence des cellules sur les parois de l'incubateur. Cette étape d'incubation porte la référence 18 sur la figure 1. Cette étape d'incubation permet la phagocytose des particules d'oxyde de cobalt par les macrophages alvéolaires.

La suspension obtenue est alors centrifugée, comme indiqué en 20 sur la figure 1, à 300 g pendant 10 minutes. Le surnageant résultant de la centrifugation est éliminé alors que le culot est re-suspendu dans du milieu de culture frais auquel on a ajouté 10% de sérum de veau foetal. Cette étape de mise en suspension porte la référence 22.

L'étape suivante du procédé consiste à mélanger la suspension cellulaire obtenue en 22 ayant phagocyté les particules solides, à la suspension d'alginate de sodium obtenue en 14, dans un rapport de 1 à 3 en volume pour obtenir une concentration finale d'alginate de sodium de 1,5%. Cette étape de mélange porte la référence 24 sur la figure 1.

Ce mélange est alors doucement homogénéisé par agitation magnétique.

A l'aide d'une pompe péristaltique, pompe Gilson par exemple, le mélange homogénéisé est alors extrudé à travers une succession de cathéters en polyéthylène de 1 cm de long et de diamètre interne respectivement
5 1,67/1,40/0,86/0,58 mm. Le cathéter le plus fin possède également un diamètre externe de 0,96 mm. Cette étape d'extrusion porte la référence 26 sur la figure 1.

Les gouttelettes formées à l'extrémité du cathéter le plus petit tombent avec une hauteur de chute
10 maximum de 8 cm, dans le milieu gélifiant composé du milieu de culture auquel on a ajouté 10% en volume de sérum de veau foetal et du chlorure de calcium à une concentration de 10 mM. La vitesse de rotation de la pompe est ajustée de façon à obtenir entre 15 et 30
15 gouttes/minute. On obtient ainsi des billes d'alginate approximativement sphériques de 2,56 mm de diamètre avec un écart type de 0,2, de 8,80 mm³ de volume avec un écart type de 0,42 et jusqu'à 500 000 macrophages par bille.

20 Le nombre de cellules par bille est calculé à partir du titre en cellules de la suspension cellulaire initiale.

Le diamètre des billes ainsi que leur volume dépend directement du nombre de macrophages par bille,
25 de la vitesse de la pompe péristaltique et des diamètres interne et externe du cathéter d'extrusion le plus fin. Ces derniers peuvent donc être adaptés pour chaque système biologique.

La gélification en masse des billes peut être
30 obtenue dans une gamme de températures compatible avec la survie des cellules mais la meilleure efficacité est obtenue après 3 heures entre 20°C et 38°C, et en particulier à 37°C, puis elles sont lavées une fois dans du milieu de culture additionné de 10% en volume
35 de sérum de veau foetal et de 8 mmol/l de chlorure de

calcium avant mise en culture pour la conservation des billes.

5 Sur la figure 1, l'étape de gélification est représentée par le bloc 28 alors que l'étape de mise en culture est représentée par le bloc 30.

10 La conservation est réalisée à 37°C dans des puits ou des flacons de culture contenant chacun un nombre de billes correspondant de 1 à $2 \cdot 10^6$ macrophages alvéolaires environ. Chaque puits contient 10 ml de milieu de culture frais additionné de 10% en volume de sérum de veau foetal et de chlorure de calcium 8 mmol/l. Ce milieu est renouvelé régulièrement toutes les 24 ou 48 heures en fonction du nombre de cellules présentes.

15 Afin de déterminer le coefficient de dissolution des particules par les macrophages alvéolaires, des prélèvements du milieu de culture, symbolisés par le bloc 32, sont effectués toutes les 24 heures. Ces prélèvements sont filtrés à travers un filtre dont la porosité est adaptée à la taille des particules, lavés
20 avec 1 ml de milieu de culture frais puis re-suspendus dans un milieu approprié à l'analyse. L'analyse, symbolisée par le bloc 34 dépendra de la nature des particules étudiées.

25 Afin d'étudier la viabilité et l'intégrité des fonctions cellulaires des macrophages alvéolaires après leur immobilisation, une observation au microscope de coupes de billes d'alginate a permis de constater l'intégrité des macrophages alvéolaires. De plus, les
30 inventeurs ont dissous, à température ambiante, les billes d'alginate dans 50 ml de milieu de culture frais à pH 7,3, additionné d'un complexant du cation divalent à une concentration suffisante pour assurer sa complexation sans toutefois détruire les macrophages. A ce titre,
35 l'EDTA (éthylènediaminetétracétique), à une concentration finale comprise entre 5 et 15 mmol/l, est le meilleur

complexant du calcium respectant l'intégrité cellulaire.

Après 20 minutes d'agitation avec un agitateur oscillant, par exemple à 80 oscillations/minute, la suspension obtenue est centrifugée 10 minutes à 300 g ;
5 le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans le même milieu de culture. Après 3 incubations successives, le culot est re-suspendu dans du milieu de culture additionné du sérum de veau foetal à 10%
10 en volume puis lavé deux fois par centrifugation.

Une dissolution des billes d'alginate juste après leur formation ne permet de récupérer que $87 \pm 3\%$ de macrophages alvéolaires, c'est-à-dire que 13% de macrophages sont perdus. Cette perte intervient pendant les processus d'immobilisation et de dissolution
15 selon l'invention. En conséquence, les calculs de viabilité des macrophages alvéolaires après immobilisation ont été effectués en tenant compte du fait que la proportion maximale de cellules récupérable est de 87%.

20 L'intégrité des fonctions cellulaires des macrophages alvéolaires libérées des billes, appelés ci-après AMRB, a été déterminée selon deux critères :

- Le premier critère représente le pourcentage de cellules récupérées après dissolution des billes
25 et est donnée par le rapport $100 \times (\text{nombre de cellules récupérées} / \text{nombre maximal de cellules récupérables})$,

- Le deuxième critère est l'aptitude à adhérer à des AMRB, après trois heures de culture. Le pourcentage des cellules adhérentes est donné par la formule
30 $100 \times \% \text{ de AMRB adhérents} / \% \text{ de AM adhérents avant immobilisation}$.

Les résultats obtenus pour ces deux critères sont donnés dans le tableau ci-après, pour respectivement 5, 12 et 16 jours d'immobilisation. Ces tests
35 ont été effectués sur des macrophages alvéolaires de

babouins ayant au préalable phagocyté des particules de $^{57}\text{Co}_3\text{O}_4$ de $2,5\mu$.

De ce tableau, il ressort clairement que la viabilité des macrophages alvéolaires n'est que très peu affectée par l'immobilisation puisqu'une baisse de 5% seulement dans la récupération des cellules et qu'une baisse de 10% seulement dans l'adhérence des cellules aux flacons de culture ont été observées.

TABLEAU

	Nombre de jours d'immobilisation		
	5	12	16
Récupération (%)	95	83	75
Adhérence (%)	90	90	77

L'adhérence des macrophages alvéolaires libérés des billes d'alginate a été déterminée à partir de macrophages transférés dans des flacons de culture et incubés pendant 3 heures à 37°C en présence de 5% en volume de CO_2 . Le surnageant a été éliminé et les cellules non adhérentes ont été comptées. Les cellules mortes ont été comptées en centrifugeant le surnageant pendant 10 minutes à 300 g et en mesurant l'activité du lactate déshydrogénase.

Exemple 1

Comme décrit précédemment, on a étudié la dissolution de particules de $^{57}\text{Co}_3\text{O}_4$ de $2,7\mu\text{m}$ de diamètre provenant de l'Institut für Strahlenschutz, GSF Neuherberg (RFA). Ces particules d'oxyde de cobalt sont dispersées par ultrasons dans une suspension de

macrophages alvéolaires de babouins dans le milieu de culture ci-dessus. Le rapport particules/macrophage est de 1 à 3 particules par cellule. Les prélèvements du milieu de culture en vue de cette étude sont filtrés
5 avec un filtre de $0,45 \mu\text{m}$.

La dissolution sur une période de 17 jours est mesurée par comptage gamma du ^{57}Co . Ce comptage gamma permet de déterminer l'activité du ^{57}Co et donc la quantité d'oxyde de cobalt solubilisée par les macrophages
10 alvéolaires. Cette dissolution a permis de tracer la courbe de dissolution D journalière des particules de $^{57}\text{Co}_3\text{O}_4$ par les macrophages alvéolaires de babouins, représentée sur la figure 2. Cette courbe représente les variations du pourcentage de dissolution des
15 particules d'oxyde de cobalt en fonction du temps d'immobilisation des macrophages.

De cette courbe, il ressort que le pourcentage de dissolution des particules décroît rapidement dans les premiers jours de l'immobilisation puis reste
20 constant à $0,242 \pm 0,016$ pendant les jours suivants. La période de la courbe de dissolution est de 286 jours.

Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus in vivo avec les mêmes particules.

A titre comparatif, on a immobilisé selon l'in-
25 vention, des particules de $^{57}\text{Co}_3\text{O}_4$ seules de $2,5 \mu\text{m}$ de diamètre ; la dissolution moyenne par jour était de $0,072 \pm 0,070$ et la période de dissolution de 963 j. Ceci montre clairement que la dissolution des particules est due aux macrophages et non au gel d'alginate ou
30 au milieu nourricier.

Exemple 2

Dans les mêmes conditions que décrites précédemment, on a étudié la dissolution des particules de $^{239}\text{PuO}_2$ par des macrophages alvéolaires de babouins
35 à l'exception du fait que le milieu de culture 199 a été remplacé par du milieu RPMI 1640 dont la composi-

tion est donnée dans le document Gibco ci-dessus, page 51 avec la référence 074-01800 et que la concentration en chlorure de calcium dans le milieu de culture contenant les cellules immobilisées est de 15 mmol/L au lieu
5 de 8 mmol/L. Le pourcentage de dissolution total par jour a été déterminé pour des particules d'oxyde de plutonium de $0,61\ \mu\text{m}$ de diamètre et est égal à $3,40 \pm 0,92 \cdot 10^{-5}$. Ce taux de dissolution reste relativement constant. La période de dissolution est
10 de 20400 jours.

Les particules d'oxyde de plutonium à phagocyter étaient préparées par calcination du peroxyde de plutonium à 1000°C suivie d'un broyage puis d'un recuit à 1000°C pour obtenir un oxyde stoechiométrique
15 PuO_2 .

En outre, la dissolution de ces particules par les macrophages alvéolaires immobilisés selon l'invention est 20 fois plus grande que celle obtenue classiquement. Ce point est d'un intérêt considérable pour
20 l'analyse de données humaines dans le cas d'inhalations accidentelles de PuO_2 .

A titre comparatif, on a immobilisé selon l'invention des particules $^{239}\text{PuO}_2$ seules de $0,61\ \mu\text{m}$ de diamètre ; la dissolution moyenne par jour était
25 de $0,22 \pm 0,083 \cdot 10^{-5}$ et la période de dissolution de 311000 jours.

Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par inhalation des mêmes particules in vivo par des babouins du type Papio Papio.

30 Les billes d'alginate de calcium de l'invention peuvent aussi être utilisées pour la production et l'analyse des produits excrétés par des cellules animales vivantes, autres que des macrophages, telles que des leucocytes et, plus précisément, les lymphocytes afin
35 d'étudier le système immunologique des êtres humains.

REVENDICATIONS

1. Billes d'alginate d'un cation divalent renfermant des cellules animales vivantes choisies parmi les macrophages et les leucocytes dispersées dans un milieu de culture contenant (a) une solution nourricière tamponnée à pH neutre, additionnée de L-glutamine et, éventuellement, d'antibiotiques, (b) du sérum de veau foetal ou un équivalent fonctionnel et (c) au moins un halogénure de cation divalent.

2. Billes d'alginate selon la revendication 1, caractérisées en ce que les cellules sont des macrophages alvéolaires ou péritonéaux ou des lymphocytes.

3. Billes d'alginate selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que l'alginate est l'alginate de calcium.

4. Billes d'alginate selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles contiennent chacune jusqu'à 500 000 cellules.

5. Billes d'alginate selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que l'halogénure est le chlorure de calcium.

6. Billes d'alginate selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que la solution nourricière est choisie parmi le milieu 199 et le milieu RPMI 1640 tamponné à l'Hépes.

7. Procédé d'obtention de billes d'alginate renfermant des cellules animales vivantes choisies parmi les macrophages et les leucocytes, consistant à :

(a) préparer (10, 12, 14) une suspension d'un alginate d'un cation monovalent dans un milieu de culture contenant une solution nourricière tamponnée à pH neutre, additionnée de L-glutamine,

(b) préparer (16, 18, 20, 22) une suspension des cellules dans une solution contenant ledit milieu

de culture et du sérum de veau foetal ou équivalent fonctionnel,

(c) mélanger (24) la suspension d'alginate et la suspension cellulaire,

5 (d) extruder (26) le mélange pour former des gouttelettes dudit mélange,

(e) gélifier (28) les gouttelettes dans un milieu gélifiant contenant ledit milieu de culture, du sérum de veau foetal ou un équivalent fonctionnel
10 et au moins un halogénure dont le cation divalent est susceptible de former un alginate afin de former les-dites billes, et

(f) disperser les billes dans ledit milieu de culture additionné de sérum de veau foetal ou équivalent fonctionnel et d'au moins un halogénure de cation divalent.
15

8. Procédé d'obtention selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit milieu de culture contient des antibiotiques.

20 9. Procédé d'obtention selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'alginate de l'étape (a) est de l'alginate de sodium.

10. Procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que
25 l'halogénure est le chlorure de calcium.

11. Procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à :

- stériliser (10) de l'alginate d'un cation monovalent pulvérulent,
30

- dissoudre (12) l'alginate stérilisé dans le milieu de culture pour former une suspension, et

- centrifuger (14) cette suspension pour en éliminer les bulles d'air.

35 12. Procédé d'obtention selon la revendica-

tion 11, caractérisé en ce que l'alginate est stérilisé par une irradiation gamma suivie d'une exposition aux ultra-violets.

5 13. Procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que la gélification est réalisée entre 20 et 38°C.

10 14. Procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, appliqué à la mesure in vitro de la dissolution de particules par des cellules vivantes, caractérisé en ce que l'étape (b) consiste à :

- préparer (16) une suspension de particules et de cellules dans une solution contenant le milieu de culture,
 - 15 - laisser incuber la suspension (18), sous agitation, à température ambiante,
 - centrifuger (20) la suspension incubée, et
 - suspendre (22) le culot issu de la centrifugation dans une solution contenant ledit milieu de culture et du sérum de veau foetal ou équivalent fonctionnel.
- 20

15. Procédé d'obtention selon la revendication 14, caractérisé en ce que les particules constituent la fraction respirable.

25 16. Procédé d'obtention selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que les cellules vivantes sont des macrophages alvéolaires ou péritonéaux.

30 17. Procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 7 à 15, appliqué à la production et à l'analyse des produits excrétés par lesdites cellules.

18. Procédé d'obtention selon la revendication 17, caractérisé en ce que les cellules sont des lymphocytes.

1/2

FIG. 1

