



HAL
open science

Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)

Sabrina Barillet

► **To cite this version:**

Sabrina Barillet. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Metz, 2007. Français. NNT : 2007METZ012S . tel-00274850

HAL Id: tel-00274850

<https://theses.hal.science/tel-00274850>

Submitted on 21 Apr 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Ecole doctorale
RP2E Sciences et Ingénierie
des Ressources, Procédés,
Produits, Environnement



Université Paul Verlaine de Metz

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Ecole doctorale 410 : Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Thèse de doctorat

présentée par

Sabrina BARILLET

en vue de l'obtention du diplôme de doctorat de l'université Paul Verlaine de Metz

Spécialité : Toxicologie environnementale

TOXICOCINETIQUE, TOXICITE CHIMIQUE ET RADIOLOGIQUE DE L'URANIUM CHEZ LE POISSON ZEBRE (*Danio rerio*)

Thèse réalisée sous la direction d'Alain DEVAUX, Ingénieur de recherche INRA,
détaché au Laboratoire des Sciences de l'Environnement (ENTPE de Vaulx en Velin)

Thèse soutenue le 08 juin 2007 devant un jury composé de:

Pr. Claude CASELLAS	Professeur à l'université de Montpellier I	Rapporteur
Dr. Sylvie SAUVAIGO	Directeur de recherche au CEA de Grenoble	Rapporteur
Pr. Paule VASSEUR	Professeur à l'université Paul Verlaine de Metz	Examinateur
Dr. Jean-Marc PORCHER	Chercheur INERIS	Examinateur
Dr. Alain DEVAUX	Ingénieur de recherche INRA	Directeur de thèse
Dr. Christelle ADAM	Chercheur IRSN	Tuteur de thèse

*A la mémoire des 4327 poissons morts pour la science
(ou pour toute autre cause indépendante de ma volonté...)*

“La théorie, c’est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne.

La pratique c’est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pourquoi.

En science on allie la théorie à la pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi.”

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Les premières personnes concernées par la lecture du présent manuscrit sont celles par lesquelles j'aimerais débiter ces remerciements. Je tiens ainsi à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux personnes ayant accepté de faire partie du jury d'évaluation de cette thèse : Mme Sylvie Sauvaigo (directeur de recherche au CEA de Grenoble), Mme Claude Casellas (professeur en environnement-santé à l'université de Montpellier), Melle Paule Vasseur (professeur de toxicologie à l'université Paul Verlaine de Metz), et M. Jean-Marc Porcher (directeur de l'Unité d'Evaluation des Risques Ecotoxicologiques de l'INERIS de Verneuil-en-Halatte). Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir accepté cette tâche difficile (dont vous comprendrez très rapidement l'ampleur au vu de mon style rédactionnel). J'espère que vous serez aussi intéressés à lire ce document que je l'ai été à l'écrire.

De nombreuses personnes ont concouru au fait que vous soyez aujourd'hui prêt à lire ce mémoire de thèse. Je tiens donc à remercier l'ensemble de ces personnes sans qui rien n'aurait été possible.

En premier lieu, je tiens à remercier la personne à l'origine de la formulation du projet de thèse mais aussi de mon recrutement : Jacqueline Garnier Laplace, directrice du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie de l'IRSN. Je tiens à la remercier pour l'intérêt qu'elle a su porter à l'avancement de mes travaux et pour son implication lors des moments importants qui auront jalonné ces 3 années.

Deux personnes ont ensuite pris son relai et m'ont accompagnée lors de mes premiers pas de chercheur. Je tiens ainsi à remercier très sincèrement Alain Devaux qui aura tenu successivement les rôles de directeur de stage de recherche lors de mon DEA et de directeur de thèse. Malgré l'éloignement lors de ce second mandat, "vous" avez su gérer aussi bien les problèmes expérimentaux et rédactionnels que les psychothérapies par téléphone et ce, avec toute l'exaltation que l'on "vous" connaît. A "vous" que je n'aurais jamais réussi à tutoyer malgré les années et les brimades... merci. A mes côtés, Christelle Adam a quant à elle su me guider vers l'autonomie tout en restant suffisamment présente pour me préserver de nombreux faux pas. Merci pour ton enthousiasme, ta chaleur humaine... et pour les sachets de thés.

Au démarrage de ce travail, de nombreuses questions se sont très vite vues posées, et notamment... des questions techniques. Ainsi, de nombreuses techniques analytiques étaient inconnues au bataillon de mon arsenal scientifique. Des collaborations ont donc été mises en place avec d'autres laboratoires auxquels je tiens à exprimer toute ma gratitude :

⇒ à toute l'équipe de l'Unité d'Evaluation des Risques Ecotoxicologiques de l'INERIS pour leur accueil et plus particulièrement à Olivier Palluel, sans qui je n'aurais pas eu à écrire une seule ligne sur le stress oxydant (ce qui, soit dit en passant, aurait sans doute évité quelques séances de stretching cérébral aux téméraires envisageant de lire cette thèse). Merci pour m'avoir dévoilé le secret de tes techniques et pour avoir assuré un SAV à distance tout au long de mon travail.

⇒ à François Guiguen de l'UMR 754 (INRA-ENVL) "Rétrovirus et pathologie comparée" pour sa curiosité scientifique, son enthousiasme, son intérêt pour mon travail ainsi que pour le temps et l'énergie investis lors des moments passés autour du cytomètre.

De nombreuses personnes de mon laboratoire d'accueil sont également intervenues, rendant ainsi possible l'analyse des milliers d'échantillons générés lors de cette thèse. Je tiens ainsi à adresser un grand merci à Magali Floriani (qui règne en maître sur le monde de l'infiniment petit), Brigitte Ksas (la surdouée de la pipette), Virginie Camilleri (la seule capable de dompter l'ICP-AES au doigt et à l'œil) et Ludivine (sa disciple jedi), Daniel Orjollet (pour qui les anions en solution n'ont pas de secret), Marcel Morello (la force tranquille de la métrologie dans le domaine de l'alphabet grec... α , β , γ and Co.).

En plus d'un soutien analytique, différentes "paires de bras" ont également été nécessaires, notamment lors des sessions de dissection. Je tiens donc à remercier Christelle mais aussi Astrid Buet, Florence Zeman et Valérie Larno pour m'avoir successivement apporté leur aide lors des différentes expérimentations. La fraîcheur qu'elles ont insufflée à ces travaux aura sans nul doute largement contribué au maintien de ma motivation dans des périodes où la survenue du moindre problème pratique a pu me rendre quelque peu difficile à vivre...

Une fois les expérimentations menées, les analyses effectuées et les résultats compilés... Il a encore fallu passer le tout à la moulinette pour en faire sortir la substantifique moelle. Pour cela, tout un arsenal de tests statistiques et autres analyses factorielles a été déployé afin d'estimer si les mois de travail nécessaires à générer les jeux de données ont été fructueux. C'est donc au

moment de ce “jugement dernier” que Claire Della-Vedova est intervenue, prête à réduire des centaines d’heures de dissections, de préparations d’échantillons, de réalisation d’analyses, de traitement des données... à quelques mots dévastateurs : “Et tu n’as que 10 réplicats par condition ? Parce qu’avec des écarts-types pareils... ça risque d’être dur de faire tourner des tests très puissants”. Mais ce serait sans compter ses armes secrètes (transfo Box-Cox et autres couteaux suisses de matheux) qui, malgré les désillusions des débuts, ont permis de mettre en évidence quelques résultats intéressants, rendant un peu moins vains les mois de travail préalables...

Il me semble également important de mentionner mes “sponsors” dans ces remerciements, à savoir les diverses personnes et/ou entreprises qui m’auront permis de mener à bien cette thèse :

⇒ Claudine qui m’a permis de contenir mes troubles obsessionnels compulsifs (en me fournissant tous ces jolis classeurs et autres pochettes plastifiées de couleurs) et pour l’affection qu’elle porte à chacun de nous ;

⇒ Michèle Paquet ainsi que tous les chercheurs qui ont répondu à mes sollicitations par mail pour avoir notablement contribué à l’accumulation des centaines d’articles scientifiques nécessaires à l’établissement d’une base bibliographique solide ;

⇒ M. Bruno Romano de la société HB Développement en qui j’ai trouvé un fournisseur de *Danio* très compétent et soucieux de répondre au mieux aux différentes contraintes imposées par mes protocoles expérimentaux ;

⇒ M. Morel dont la société Sud Matières Plastiques a assuré la réalisation des divers éléments de mes systèmes d’exposition ;

⇒ Ainsi que la SNCF et plus particulièrement l’ensemble du personnel navigant à bord des TGV Marseille-Paris chaque vendredi soir à 18h14 et Paris-Marseille chaque dimanche soir à 19h20.

Avant d’arriver à l’issue de ce quart d’heure de gloire à la Andy Warhol autour de “ma vie, mon œuvre”, je tiens également à remercier des personnes qui ne sont pas intervenues de manière directe dans cette thèse mais sans lesquelles ma vie n’aurait pas été la même. Par ordre d’apparition dans ma vie je souhaite ainsi remercier : Grégory, Milie et Arnaud, Stéphane, les Chevaliers de la Girafe and Co. (David, Marie, Jeannot-Jean-Jeff, Julien, Virginie, Héroïse, Fran-Fran, Vincent, Julien, Céline, etc.), Audrey, Achtrmid, Elodie, Magali, Valérie, Maeva ainsi que la

nouvelle génération angevine : Florent, Antoine, Roxanne et Cloclo. A cette liste, j'aimerais également ajouter Damien que je remercie pour les 5 années qui se sont déjà écoulées et pour les dizaines d'autres qui suivront.

Pour finir sur une pointe de légèreté (et surtout avant d'entamer les choses sérieuses), il me semble difficile de ne pas remercier Thomas Edison, Alexander Graham Bell, Galileo Galilei, Louis Pasteur, Benjamin Franklin... de même que, bien évidemment, Henri Becquerel ainsi que Pierre et Marie Curie qui nous ont légué, par leurs découvertes, les bases scientifiques sans lesquelles la Science ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Et puis, à titre personnel, je souhaiterais ajouter à la liste des personnes précédemment évoquées deux personnes sans qui rien n'aurait également été possible : mes parents. Je les remercie d'être devenue ce que je suis, avec mes qualités et mes défauts, mon caractère lunatique et mon humour qui donne du fil à retordre à certains.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Ce travail a donné lieu à plusieurs communications scientifiques.

Publications scientifiques

Barillet S., Buet A., Adam C. et al., 2005, Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results, Radioprotection, 40 (Supplément 1): S175 - S181.

Barillet S., Adam C., Palluel O. et al., 2007, Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium, Environmental Toxicology and Chemistry, 26 (3): 497-505.

Adam C., Larno V., Giraudo M. et al., 2007, Génotoxicité des radionucléides chez les organismes aquatiques - Etat de l'art et résultats préliminaires, ARET Actualités, (décembre 2006/janvier 2007): 75-84.

Communications lors de congrès nationaux et internationaux

Barillet S., Adam C., Buet A. et al., 2004, Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results, Congrès ECORAD 2004: The Scientific Basis for Environment Protection Against Radioactivity, Aix-en-Provence (France), 6-10 Septembre 2004, Poster.

Barillet S., Adam C., Devaux A. et al., 2005, Assessment of oxidative stress, genotoxicity and neurotoxicity in the teleostean *Danio rerio* exposed to depleted uranium, Congrès SETAC Europe 15th Annual Meeting, Lille (France), 22-26 Mai 2005, Communication orale.

Barillet S., Devaux A. et Adam C., 2006, Assessment of bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in the teleostean *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium, Workshop on Analytical Chemistry & Ecotoxicology - CABE, Université de Genève (Suisse), 15 Février 2006, Poster.

Barillet S., Devaux A. et Adam C., 2006, Assessment of bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in the teleostean *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of

uranium, Congrès SETAC Europe 16th Annual Meeting, The Hague (Pays-Bas), 7-11 Mai 2006, Poster.

Barillet S., Larno V., Devaux A. et al., 2006, L'uranium dans les écosystèmes aquatiques : Indicateurs d'exposition et d'effets, Colloque de l'ARET sur le thème Toxicologie humaine et environnementale: Indicateur d'exposition, marqueurs d'effet, Paris (France), 15-16 juin 2006, Poster.

SOMMAIRE GENERAL

<i>Liste des figures</i>	15
<i>Liste des tableaux</i>	19
<i>Liste des annexes</i>	21
<i>Liste des abréviations</i>	23
<i>Sommaire détaillé</i>	25
INTRODUCTION	35
PARTIE A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I. Etat de l'art sur l'uranium.....	41
Chapitre II. Outils d'évaluation en écotoxicologie	115
PARTIE B. ETUDE EXPERIMENTALE	
Chapitre I. Démarche expérimentale	143
Chapitre II. Matériels & Méthodes.....	159
Chapitre III. Résultats	207
Chapitre IV. Discussion	249
CONSLUSIONS & PERSPECTIVES	319
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	329
ANNEXES	383
<i>Glossaire</i>	437
<i>Index des espèces citées</i>	451
<i>Publications</i>	457
<i>Résumés (français et anglais)</i>	476

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Exemple de la spéciation de l'uranium (VI) en milieu environnemental (présence de matières organiques naturelles).

Figure 2. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

Figure 3. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

Figure 4. Nature et formation des aberrations chromosomiques.

Figure 5. Radiolyse de l'eau.

Figure 6. Les 5 grands types de dégradation de l'ADN présentés sur les 4 bases pouvant être touchées : pyrimidines (cytosine C et thymine T) et purines (adénine A et guanine G).

Figure 7. Effets biologiques des rayonnements ionisants. Evolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps.

Figure 8. Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique.

Figure 9. Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress.

Figure 10. Systèmes enzymatiques impliqués dans la défense antioxydante cellulaire.

Figure 11. Fiche signalétique du modèle biologique choisi : le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Figure 12. Description du cycle biologique chez *Danio rerio*.

Figure 13. Principales étapes du développement embryon-larvaire du poisson zèbre.

Figure 14. Dispositif utilisé lors d'expérimentations impliquant un nombre important d'organismes (200 à 300 individus par unité expérimentale).

Figure 15. Dispositif utilisé lors d'expérimentations impliquant un nombre restreint d'organismes (une cinquantaine d'individus par unité expérimentale).

Figure 16. Procédure de minéralisation des échantillons biologiques en vue de leur analyse par scintillation liquide, ICP-AES ou ICP-MS.

Figure 17. Photo prise au cours d'une séance de dissection illustrant le positionnement de l'animal sur la planche à dissection.

Figure 18. Protocole général de l'essai des comètes en version alcaline.

Figure 19. Analyse d'une comète par un système informatique (Komet 4.0) couplé à une caméra digitale installée sur un microscope à épifluorescence.

Figure 20. Principe de l'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux.

Figure 21. Aires graphiques permettant la visualisation des événements détectés lors du passage d'une suspension cellulaire en cytométrie de flux.

Figure 22. Conventions graphiques respectées dans ce manuscrit.

Figure 23. Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'acclimatation.

Figure 24. Evolution de l'activité catalase au cours de l'acclimatation.

Figure 25. Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'acclimatation.

Figure 26. Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'acclimatation.

Figure 27. Suivi de la bioaccumulation de l'uranium au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 28. Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 29. Evolution de l'activité catalase au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 30. Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 31. Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 32. Evolution de l'activité acétylcholinestérase au cours de l'exposition (*expérience A*).

Figure 33. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par le biais de l'essai des comètes en version alcaline) (*expérience A*).

Figure 34. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par la cytométrie en flux) (*expérience A*).

- Figure 35.* Suivi de la bioaccumulation de l'uranium au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 36.* Concentrations relatives en uranium de différents tissus après 20 j d'exposition (*expérience B*).
- Figure 37.* Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 38.* Evolution de l'activité catalase au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 39.* Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 40.* Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 41.* Evolution de l'activité acétylcholinestérase au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 42.* Evolution de l'activité acétylcholinestérase au cours de l'exposition (*expérience B*).
- Figure 43.* Représentation schématique de la physiologie respiratoire chez les poissons.
- Figure 44.* Observations au microscope photonique du tissu branchial des organismes après 20 j (*expérience B*).
- Figure 45.* Organisation anatomique du muscle chez le poisson.
- Figure 46.* Coupe anatomique montrant les structures cellulaires impliquées dans la contraction musculaire.
- Figure 47.* Observations réalisées au microscope électronique à transmission du tissu musculaire d'organismes exposés durant 20 j à 100 µg/L d'uranium appauvri (*expérience B*).
- Figure 48.* Observations réalisées au microscope électronique à transmission du tissu musculaire d'organismes exposés durant 20 j à 100 µg/L du mélange d'uranium appauvri et d'²³³U (*expérience B*).
- Figure 49.* Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par le biais de l'essai des comètes en version alcaline) (*expérience C*).
- Figure 50.* Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par le biais de la cytométrie en flux) (*expérience C*).
- Figure 51.* Evolution de l'intégrité de l'ADN des cellules hépatiques au cours de l'exposition (*expérience C*).

Figure 52. Evolution de l'intégrité de l'ADN des cellules gonadiques au cours de l'exposition (*expérience C*).

Figure 53. Synthèse des principaux résultats obtenues (en rouge), en cours d'analyse (en vert) ou proposés par l'autres auteurs et susceptibles de s'appliquer au cas de l'uranium (en bleu).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Données nucléaires des isotopes naturels de l'uranium.

Tableau II. Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0,2 % en ^{235}U .

Tableau III. Activités spécifiques de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri (estimées avec les isotopes compris entre ^{238}U et ^{234}U) à l'équilibre séculaire.

Tableau IV. Types de lésions spontanées observées en 24 h ou induites après une irradiation de 1 Gy par des radiations à faible transfert linéique d'énergie (radiations γ).

Tableau V. Diversité des altérations de l'ADN et principaux tests de génotoxicité associés.

Tableau VI. Conditions expérimentales et marqueurs biologiques investigués lors des différentes expérimentations.

Tableau VII. Liste des radio-isotopes de l'uranium employés lors des différentes expérimentations (^{234}U , ^{235}U et ^{238}U pour l'uranium appauvri et ^{233}U) et de leurs descendants respectifs sélectionnés pour la composition des différentes sources radioactives en fonction de leur pertinence vis-à-vis des durées d'expositions considérées (20 j).

Tableau VIII. Fiche signalétique relative à l'étude de l'influence de la durée d'acclimatation et du sexe des individus.

Tableau IX. Fiche signalétique relative à l'évaluation de la chimiotoxicité de l'uranium.

Tableau X. Facteurs de bioconcentration observés (*expérience A*).

Tableau XI. Fiche signalétique relative à l'évaluation des toxicités chimiques et radiologique (1).

Tableau XII. Estimation des débits de dose interne délivrés aux organismes lors de l'exposition aux différentes conditions expérimentales (*expérience B*).

Tableau XIII. Fiche signalétique relative à l'évaluation des toxicités chimiques et radiologique (2).

LISTE DES ANNEXES

Annexe A. Composition de l'eau d'exposition estimée selon le modèle CHES.

Annexe B. Effet de l'acclimatation et du sexe : Etude du stress oxydant.

Annexe C1. Manip A : Suivi de la contamination.

Annexe C2. Manip A : Etude de la bioaccumulation (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe C3. Manip A : Etude du stress oxydant (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe C4. Manip A : Etude de la neurotoxicité (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe C5. Manip A : Etude de la génotoxicité (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe D1. Manip B : Suivi de la contamination.

Annexe D2. Manip B : Etude de la bioaccumulation (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe D3. Manip B - Etude du stress oxydant (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe D4. Manip B : Etude de la neurotoxicité (Données brutes et Traitement statistique).

Annexe E1. Manip C : Suivi de la contamination.

Annexe E2. Manip C - Etude de la génotoxicité (Données brutes et Traitement statistique).

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE : acétylcholinestérase	DTNB : dithiobisnitrobenzoate
ADN : acide désoxyribonucléique	EDEN : <i>elementary dose evaluation for natural environment</i>
ANOVA : <i>analysis of variance</i> (analyse de variance)	EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
APE : <i>apurinic/aprimidic endonuclease</i> endonucléase spécifique aux sites abasiques	Eh : potentiel d'oxydoréduction
ARN : acide ribonucléique	Endo III : endonucléase III
ARNm : acide ribonucléique messenger	ENTPE : Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat
ATSDR : <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>	ENVL : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
B[a]P : benzo[a]pyrène	EROD : éthoxyrésorufine-O-dééthylase
BCF : bioconcentration factor (facteur de bioconcentration)	eV : électronvolt
BHT : barrière hémato-testiculaire	Fpg : formamidopyrimidine glycosylase
BHE : barrière hémato-encéphalique	GPx : glutathion peroxydase
BSA : bovine serum albumin (albumine sérique de bovin)	GR : glutathion réductase
CAT : catalase	GSH : glutathion (forme réduite)
CYP2E1 : isoforme 2E1 du cytochrome P450	GSHtot : glutathion total
DMSO : dimethylsulfoxyde	GSSG : glutathion (forme oxydée)
DO : densité optique	HBSS : <i>hanks' balanced salt solution</i>
DPUC : dose rate per unit of concentration (débit de dose par unité de concentration)	HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)pipérazine-1-ethanesulfonate
	hpf : heures post-fertilisation
	ICP-AES : <i>inductive coupled plasma - atomic emission spectroscopy</i> (plasma à couplage

inductif associé à un spectromètre d'émission atomique)

ICP-MS : *inductive coupled plasma - mass spectroscopy* (plasma à couplage inductif associé à un spectromètre de masse)

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire

LRE : Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie

LSE : Laboratoire des Sciences de l'Environnement

MT : métallothionéine

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OECD : *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OCDE :

organisation pour la coopération et le développement économique)

PBS : *phosphate buffered saline*

pH : potentiel hydrogène

PHGPx : *phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase*

PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride

SOD : superoxyde dismutase

TBAR : *thiobarbituric acid-reactive substances*

TCA : trichloracétate

TEL : transfert d'énergie linéique

TNB : thionitrobenzoate

Tp(P) : tampon phosphate

WHO : *World Health Organization* (OMS : organisation mondiale pour la santé)

SOMMAIRE DETAILLE

<i>AVANT-PROPOS</i>	31
<i>INTRODUCTION</i>	35
<i>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	41
<i>I. ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM</i>	41
1 - Introduction.....	41
2 - Un peu d'histoire.....	41
3 - Propriétés physico-chimiques et leurs implications en termes d'utilisation par l'Homme.....	42
3.1 - Carte d'identité de l'élément uranium	42
3.2 - Principales propriétés chimiques.....	42
3.3 - Principales propriétés physiques	44
4 - L'élément uranium dans l'environnement : occurrence et comportement	47
4.1 - L'uranium dans les roches.....	47
4.2 - Origines de sa redistribution dans l'environnement	48
4.3 - L'uranium dans les écosystèmes terrestres	49
4.4 - L'uranium dans les écosystèmes aquatiques	50
5 - Éléments de toxicologie	56
5.1 - Toxicocinétique.....	58
5.2 - Toxicité aiguë	66
5.3 - Toxicité chimique	69
5.4 - Toxicité radiologique	94
<i>SYNTHESE DU CHAPITRE SUR L'URANIUM</i>	111
<i>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	115

<i>II. OUTILS D'EVLUATION EN ECOTOXICOLOGIE.....</i>	115
1 - L'ecotoxicologie.....	115
2 - Les biomarqueurs : notions et concepts.....	118
2.1 - Définition et rôle(s) biologique(s).....	118
2.2 - Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité	119
2.3 - Qualités requises	121
3 - Les poissons, des organismes aquatiques modèles	122
3.1 - Marqueurs chimiques de bioaccumulation chez les poissons	123
3.2 - Biomarqueurs chez les poissons	124
4 - Pistes de recherche retenues pour l'étude de l'uranium.....	124
4.1 - Etude du stress oxydant	124
4.2 - Etude de la génotoxicité	129
4.3 - Etude de la neurotoxicité	134
4.4 - Altérations histologiques	136
<i>SYNTHESE DU CHAPITRE SUR LES BIOMARQUEURS</i>	139
<i>DEMARCHE EXPERIMENTALE.....</i>	143
1 - Modèle biologique : Le poisson zèbre.....	143
1.1 - Phylogénie	143
1.2 - Caractéristiques de l'espèce.....	143
1.3 - Justification du choix du <i>Danio</i> comme modèle biologique	147
2 - Variables ecotoxicologiques mesurées.....	148
2.1 - Etude toxicocinétique.....	148
2.2 - Etude écotoxicologique	149
3 - Protocoles expérimentaux mis en place.....	150

3.1 - Les choix stratégiques	150
3.2 - Les approches expérimentales	152
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	159
1 - Conditions expérimentales	159
1.1 - Origine et maintenance des poissons.....	159
1.2 - Caractérisation de l'eau synthétique.....	160
1.3 - Dispositifs expérimentaux.....	161
1.4 - Protocoles de contamination et gestion des eaux contaminées	163
2 - Méthodes d'analyse de l'uranium	164
2.1 - Techniques de mesure de l'uranium.....	164
2.2 - Spécifications des appareils employés	167
2.3 - Protocoles de préparation des échantillons en vue de ces analyses	167
3 - Mesures de bioaccumulation, estimation des débits de dose	170
3.1 - Bioaccumulation	170
3.2 - Bioconcentration.....	170
3.3 - Concentration tissulaire relative.....	170
3.4 - Conversions en débits de doses radiologiques	171
4 - Prélèvement et préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biologiques ...	174
4.1 - Prélèvement des différents tissus et organes.....	174
4.2 - Préparation des échantillons pour les différentes analyses biologiques.....	176
5 - Biomarqueurs hépatiques de stress oxydant.....	180
5.1 - Dosage de la charge protéique	181
5.2 - Dosage de la quantité de glutathion total (GShtot)	182
5.3 - Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	183

5.4 - Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	184
5.5 - Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	186
6 - Biomarqueur de neurotoxicité	187
6.1 - Dosage de la charge protéique	187
6.2 - Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	188
7 - Biomarqueurs de genotoxicité	189
7.1 - L'essai des comètes en conditions alcalines	189
7.2 - Estimation des dommages oxydatifs.....	194
7.3 - La cytométrie en flux	196
8 - Observations par microscopie électronique à transmission (MET)	201
8.1 - Principe de la technique	201
8.2 - Réalisation des observations.....	201
9 - Représentation graphique des résultats.....	202
10 - Traitement statistique des résultats.....	203
<i>RESULTATS</i>	207
1 - Influence de la durée d'acclimatation et du sexe	208
2 - Evaluation de la chimiotoxicité de l'uranium	211
2.1 - Bioaccumulation	212
2.2 - Etude du stress oxydant	214
2.3 - Etude de la neurotoxicité	217
2.4 - Etude de la génotoxicité	220
3 - Evaluation de la part relative des toxicités chimique et radiologique (1).....	222
3.1 - Bioaccumulation	222
3.2 - Etude du stress oxydant	226

3.3 - Etude de la neurotoxicité	230
3.4 - Etude de la génotoxicité	232
3.5 - Observations histologiques.....	232
4 - Evaluation de la part relative des toxicités chimique et radiologique (2)	237
4.1 - Etude de la génotoxicité	239
4.2 - Observations histologiques.....	243
<i>SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS</i>	245
<i>DISCUSSION</i>	249
1 - Influence de la durée d'acclimatation et du sexe	249
2 - Toxicocinétique de l'uranium.....	250
2.1 - Suivi de la bioaccumulation à l'échelle des organismes entiers	250
2.2 - Distribution tissulaire... quelques clés d'interprétation	259
3 - Toxicologie de l'uranium	264
3.1 - Evaluation du stress oxydant	264
3.2 - Evaluation de la neurotoxicité	278
3.3 - Evaluation de la génotoxicité.....	289
3.4 - Observations histologiques.....	307
<i>CONCLUSIONS & PERSPECTIVES</i>	319
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	329
<i>ANNEXES</i>	383
<i>GLOSSAIRE</i>	439
<i>INDEX DES ESPECES CITEES</i>	453
<i>PUBLICATIONS</i>	457

AVANT-PROPOS

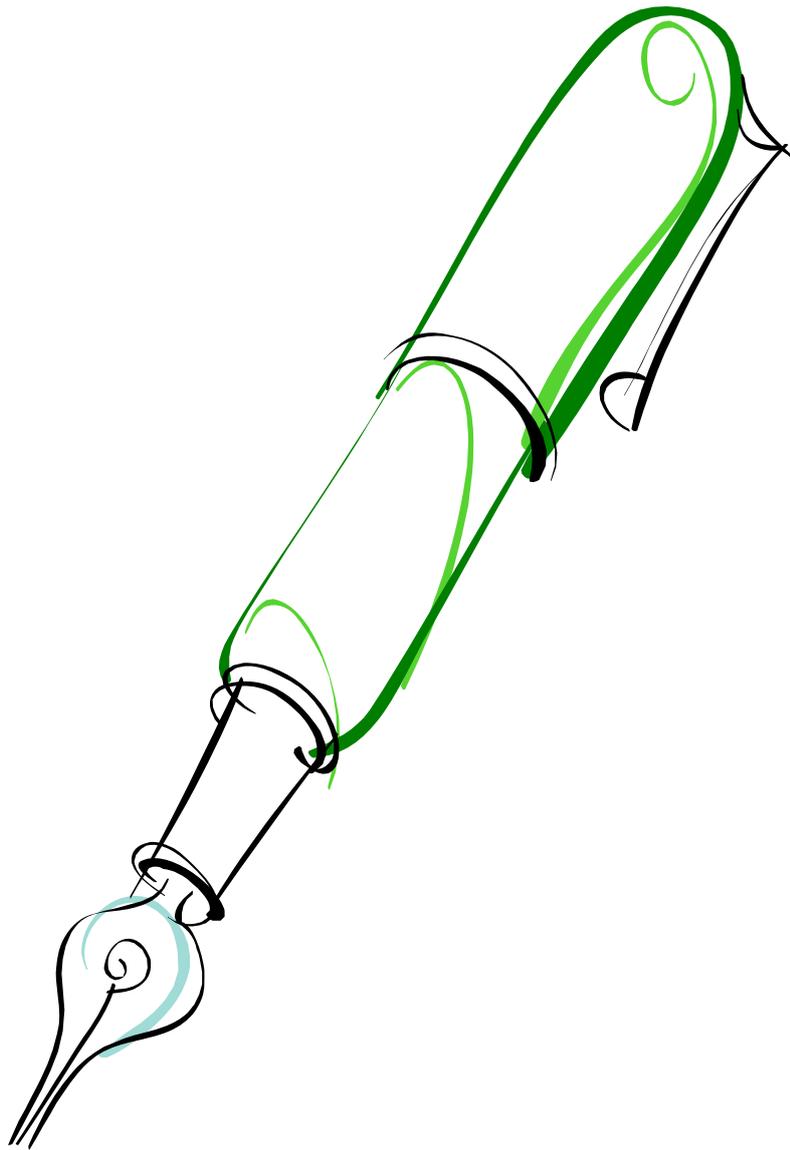
Avant de débiter la lecture du présent document, quelques remarques doivent être faites quant aux choix rédactionnels adoptés.

Vous ne tarderez sans doute pas à constater que chaque passage (appartenant aussi bien à la bibliographie, qu'aux matériels et méthodes ou à la discussion), est abordé de façon très complète et détaillée. En effet, en raison du caractère pluridisciplinaire du présent travail, il nous a semblé important de proposer un document dans lequel chacun des domaines d'études est abordé de façon aussi complète que possible.

Toujours dans le soucis d'apporter une information comprise par chacun, un glossaire est disponible à la fin du document. Chacun des mots y figurant est ainsi marqué d'une signalétique particulière (i) lors de sa première apparition dans le texte. De même, un index des espèces citées (essentiellement des organismes aquatiques, poissons, bivalves, etc.) est proposé en fin de document (où les noms communs français et anglais sont notamment donnés).

Nous sommes donc conscients du fait que ce manuscrit représente un travail de lecture et de compréhension important mais nous espérons que parmi la somme d'informations disponibles, vous trouverez quelques raisons de penser qu'elles n'auront pas toutes été inutiles à mentionner.

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes¹ terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales.

Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les métaux lourds¹ posent de sérieux problèmes écologiques, tant par le caractère ubiquiste de leur présence au sein de la biosphère que par leur forte rémanence et leur toxicité¹ élevée. Parmi eux, l'uranium présente un intérêt particulier. En effet, en plus de présenter les caractéristiques propres à ces éléments, l'uranium est doté d'une activité radioactive¹ manifestée sous la forme de l'émission de particules α ¹ pour l'ensemble de ses isotopes¹. En outre, l'un des isotopes de l'uranium (^{235}U) est fissile¹. Cette caractéristique n'est présentée que par deux éléments chimiques : l'uranium et le plutonium. Or, c'est à partir de la réaction de fission nucléaire qu'est produite l'énergie dite "nucléaire". L'intérêt de l'uranium pour l'industrie et même l'économie mondiale s'est donc vu matérialisé par une exploitation intensive des minerais d'uranium à travers le monde, drainant avec elle les problèmes de contamination de l'environnement proche des mines. Ainsi, l'uranium constitue quantitativement l'un des premiers toxiques, à la fois sur le plan chimique et radiologique, présent dans les eaux d'exhaures d'exploitation de ce minerai. Comme nous pourrions le voir dans ce document, l'industrie nucléaire n'est pas la seule responsable de la redistribution de l'uranium dans l'environnement. L'origine de l'uranium importe peu d'ailleurs, seul le constat de sa présence dans les systèmes aquatiques continentaux suffit à motiver la conduite d'études visant à évaluer les conséquences de cette présence sur les biocénoses¹.

Deux ambitions majeures ont donc motivé ce travail : (i) étudier les paramètres toxicocinétiques¹ (internalisation, distribution de l'élément dans l'organisme) et toxicologiques¹ (mécanismes d'action toxique, effets biologiques) de l'uranium chez le poisson et (ii) estimer l'influence relative des propriétés chimiques et radiologiques de l'uranium sur ces paramètres.

Le poisson a été choisi en tant que modèle biologique pour notre étude du fait de sa position dans les systèmes aquatiques. Les poissons sont en effet des organismes intégrateurs puisqu'ils sont généralement situés très en aval des chaînes trophiques aquatiques. De plus, dans le cas d'espèces dites "nobles", les poissons peuvent présenter un intérêt halieutiqueⁱ très important. Ils peuvent de ce fait représenter un risque potentiel pour la santé publique. Ce modèle a préalablement été étudié dans le cadre de recherches menées sur l'uranium (Poston, 1982 ; Swanson, 1985 ; Waite et al., 1990 ; Bywater et al., 1991 ; Holdway, 1992 ; Hamilton, 1995 et 1997 ; Labrot, 1996 ; Labrot et al., 1999 ; Cooley et al., 2000 ; Cooley et Klaverkamp, 2000 ; Buet et al., 2005). Néanmoins, la plupart des auteurs ne se sont intéressés qu'à l'accumulation et/ou à la distribution du radioélémentⁱ dans les organismes (Poston, 1982 ; Swanson, 1985 ; Cooley et Klaverkamp, 2000) ou à sa toxicité aigüeⁱ, utilisant la mortalité comme paramètre de mesure (Bywater et al., 1991 ; Holdway, 1992 ; Hamilton, 1995 et 1997).

Les études portant sur les effets toxicologiques de l'uranium sur le poisson sont quant à elles beaucoup plus rares. De plus, bien qu'elles aient contribué à alimenter les jeux de données toxicologiques sur le sujet, ces études ont également soulevé un grand nombre de questions restées sans réponse (Waite et al., 1990 ; Labrot, 1996 ; Labrot et al., 1999 ; Cooley et al., 2000 ; Buet et al., 2005). En effet, les résultats obtenus par le biais de ces rares études conduisent à des conclusions souvent peu consistantes voire contradictoires. Ce bref aperçu des données disponibles dans la littérature nous permet donc de voir qu'un effort substantiel est à produire de façon à accroître les connaissances scientifiques dans ce domaine.

Dans ce contexte, notre étude toxicologique a consisté en l'analyse de marqueurs biologiques susceptibles de fournir une réponse précoce à la présence d'uranium dans l'eau. Dans la cascade d'évènements initiés au contact de l'uranium, un large panel de mesures biologiques est susceptible d'être investigué, depuis des altérations moléculaires jusqu'à des conséquences populationnelles, voire au-delà (communautés, écosystèmes). Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes attachés à suivre des marqueurs situés en amont de la cascade d'évènements et qui constituent donc les premières évidences de perturbations. Au niveau subcellulaire, nous nous sommes ainsi intéressés au suivi de marqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant, d'un marqueur enzymatique de neurotoxicité ainsi qu'au suivi de l'intégrité d'une macromolécule clé du vivant : l'ADN. Nous avons également recherché des effets histopathologiques au niveau de

certaines tissus d'intérêts (branchies, cerveau, muscle et gonades). Au travers de cette approche multiparamétrique, nous avons ainsi tenté d'obtenir une image "multidimensionnelle" des conséquences biologiques d'une interaction uranium/poisson.

Nous nous sommes également attachés à évaluer la part relative des effets chimiques et radiologiques de l'uranium *in vivo* (cet aspect n'ayant été traité par aucune étude à notre connaissance). Pour cela, différents mélanges isotopiques d'uranium ont été utilisés de manière à faire varier l'activité radiologique de l'élément.

Afin de présenter l'étude menée en ce sens, le présent manuscrit s'articule en deux parties : l'une bibliographique, l'autre expérimentale.

Dans la partie bibliographique, un "état de l'art" concernant l'uranium est dressé et constitue un premier chapitre. Sont ainsi successivement abordées : son histoire, ses propriétés physico-chimiques, sa présence dans l'environnement ainsi que ses caractéristiques toxicologiques et écotoxicologiques^① (toxicocinétique, toxicités chimique et radiologique). Un second chapitre est quant à lui dédié à la présentation des outils d'évaluation écotoxicologique, en particulier les biomarqueurs^②, et présente ceux choisis pour notre étude sur l'interaction uranium/poisson.

La partie expérimentale débute avec la présentation de la démarche entreprise qui tient lieu de préambule au chapitre "Matériels & Méthodes" proprement dit. Les chapitres "Résultats" et "Discussion" sont ensuite exposés avant de dresser un bilan de ces travaux au travers d'une conclusion générale et de présenter les perspectives d'études sur lesquelles ces travaux seraient susceptibles de déboucher.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ETAT DE L'ART SUR L'URANIUM

1 - INTRODUCTION

L'uranium est aujourd'hui au cœur des développements scientifiques et technologiques réalisés dans le cadre de l'utilisation civile de l'énergie nucléaire de fission, mais aussi des débats sur le nucléaire présent ou futur et sur son utilisation à des fins militaires. Il n'est donc pas surprenant que l'uranium ait donné, et donne encore, matière à de nombreuses recherches.

Au cours de ce chapitre, plusieurs points seront abordés : tout d'abord les dates clé liées à l'histoire de cet élément, ses propriétés physico-chimiques et leurs implications en termes d'utilisation par l'Homme. Le comportement de l'uranium dans les différents compartiments environnementaux sera ensuite passé en revue avec une attention toute particulière portée aux écosystèmes aquatiques. Enfin, les caractéristiques toxicologiques et écotoxicologiques de cet élément seront exposées, permettant de définir les pistes de recherche ayant conduit à la réalisation du présent travail.

2 - UN PEU D'HISTOIRE...

1789 : Découverte de l'élément par le chimiste allemand [M.H. Klaproth \(1789\)](#) qui le baptisa uranium, suite à la découverte 8 ans plus tôt de la planète Uranus.

1852 : Le chimiste A. Patera découvrit le pouvoir colorant de ce nouvel élément et initia la production industrielle de pigments (6 variétés de jaune et une noire) destinés à la coloration du verre et de la porcelaine.

1896 : Découverte des rayons uraniques par [H. Becquerel \(1896\)](#) qui constituera le début de l'histoire de la radioactivité[?].

1939 : Découverte de la fission de l'uranium par [Otto Hahn et Fritz Strassmann \(1939\)](#), l'uranium devient alors l'un des éléments les plus importants pour toute l'activité humaine, avec les développements de ses applications militaires tout d'abord (destruction de Hiroshima par une bombe atomique constituée de ^{235}U), puis ensuite, après la Seconde Guerre mondiale, civiles avec la production d'énergie électrique. Ce sont des applications qui ont été le "moteur" du progrès dans les connaissances des propriétés physiques (propriétés nucléaires en particulier) et chimiques de cet élément ([Adloff et Genet, 2001](#)).

3 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET LEURS IMPLICATIONS EN TERMES D'UTILISATION PAR L'HOMME

3.1 - Carte d'identité de l'élément uranium

Quatre vingt douzième élément de la table périodique, l'uranium est l'atome le plus lourd (qui contient le plus de nucléons¹) présent naturellement sur la Terre. A l'état pur, c'est un métal gris et dur, très dense (sa masse volumique est de $19,05 \text{ g/cm}^3$), avec une température de fusion de $1\ 133 \text{ }^\circ\text{C}$. Il a dix-sept isotopes, tous radioactifs, dont trois seulement sont présents à l'état naturel : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U ([WHO, 2001](#)).

3.2 - Principales propriétés chimiques

D'un point de vue chimique, l'uranium, élément de numéro atomique $Z = 92$, fait partie de la famille d'éléments nommés actinides¹ qui comprend quinze membres, de l'actinium ($Z = 89$) au lawrencium ($Z = 103$). Chaque atome d'uranium possède 92 protons¹ et entre 135 et 148 neutrons¹ ([Wikipedia contributors, 2006](#)).

Chimiquement, l'uranium a un comportement similaire à celui des autres éléments du groupe VI¹ du tableau périodique, et ressemble au chrome et au tungstène ([Irwin et al., 1997](#)). L'uranium élémentaire est une substance très réactive, capable de former des composés avec la plupart des éléments de la classification périodique ([Ervanne, 2004](#)). C'est pourquoi il n'existe pas à l'état natif dans la nature, c'est-à-dire à l'état de métal, chimiquement pur ou en alliage. En effet,

en raison de sa forte électropositivité, c'est un élément qui se caractérise par une affinité marquée pour l'oxygène. Il ne se rencontre donc que dans des composés oxygénés (Madic et Genet, 2001).

La classification proposée par Nieböer et Richardson (1980) basée à la fois sur les propriétés chimiques (stabilité des complexes formés avec différents ligands) et biochimiques (affinité avec les ligands rencontrés dans les systèmes biologiques) positionne donc l'uranium, et les actinides en général, dans la classe A. Cette classe comprend les éléments métalliques ayant une forte affinité avec les liaisons oxygène (O^{2-} , OH^- , H_2O , $R-OH$, $RCOOH^-$) et formant des combinaisons stables.

De même, les ions uranium sont considérés comme des "acides durs" au sens de Pearson (Pearson, 1963) puisqu'ils réagissent préférentiellement avec les "bases dures" que sont les ligands à atomes donneurs comme l'oxygène ou le fluor. La chimie de complexation des ions uranium en solution aqueuse est ainsi dominée par l'interaction avec des ligands oxygénés.

L'atome d'uranium présente la configuration électronique externe suivante : $5s^2 5p^6 5d^{10} 5f^3 6s^2 6p^6 6d^1 7s^2$. Les six électrons les plus externes des niveaux 5f, 6d et 7s forment le système des électrons de valence de l'uranium. L'uranium est donc capable d'adopter quatre états de valence associés aux formes ioniques suivantes : U^{3+} (+III), U^{4+} (+IV), UO_2^+ (+V) et UO_2^{2+} (+VI) (Ribera et al., 1996). Néanmoins, les formes largement majoritaires dans l'environnement sont celles caractérisées par un degré d'oxydationⁱ (+IV) ou (+VI). Très schématiquement, la géochimie environnementale de l'uranium permet de prédire un transport de l'uranium sous sa forme U(+VI) dans les zones au potentiel d'oxydationⁱ (Eh) élevé, et un dépôt par réduction et précipitation dans les zones à Eh faible sous sa forme U(+IV) (Ervanne et al., 2004).

En solution aqueuse, l'état d'oxydation le plus courant est donc (+VI) si les conditions sont oxydantes, l'uranium étant alors majoritairement sous la forme d'ion uranyle UO_2^{2+} qui, en présence des ligands organiques ou inorganiques, forme des complexes relativement stables. En conditions réductrices, l'état d'oxydation le plus courant est (+IV), la solubilité de l'uranium sous cette forme étant plus faible (Colle et al., 2001 ; Denison, 2004).

3.3 - Principales propriétés physiques

3.3.1 - Propriétés nucléaires

3.3.1.1 - L'uranium naturel

L'uranium naturel se présente sous la forme d'un mélange de trois isotopes : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U (représentant respectivement 0,005, 0,720 et 99,274 % de la masse totale). De ces trois isotopes de l'uranium, seuls ^{235}U et ^{238}U sont primordiaux (c'est à dire qu'ils existent depuis l'origine de la Terre, c'est-à-dire depuis 4,5 Ga). L'isotope ^{234}U est quant à lui un produit de la décroissance de ^{238}U (Madic et Genet, 2001).

Leurs périodes radioactives (temps nécessaire à la radioactivité pour décroître de moitié) sont, quant à elles, de $2,44 \cdot 10^5$, $7,10 \cdot 10^8$ et $4,50 \cdot 10^9$ années (respectivement pour l' ^{234}U , l' ^{235}U et l' ^{238}U). Or, plus la période radioactive d'un isotope est longue moins son activité radiologique est importante. Ceci explique le fait qu'environ 49,5 % de la radioactivité de l'uranium naturel soit associés à l' ^{234}U . En effet, malgré sa faible concentration dans l'uranium naturel (0,005 %), l' ^{234}U présentant une très forte activité spécifique ($2,3 \cdot 10^8$ Bq/g) contribue à l'impact dosimétrique de l'uranium naturel dans des proportions comparables à celles de l' ^{238}U (qui, malgré sa forte abondance dans l'uranium naturel, ne contribue qu'à hauteur de 48,2 % de sa radioactivité totale). Les 2,2 % restants sont liés à la décroissance radioactive de l' ^{235}U (Bleise et al., 2003).

Le **tableau I** présente les caractéristiques nucléaires des isotopes naturels de l'uranium. Ces isotopes, instables, se désintègrent principalement par émission de rayonnements α ¹ (noyau d'hélium ^4_2He). Ils présentent aussi la propriété de se désintégrer par fission spontanée mais ce processus est beaucoup moins probable (WHO, 2001).

Tableau I. Données nucléaires des isotopes naturels de l'uranium (Aigueperse et al., 2001)

Isotopes	Période (années)	Emission X et γ		Emission α	
		Energie (keV)	Probabilité d'émission (%)	Energie (MeV)	Probabilité d'émission (%)
^{234}U	$2,44.10^5$	53,3	0,68	4,723	28,4
		120,9	0,23	4,775	71,4
		15,5	29	4,218	5,7
^{235}U	$7,98.10^8$	143,8	10,9	4,365	17,0
		163,3	5,0	4,400	55,0
		185,7	57,2	4,556	4,2
		205,3	5,01	4,599	5,0
^{238}U	$4,5.10^9$	15,4	8,7	4,149	23
				4,196	77

3.3.1.2 - Particularité de l' ^{235}U : la fission nucléaire et ses applications

L'uranium de masse atomique 235 est le seul nucléide naturel qui soit fissile. Les noyaux des deux autres isotopes de l'uranium naturel (^{234}U et ^{238}U) sont beaucoup plus stables et ne peuvent pas subir la fission. Par contre, le noyau de ^{238}U est capable de capturer un neutron. Dans ce cas, il se transforme en un noyau de plutonium, de masse atomique 239. Le ^{239}Pu est une matière fissile susceptible de produire de l'énergie, comme le ^{235}U (Rouyer, 2001).

Dans la réaction de fission (Equation 1), le noyau de ^{235}U absorbe un neutron (particule sans charge électrique), s'étire et se scinde brutalement en deux ou trois autres noyaux, nommés produits de fission. Cette réaction s'accompagne d'un grand dégagement d'énergie (200 MeV) ainsi que de la libération de deux ou trois neutrons.



Les deux produits de fission sont éjectés avec une grande vitesse (8 000 km/s), sont ralentis par des chocs successifs avec les atomes avoisinants, et s'arrêtent après un très petit parcours (quelques dizaines de micromètres). Leur énergie est alors dissipée en chaleur.

Les neutrons libérés peuvent quant à eux provoquer à leur tour la fission d'autres noyaux de ^{235}U et la création de nouvelles quantités d'énergie, et la libération d'autres neutrons... et ainsi de suite. C'est ainsi qu'on peut obtenir une réaction en chaîne.

Les deux applications principales de la fission sont les réacteurs nucléaires producteurs d'électricité et les armes nucléaires (bombe A). Dans les réacteurs, la réaction en chaîne est stabilisée à un niveau donné de nombre de fissions simultanées. La réaction est alors contrôlée. Le principe d'un réacteur nucléaire consiste ainsi à récupérer la chaleur émise par dissipation de l'énergie cinétique des produits de fission pour la transformer en électricité par des moyens traditionnels de turbine à vapeur (Viala, 2001). Dans le cas de la bombe atomique, au contraire, la réaction en chaîne doit s'emballer, croître exponentiellement dans le temps le plus court pour libérer un maximum d'énergie instantanément.

3.3.1.3 - L'uranium appauvri

L'uranium appauvri est un sous-produit de l'industrie nucléaire qui peut avoir deux origines, soit les usines d'enrichissement en ^{235}U de l'uranium naturel pour la fabrication du combustible des réacteurs nucléaires, soit le retraitement de combustibles irradiés (WHO, 2001). Il se différencie de l'uranium naturel par une composition isotopique différente, et notamment par une teneur plus faible en ^{235}U , de l'ordre de 0,2 à 0,3 % au lieu de 0,7 % pour l'uranium naturel (cf. tableau II).

Tableau II. Composition isotopique en masse et en activité de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0,2 % en ^{235}U (d'après Aigueperse et al., 2001)

	Masse (%)			Activité (%)			Activité (Bq/g)		
	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U	^{238}U	^{235}U	^{234}U
U naturel	99,274	0,720	0,0055	48,2	2,3	49,5	12 400	580	12 474
U appauvri	99,797	0,202	0,0008	86,1	1,1	12,8	12 400	158	1 843

Notons que l'uranium appauvri est également appauvri en ^{234}U d'un facteur 7 par rapport à l'uranium naturel (Bleise et al., 2003). Compte tenu de cet appauvrissement en ^{234}U , l'activité totale et l'activité α de l'uranium appauvri sont respectivement 1,3 fois et 1,7 fois moins importantes que celles de l'uranium naturel (cf. Tableau III).

Tableau III. Activités spécifiques de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri (estimées avec les isotopes compris entre ^{238}U et ^{234}U) à l'équilibre séculaire^① (Aigueperse et al., 2001)

	Activité totale (Bq/g)	Activité α (Bq/g)
U naturel avec ses descendants ^①	$50,4 \cdot 10^3$	$25,2 \cdot 10^3$
U appauvri avec ses descendants	$39,3 \cdot 10^3$	$14,4 \cdot 10^3$

3.3.2 - Propriétés mécaniques

L'uranium présente des propriétés mécaniques très intéressantes (notamment sa résistance) et une densité élevée (1,7 fois celle du plomb). De plus, l'uranium appauvri a un prix très compétitif par rapport aux autres métaux de propriétés du même type (tungstène, osmium, ...). C'est pourquoi il est largement utilisé dans le domaine industriel. L'uranium appauvri entre ainsi dans la fabrication d'ailes et de gouvernails d'avion, de quilles de voilier, de systèmes de protections contre les rayonnements ionisants, de colmateurs d'appareils d'irradiation médicale. Dans le domaine militaire, il est utilisé pour le blindage de chars et la fabrication d'obus perforants.

4 - L'ELEMENT URANIUM DANS L'ENVIRONNEMENT : OCCURRENCE ET COMPORTEMENT

Ce chapitre décrit le comportement de l'uranium dans les écosystèmes terrestres et les écosystèmes aquatiques. Il passe en revue les différents paramètres physiques, chimiques et biologiques qui régissent son devenir dans le milieu naturel. Il présente en particulier les processus d'échange entre les milieux physiques, sol et eau, et les organismes végétaux et animaux.

4.1 - L'uranium dans les roches

L'uranium, présent dans la croûte terrestre depuis la formation de notre planète (Bonin et Blanc, 2001), se trouve largement dispersé à l'état de traces dans toutes les roches. Sa concentration y avoisine les 2 à 4 g/t en moyenne (Bosshard et al., 1992 ; Ribera et al., 1996 ; Bleise et al., 2003).

Il entre dans la composition d'au moins deux cents minéraux, classés selon leur origine, séparant ainsi les minéraux primaires des minéraux secondaires. Dans les minéraux primaires (formés en profondeur dans la croûte terrestre, en milieu réducteur) l'uranium se présente sous l'état d'oxydation (+IV) tandis que dans les minéraux secondaires (formés en surface par altération des premiers en milieu oxygéné), l'uranium est à l'état d'oxydation (+VI).

L'uranium peut être le composant essentiel de certains minéraux rares (p. ex. uraninite, uranothorianite), élément de substitution dans des minéraux communs (p.ex. zircon) et peut également être adsorbé sur la surface des minéraux (par exemple sur les oxy-hydroxydes de fer ou les argiles), associé à la matière organique ou encore dissous dans l'eau interstitielle.

4.2 - Origines de sa redistribution dans l'environnement

Sous l'action des processus d'érosion et autres mécanismes géologiques de formation des sols, l'uranium présent dans les roches est naturellement transféré dans les sols qui en sont issus. Leur lessivage par les eaux de pluie conduit alors naturellement à une dissémination de l'uranium dans toutes les composantes de l'environnement (Colle et al., 2001).

A cette redistribution naturelle de l'uranium dans l'environnement viennent s'ajouter des perturbations anthropogéniques à l'origine d'une dispersion de l'uranium dans les différents compartiments environnementaux (aquatique, terrestre et aérien). Ainsi, on dénombre quatre types d'activités industrielles ayant un impact majeur sur le cycle de l'uranium dans l'environnement :

- (1) les activités minières et industrielles liées au cycle du combustible nucléaire ;
- (2) l'utilisation du charbon qui contient des quantités non négligeables de radionucléidesⁱ naturels (radium, thorium, uranium, potassium) et dont la combustion conduit à leur libération dans l'atmosphère;
- (3) l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels (pouvant présenter des teneurs en uranium telles que leur radioactivité peut atteindre jusqu'à 1 500 Bq/kg) pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration de compléments alimentaires pour le bétail ;
- (4) l'utilisation militaire d'uranium appauvri qui peut conduire à un enrichissement des sites bombardés en fines particules d' $\text{UO}_2(\text{s})$ déposées à proximité des lieux d'explosion.

4.3 - L'uranium dans les écosystèmes terrestres

4.3.1 - L'uranium dans les sols

La teneur moyenne en uranium des sols (si l'on considère la couche superficielle de ceux-ci sur une épaisseur de 30 cm) est de l'ordre de 2 à 3 t/km². Dans la plupart des sols, cela représente une concentration moyenne de 1,8 µg/g, avec une gamme de variation comprise entre 0,5 et 5 µg/g (Ribera et al., 1996).

De par les remaniements géologiques du sol, cet uranium présent en surface va pouvoir gagner des horizons géologiques plus profonds ou bien être redistribué aux autres compartiments environnementaux. Quatre mécanismes principaux vont ainsi influencer sur cette répartition : le transport par le biais de solvants (p. ex. la lixiviation par les eaux de pluie), des phénomènes de diffusion, de transports biologiques (par les plantes, les microorganismes, les insectes du sol, etc.) ou encore par resuspension dans l'air ou l'eau (Ribera et al., 1996).

Le comportement de l'uranium dans les écosystèmes terrestres est également étroitement lié aux conditions d'oxydoréduction du milieu (Gueniot et al., 1988a,b). Ainsi, dans un sol, où les conditions oxydantes prévalent généralement, l'uranium se trouve essentiellement sous forme d'ion uranyle (UO₂²⁺), à l'état d'oxydation (+VI), et présente donc une forte mobilité. Ceci explique les faibles teneurs en uranium généralement observées dans les sols. Cependant, sous cette forme l'uranium est susceptible de s'associer avec les composés organométalliques et se complexer facilement avec la matière organique, les carbonates, les phosphates ou les sulfates. C'est pourquoi l'apparition de conditions réductrices (liées à la présence de matière organique) ou la présence de minéraux argileux ou d'oxy-hydroxydes de fer peuvent contribuer à immobiliser l'uranium dans les sols (Laroche, 2004).

Ces différents mécanismes de complexation conditionnent donc pour l'essentiel le comportement de l'uranium dans les sols. Ces phénomènes conduisent, en particulier, à l'existence de zones d'accumulation dans les horizons riches en matières organiques, les minéraux argileux ne jouant qu'un rôle secondaire dans la rétention de l'uranium par les sols.

4.3.2 - L'uranium dans les organismes

4.3.2.1 - Les végétaux

Du fait de son caractère ubiquiste dans les sols, on retrouve l'uranium dans l'ensemble des populations végétales terrestres. Ainsi, pour les végétaux supérieurs, il existe une forte corrélation entre la teneur en uranium des sols et celle des plantes. L'absorption racinaire est sous la dépendance des mêmes paramètres qui conditionnent la mobilité de l'uranium dans les sols, à savoir leur teneur en matière organique et la présence de phosphates, sulfates et carbonates (Laroche, 2004). En plus de la forme physicochimique de l'uranium, l'espèce végétale considérée, son stade de vie et les conditions climatiques peuvent influencer sur cette prise en charge (Ribera et al., 1996).

4.3.2.2 - Les animaux

L'ingestion de particules d'uranium présentes dans les sols ou les organismes végétaux et/ou animaux constitue la voie de contamination majoritaire de la faune terrestre. Elle dépend du mode de vie et du régime alimentaire des organismes (Ribera et al., 1996). Les contaminations par inhalation ou transfert transcutané sont quand à elles plus rares, exception faite des contaminations humaines dans le cadre de l'exploitation du minerai d'uranium (inhalation de poussières) ou de conflits armés impliquant des munitions constituées d'uranium appauvri (blessures).

4.4 - L'uranium dans les écosystèmes aquatiques

4.4.1 - L'uranium dans la colonne d'eau

Au sein du compartiment aquatique, l'uranium est retrouvé aussi bien dans les eaux de surface que dans les eaux profondes (Ribera et al., 1996). Dans les rivières, les concentrations en uranium sont très variables s'étalant de quelques ng/L à 2 mg/L selon les concentrations de l'élément dans les sols environnants (WHO, 2001 ; Denison, 2004). La proximité d'une zone impactée par l'activité humaine (p. ex. exploitation d'une mine) peut influencer sur ces concentrations naturelles et résulter en une élévation localement importante des teneurs en uranium, pouvant aller jusqu'à 10 voire 20 mg/L (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Dans les océans, la teneur moyenne en uranium est relativement faible (de l'ordre de 3,3 µg/L) et ne semble pas avoir beaucoup évolué

au cours des temps géologiques (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). L'apport par les fleuves permet en effet de compenser les pertes par piégeage dans les sédiments ou par incorporation dans les minéraux sous le plancher océanique.

Au sein de la colonne d'eau, l'ion uranyle UO_2^{2+} est l'espèce dominante en milieu oxydant, jusqu'à pH 6. Au-delà apparaissent les formes hydroxylées ($\text{UO}_2(\text{OH})_2$) puis les formes carbonatées ($\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$) (figure 1).

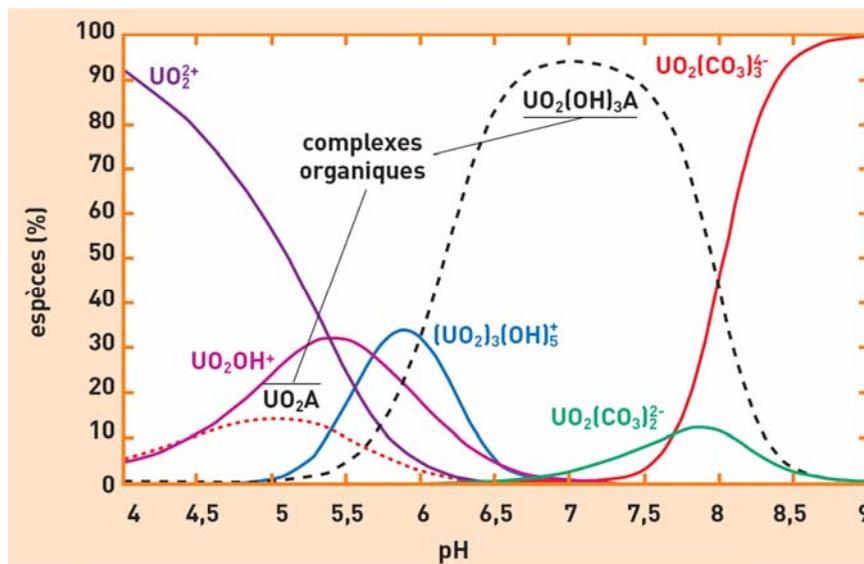


Figure 1. Exemple de la spéciation^① de l'uranium (VI) en milieu environnemental (présence de matières organiques naturelles) (Calmet et al., 2003).

En plus du pH et du potentiel d'oxydoréduction, la spéciation de l'uranium en eau douce est influencée par la présence de ligands organiques. La matière organique dissoute (et notamment les substances humiques représentant jusqu'à 75 % du carbone organique dissous dans les hydrosystèmes fluviaux) favorise la formation de complexes organiques stables de l'ion uranyle et contribue ainsi à sa migration dans les systèmes aquatiques (Colle et al., 2001). Concernant ces échanges avec les particules, la rétention de l'uranium généralement est d'autant plus faible que les conditions sont oxydantes et alcalines (Bird et Evenden, 1996). On note ainsi dans les eaux fortement carbonatées une diminution de l'adsorption de l'uranium sur les particules du fait d'une augmentation de la solubilité de l'élément (complexes uranyles carbonatés dominants). A l'inverse, la présence de phosphates peut entraîner la précipitation des ions uranyles et leur transfert vers le compartiment sédimentaire.

4.4.2 - L'uranium dans les sédiments

Malgré la forte solubilité de l'uranium dans les eaux de surface (Coward et Burnett, 1994), les sédiments accumulent les concentrations les plus élevées et les charges les plus importantes d'uranium dans les écosystèmes dulçaquicoles (Hynes, 1990). Les concentrations en uranium retrouvées dans les sédiments superficiels de milieux impactés par les rejets miniers d'uranium au Canada s'étendent de moins de 100 à plus de 1000 µg/g poids sec (Swanson, 1985 ; McKee et al., 1987 ; Joshi et al., 1989). Au Canada, des concentrations de 5 650 et même jusqu'à 18 000 µg/g poids sec ont même été mesurées dans des sédiments situés en aval de rejets miniers, respectivement au lac Wollaston et au "Port Hope Harbor", (Neame et al., 1982 ; Hart et al., 1986).

Cette faculté des sédiments à fixer de grandes quantités d'uranium confère donc à ce compartiment du biotope un rôle de stockage significatif (Ribera et al., 1996).

4.4.3 - L'uranium dans les organismes

4.4.3.1 - Notion de biodisponibilité

Afin de mieux comprendre les enjeux de la présence de l'uranium au sein des écosystèmes aquatiques, il est important de connaître les notions et concepts régissant l'internalisation de l'uranium dans les organismes. En effet, les mécanismes biogéochimiques mis en jeu lors de l'interaction de l'uranium et d'un organisme sont complexes.

Ainsi, pour qu'un métal présent dans les différents compartiments de l'environnement exerce un effet sur les organismes vivants, il doit être sous une forme chimique ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques. En d'autres termes, il est nécessaire qu'il soit biodisponible¹. Il existe dans la littérature plusieurs définitions de la biodisponibilité. Certains auteurs considèrent qu'un métal est biodisponible s'il est assimilable par les organismes, pour d'autres il faut en plus qu'il soit susceptible d'induire un effet. Ainsi, selon Newman and Jagoe (1994), la biodisponibilité est définie comme la possibilité qu'un contaminant soit assimilé et/ou adsorbé sur un organisme vivant. Tandis que, selon Campbell (1995), un métal n'est considéré comme biodisponible qu'à la condition qu'il soit assimilé par un organisme et puisse entraîner un effet sur celui-ci.

Les métaux sont présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques. Ainsi, dans la phase dissoute de la colonne d'eau, ils peuvent prendre la forme d'ions hydratés, de complexes inorganiques et organiques ou être associés à la fraction colloïdale¹. De même, dans la phase particulaire, les métaux peuvent être liés aux particules de façon plus ou moins forte (depuis l'adsorption faible jusqu'à la liaison).

Comme mentionné précédemment, les proportions de ces différentes formes chimiques dépendent des caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, Eh, présence de matière organique, de cations mais aussi température, dureté¹, etc.). Or, seules certaines formes du métal (ions libres hydratés, certaines espèces inorganiques et organiques) peuvent être assimilables. En d'autres termes, seule une fraction de la quantité totale de métal présent dans le milieu est biodisponible pour un organisme. Par ailleurs, les modes d'assimilation peuvent être différents d'un organisme à l'autre (influence de l'âge, de la taille ou du cycle de reproduction).

Les études de transfert et d'accumulation des métaux par les biocénoses aquatiques ont donc nécessité le développement d'outils permettant de prédire la spéciation de métaux dans le milieu environnant et d'établir un lien entre cette spéciation et la biodisponibilité envers les organismes aquatiques y évoluant (Paquin, 2002). On peut ainsi citer deux modèles de prédiction, le modèle de l'ion libre (ou FIAM pour "*free ion activity model*") (Morel, 1983 ; Campbell, 1995) et le modèle du ligand biologique (ou BLM pour "*biotic ligand model*") (Pagenkopf, 1983).

4.4.3.2 - Le cas de l'uranium

La spéciation chimique de l'uranium, comme nous l'avons vu précédemment, dépend de paramètres relatifs à la qualité de l'eau comme l'alcalinité, la dureté, le pH ou la teneur en matières organiques naturelles. Ceci est conforté par le fait que, quel que soit le niveau d'organisation biologique de l'organisme étudié, animal ou végétal, différents auteurs concluent à une diminution de la toxicité chimique de l'ion uranyle en liaison avec l'augmentation de la dureté (concentration de calcium ou de magnésium), de l'alcalinité (concentration de carbonates) ou de la concentration en matières organiques dissoutes de l'eau (Tarzwell et Henderson, 1960 ; Bywater et al., 1991 ; Hyne et al., 1992 ; Markish et al., 1996 ; Ribera et al., 1996 ; Sheppard et al., 2005). L'explication de cette diminution de toxicité reposerait sur une compétition de l'ion uranyle avec les espèces cationiques présentes dans l'eau (à l'origine d'une diminution de sa biodisponibilité).

4.4.3.3 - Les végétaux

Dans les écosystèmes aquatiques, les cinétiques et niveaux de contamination des producteurs primaires sont deux paramètres importants influençant la contamination des organismes de niveau trophique supérieur. C'est pourquoi leur étude apparaît nécessaire. Néanmoins, il est difficile de déterminer si les végétaux extraient un élément à partir du sédiment et/ou de la fraction dissoute dans la colonne d'eau. Il semblerait cependant que les teneurs en uranium soient généralement plus importantes dans les parties au contact du sédiment que dans celles au contact de l'eau (Ribera et al., 1996). De plus, on considère que quatre paramètres principaux contrôlent l'absorption et la rétention de l'uranium (et des métaux en général) par les macrophytes : la géochimie du sédiment, la physicochimie de l'eau, la physiologie des plantes ainsi que les différences génotypiques entre ces dernières.

4.4.3.4 - Les animaux

Les consommateurs de premier ordre

Les consommateurs de premier ordre établissent le premier maillon des chaînes trophiques. Par leurs modes de vie variés et les stratégies nutritionnelles adaptées aux ressources alimentaires, ils colonisent les divers habitats d'un écosystème (colonne d'eau pour le zooplancton, sédiment de surface pour le macrobenthos constitué d'organismes de type broyeurs, collecteurs ou racleurs).

Chez des mollusques tels que la moule marine *Mytilus edulis*, la captation de l'uranium se fait au niveau des branchies, des palpes labiaux ainsi que du manteau (Chassard-Bouchaud, 1988). Les glandes digestives de même que les gonades sont les sites privilégiés d'accumulation, l'excrétion étant assurée par l'activité rénale (Ribera et al., 1996). Labrot et al., (1996) ont mené une étude portant notamment sur l'évaluation de l'accumulation de l'uranium chez deux espèces consommatrices de premier ordre, le ver *Eisenia fetida* et le bivalve *Corbicula fluminea*. Les concentrations maximales obtenues ont été respectivement d'environ 550 et 27 µg d'U/g de tissus frais. Dans ces travaux, les facteurs de bioconcentration^① observés sont inférieurs à 1, dénotant l'absence de processus de bioconcentration. Néanmoins, étant donné les concentrations en uranium utilisées (2 µg/cm² de sédiment pour l'annélide mais surtout 93,5 mg/L pour le bivalve), on peut raisonnablement se poser la question de la perspicacité environnementale de cette conclusion.

Derniers niveaux trophiques intégrateurs : les poissons

L'entrée d'uranium chez les poissons s'effectue principalement par la voie branchiale, concomitamment au processus de respiration/osmorégulation, et par ingestion de nourriture. Aucune publication ne permet de quantifier la contribution respective de chacune de ces deux voies (Waite et al., 1988). Néanmoins, il est important de noter que l'uranium est généralement caractérisé par un très faible taux d'assimilation lors de la digestion (< 5 %) (Environnement Canada, 2003). La contamination par ingestion ne pourra donc se révéler importante que pour des organismes dont le comportement alimentaire les expose à des niveaux d'uranium élevés.

Ainsi, compte tenu du fait que les sédiments accumulent les concentrations les plus élevées et les charges les plus importantes d'uranium dans les écosystèmes dulçaquicoles (Hynes, 1990), l'ingestion de sédiment et de nourriture contaminés représente une voie de contamination à l'uranium importante pour les poissons évoluant dans des milieux impactés par l'uranium (Kovalsky et al., 1967 ; Emery et al., 1981, Swanson, 1982, 1983 et 1985). Les espèces de poissons benthiques se nourrissant d'organismes benthiques et évoluant à la surface des sédiments sont donc celles qui sont le plus susceptibles d'accumuler de larges quantités d'uranium au contraire des espèces pélagiques (Kovalsky et al., 1967 ; Emery et al., 1981 ; Swanson, 1982, 1983 et 1985 ; Ribera et al., 1996). Justyn et al. (1985) mentionnent ainsi le fait que les espèces de poissons caractérisées par un comportement pélagique accumulent environ 10 fois moins que des espèces de fond.

Concernant le transfert de l'uranium dans les chaînes trophiques aquatiques, on considère ainsi qu'à chaque fois que l'on s'élève d'un niveau trophique on assiste à une diminution d'un ordre de grandeur du facteur de concentration (Mahon, 1982 ; Poston, 1982, Swanson, 1982 ; ATSDR, 1990, Ribera, 1996). Parallèlement à cette diminution du facteur de concentration, une diminution du facteur de transfert trophique^① est également observée (Colle et al., 2001).

Les informations relatives à l'accumulation et à la distribution d'uranium au sein des poissons dulçaquicoles sont rares. Les seules données disponibles sont généralement issues d'un nombre limité d'études sur des poissons sauvages. Ces études semblent indiquer que les sites majeurs d'accumulation de l'uranium sont les os, le tractus gastro-intestinal, les reins et le foie (Swanson, 1985 ; Waite et al., 1988). Peu d'informations sont disponibles quant à l'accumulation d'uranium dans des conditions contrôlées en laboratoire, à l'exception de quelques rares mesures

de concentrations dans des organismes entiers exposés à l'uranium par la voie directe⁹. La première d'entre elles (Poston, 1982), menée sur la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), a conclu à une accumulation comprise entre 0,17 et 11,72 ng d'U/g poids sec (pour une exposition de 35 j à 0,078 µg d'²³²U/L) et entre 1,83 et 5,32 µg d'U/g poids sec (pour une exposition de 35 j à 0,963 mg d'²³⁸U/L). Ces données permettent donc d'obtenir des facteurs de bioconcentration compris entre 2,2 et 150 dans le premier cas et entre 1,9 et 5,5 dans le second. Les travaux de Parkhurst et al. (1984), ont quant à eux montré que, chez une espèce de salmonidé (*Salvelinus fontinalis*), les facteurs de bioconcentration de l'uranium sont de l'ordre de 1,9 à 4,3 pour une exposition de 60 j à une eau naturellement contaminée en uranium à hauteur de 4 mg/L (calculs effectués sur la base du poids frais des tissus). Quant à l'étude de Labrot et al. (1999), ce travail est à ce jour le seul mené sur *Danio rerio* utilisant l'uranium comme contaminant. Les auteurs mentionnent le fait que, pour une exposition de 60 j à 150 µg d'U/L, la concentration tissulaire de l'uranium est d'environ 1 µg d'U/g poids frais (correspondant ainsi à un facteur de bioconcentration de 6,7). Du fait de la grande variabilité de ces résultats, une étude plus poussée de l'accumulation de l'uranium est nécessaire afin d'estimer la biodisponibilité de l'uranium chez le poisson.

5 - ÉLÉMENTS DE TOXICOLOGIE

Malgré son omniprésence dans l'environnement, l'uranium est considéré comme un élément non essentiel car n'ayant aucune fonction métabolique ou physiologique connue (WHO, 2004). L'uranium occupe de plus une place très particulière parmi les actinides. Ses caractéristiques chimiques de métal lourd en font un composé chimiotoxique. De plus, de part les caractéristiques radioactives de ses isotopes, il est considéré comme un composé potentiellement radiotoxique.

Le problème de sa toxicité s'est posé très tôt, quelques décennies après sa découverte. Ainsi, c'est pour protéger les mineurs que, dès 1826, le chimiste allemand L. Gmelin réalisa les premières études sur l'urane, nom donné autrefois à l'oxyde d'uranium (Hodge et al., 1973). A ce jour, ces études n'ont pas cessé et sont à l'origine de nombreux documents de référence (Galle, 1997 ; ATSDR, 1999 ; WHO, 2001 ; Priest, 2001 ; Hengé-Napoli et al., 2001 ; Sztajnkrzyer et Otten, 2004 ; Patocka et al., 2004), démontrant la complexité des mécanismes toxicologiques mis en jeu. De plus, les débats relatifs à l'utilisation de l'uranium appauvri à des fins militaires ont notablement contribué à l'intérêt des scientifiques envers cet élément, multipliant ainsi les études

sanitaires menées sur des soldats ayant participé à des guerres telles que la Guerre du Golfe (Sapolsky, 1998 ; McDiarmid et al., 2001b et 2004) ou la Guerre des Balkans (Nuccetelli et al., 2005). La majeure partie des données de la littérature sont donc issues d'études menées sur l'Homme ou les mammifères. Seul un faible nombre de publications fait état de l'impact toxicologique de l'uranium sur les divers compartiments environnementaux. Ainsi, en dehors de quelques études rapportant les domaines de concentrations létales dans le cas d'expositions aiguës à l'uranium, peu de travaux concernent l'exposition d'organismes aquatiques à l'uranium dans des conditions sublétales (Labrot et al., 1996 ; Cooley et al., 2000 ; Sheppard et al., 2005).

Ce paragraphe "Elément de toxicologie" s'attachera tout d'abord à présenter les données toxicocinétiques de l'interaction de l'uranium avec les organismes vivants. Les données relatives à l'entrée, au transport, à la distribution tissulaire de l'uranium dans les organismes ainsi qu'à son excrétion seront ainsi successivement abordées. Nous nous intéresserons ensuite aux données de toxicité aiguë de l'uranium. Nous mentionnerons alors quelques valeurs de référence chez l'Homme avant de nous attarder plus particulièrement aux données relatives aux biocénoses aquatiques. A la suite de cela, ce chapitre décrira différents aspects de la toxicité de l'uranium dans des situations d'exposition chronique. Seront alors abordés les aspects de sa toxicité chimique et radiologique, depuis les interactions possibles entre l'uranium et divers types de biomolécules, les conséquences cellulaires de ces interactions, jusqu'aux effets observés à l'échelle des différents organes et tissus impliqués dans les grandes fonctions biologiques et physiologiques du vivant (respiration, digestion, excrétion, reproduction, etc.).

Comme évoqué précédemment, les données de toxicologie relatives aux poissons sont rares dans le cas de l'uranium. L'essentiel des informations disponibles concernent les mammifères. Néanmoins, il est important de mentionner le fait que, quand des données relatives aux poissons sont disponibles, elles sont généralement le reflet de mécanismes similaires à ceux observés chez les mammifères. Ceci nous porte donc à croire qu'une synthèse bibliographique intégrant les données relatives aux mammifères peut constituer une base de connaissances utile à l'étude des effets chez les poissons. C'est pourquoi une partie non négligeable de ce travail bibliographique s'appuiera sur des données de toxicologie des mammifères.

Il est généralement admis que les phénomènes biologiques observés jusqu'à l'échelle cellulaire revêtent un caractère quasi universel, ce qui n'est plus vrai quand on s'intéresse à des niveaux d'organisation biologique supérieurs. Les mécanismes toxiques mis en jeu aux échelles moléculaires, subcellulaires et cellulaires peuvent donc être considérés comme communs aux mammifères et aux vertébrés inférieurs que sont les poissons. C'est pourquoi ces mécanismes seront abordés simultanément.

Les effets observés à l'échelle macroscopique (au niveau des différents tissus et organes), seront quant à eux abordés séparément. Aux données de toxicologie sur mammifères (Homme et rongeurs pour l'essentiel) feront donc suite les données relatives aux organismes aquatiques quand celles-ci seront disponibles (alors indiquées par une signalétique particulière : )

5.1 - Toxicocinétique

L'absorption, la distribution et la rétention ou l'excrétion de l'uranium sont conditionnées par différents paramètres et peuvent influencer sur le comportement toxique de l'uranium au sein des organismes. Nous verrons donc dans un premier temps les différents paramètres pouvant influencer sur le comportement *in vivo* de l'uranium, de même que sur sa toxicité.

5.1.1 - Entrée dans l'organisme

Le premier facteur qui détermine la distribution de l'uranium dans les tissus est la solubilité (Hengé-Napoli et al., 2001). En effet, la forme physico-chimique de l'uranium a une influence sur la cinétique avec laquelle il atteint ses organes cibles. Ainsi, un complexe aisément dissociable, pénétrant dans l'organisme, comme par exemple le nitrate d'uranyle, libère des ions UO_2^{2+} et diffuse très rapidement dans le plasma et les liquides extracellulaires pour ensuite se retrouver distribué dans l'ensemble de l'organisme. A l'inverse, un composé très peu soluble, tel que UO_2 par exemple, pénétrant par les mêmes voies passe très lentement dans le compartiment sanguin. On peut donc en déduire que la solubilité conditionne la toxicité de l'uranium, les formes solubles induisant plutôt une toxicité systémiqueⁱ et les formes insolubles favorisant une toxicité localisée au niveau du lieu de dépôt (notamment les appareils pulmonaires ou branchiaux).

5.1.2 - Transport dans le sang

Quelles que soient la voie d'entrée et la forme chimique initiale, l'uranium est finalement solubilisé et pénètre dans le flux sanguin (Hengé-Napoli et al., 2001). Une étude menée sur différents vertébrés (poisson, amphibien et Homme) ayant pour but d'estimer la concentration en uranium du compartiment sanguin, a ainsi permis de définir une gamme de concentrations basales allant de 0,20 à 0,94 $\mu\text{g U/L}$ de sang (Das et al, 1986). Ces valeurs ont été constatées chez des organismes "témoins", du fait d'une exposition naturelle à l'uranium.



Dans le cas du poisson (*Ophiocephalus punctatus*), cette gamme est comprise entre 0,50 et 0,94 $\mu\text{g U/L}$. Chez l'Homme, les concentrations sont légèrement inférieures, de 0,33 à 0,74 $\mu\text{g U/L}$.

Au sein du flux sanguin, l'uranium se trouve sous la forme chimique la plus stable en solution, l'ion uranyle UO_2^{2+} (Ervanne, 2004). Cependant, la grande réactivité de l'uranyle avec les oxyanions (bicarbonates HCO_3^- , carboxylates RCOO^- , phosphoryles PO_3^{2-} , etc.) fait qu'il n'existe presque pas sous forme libre en milieu biologique (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Il se complexe dans le sang à trois catégories de ligands. Environ 60 % de l'uranyle présent dans le sang se complexent avec des ligands de faible poids moléculaire, citrates et hydrogénocarbonates (HCO_3^-) (Galle, 1997). En effet, les données de la littérature montrent que l'ion uranyle, en présence des ions HCO_3^- du plasma sanguin, circule dans l'organisme principalement sous forme de complexes tricarbonatés $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ et surtout bicarbonatés $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ (les études de spéciation ayant montré que, dans la zone de pH physiologique (7,4), la forme bicarbonatée est favorisée). Ces complexes sont filtrables au niveau du glomérule rénal. Les 40 % des ions uranyles restants sont complexés à des protéines, notamment avec des protéines de transport du fer : les transferrines, mais également avec l'albumine ou les lipoprotéines situées en surface des globules rouges (Vidaud et al., 2005). Ces complexes uranium-protéine ne sont cependant pas très stables et se dissocient au profit des complexes formés avec les carbonates au fur et à mesure que ces derniers sont éliminés du compartiment plasmatique (l'uranium ultrafiltrable étant soit capté par le tissu osseux, soit filtré au niveau du glomérule rénal).

5.1.3 - Distribution tissulaire

Chez les mammifères, quelques jours après incorporation d'uranium dans le sang, la plupart de la charge systémique se retrouve principalement à la surface des os et au niveau du cortex rénal (Kathren et Moore, 1986 ; La Touche et al., 1987 ; Kathren et al., 1989 ; Kurttio et al., 2002 ; Kurttio et al., 2005) et une partie beaucoup plus faible dans le foie et les tissus mous¹. Cette répartition est également observée à l'état naturel, c'est à dire sans qu'il n'y ait eu d'épisode contaminant chez un individu. Ainsi, un organisme humain adulte contient en moyenne 40 à 90 µg d'uranium pondéral à raison de 66 % dans le squelette, 16 % dans le foie, 8 % dans les reins et 10 % dans les autres tissus mous (Fissenne, 1988 ; WHO, 2001).



Chez les poissons, les sites principaux d'accumulation de l'uranium sont les tissus minéralisés (os et écailles), les intestins, le foie, les reins et, pour des concentrations en uranium importantes, les gonades (Poston, 1982 ; Mahon, 1982 ; Swanson, 1985 ; Waite et al, 1990 ; Ribera et al., 1996 ; Labrot et al., 1996 ; Clulow et al, 1998 ; Cooley et Klaverkamp, 2000). Ainsi, Cooley et Klaverkamp (2000) se sont notamment attachés à évaluer les relations entre l'ingestion d'uranium et son accumulation, de même que sa distribution dans les différents tissus d'une espèce de poisson dulçaquicole, le corégone (*Coregonus clupeaformis*) en conditions contrôlées. Les concentrations en uranium les plus importantes ont été retrouvées dans les intestins, les tissus minéralisés (os et écailles), les reins et, à un degré moindre, dans le foie et les gonades des corégones. Cette distribution relative de l'uranium confirment les observations faites sur des poissons issus de milieux impactés par l'uranium, soit du fait d'activités anthropiques (Swanson, 1985 ; Waite et al., 1988), soit de manière naturelle (Kovalsy et al., 1967).

5.1.3.1 - Fixation osseuse

Chez les mammifères, le squelette représente l'organe majeur de fixation à long terme de l'uranium (Rowland et Franham, 1969 ; Priest et al., 1982 ; Wrenn et al., 1985). Le comportement de l'uranium dans le squelette est relativement similaire à celui des alcalino-terreux (tels que le calcium ou le magnésium). L'ion UO_2^{2+} s'échange à la surface de l'os avec l'ion Ca^{2+} dans les cristaux d'hydroxyapatite (Hamilton, 1971) et se dépose plus particulièrement à proximité des zones vascularisées et dans les aires de croissance. A la suite des remaniements osseux intervenant de façon naturelle au cours de la vie, une partie de l'uranium est ensuite internalisée au sein du

volume osseux (Leggett, 1994 ; Dewitt et al., 2001). Ainsi, selon le modèle de la CIPR, la période d'élimination chez l'Homme de l'uranium sur les surfaces osseuses est de 5 j : 50 % de cette quantité retournent vers le plasma et 50 % vont dans le compartiment du volume osseux. La période d'élimination de ce volume osseux est quant à elle de 30 j : 75 % de la quantité retournent à la surface osseuse (pour être à nouveau relargués soit dans le plasma sanguin soit dans le volume osseux) et 25 % sont fixés dans une zone osseuse non échangeable.



Expérimentalement, de fortes concentrations en uranium ont également été retrouvées dans les tissus hautement minéralisés (os et les écailles) chez le corégone (*Coregonus clupeaformis*) exposé par voie alimentaire à l'uranium (Cooley et Klaverkamp, 2000). Ces résultats indiquent que les concentrations en uranium d'écailles de poissons peuvent renseigner sur le niveau d'exposition environnementale et de biodisponibilité de l'uranium. L'affinité de l'uranium envers le tissu osseux a été démontrée chez différentes espèces de poissons sauvages (*Catostomus commersoni*, *Salvelinus namaycush*, *Salmo trutta* et *Salmo alpinus*) sur des individus issus de milieux contaminés en uranium par des rejets miniers (Swanson, 1982, 1983 et 1985 ; Pettersson et al., 1988 ; Waite et al., 1988 ; Bernstein et Swanson, 1989) ou issus de milieux naturellement riches en uranium (Kovalsky et al., 1967 ; Mahon, 1982).



A l'origine de cette similitude, il est important de rappeler que les os et les écailles partagent des similarités structurelles fondamentales. Ces deux types tissulaires contiennent une matrice de collagène et un treillis minéralisé cristallin composé de la même unité constitutive fondamentale : l'hydroxyapatite, tout comme chez les mammifères. Très tôt, des recherches sur l'accumulation de l'uranium chez des poissons dulçaquicoles ont révélé que l'uranium, sous la forme d'ion uranyle, prend la place du calcium au niveau du treillis cristallin d'hydroxyapatite, agissant ainsi comme un antagoniste du calcium par un mécanisme tout à fait comparable à celui observé au niveau du squelette des mammifères (Kovalsky et al., 1967).



Le mécanisme d'accumulation des métaux au niveau des écailles de poisson peut impliquer la dissociation de complexes entre ces métaux et des ligands biotiques. Cette dissociation pourrait être la conséquence d'une légère chute de pH généralement rencontrée dans les régions de calcification active. Ce mécanisme, suggéré pour le zinc (Sauer et Watabe, 1984), semble également plausible pour l'uranium puisque les ions carbonates sont les ligands principaux de

l'uranium dans la circulation sanguine et que les complexes uranium-carbonate deviennent hautement instables pour des pH décroissants (Stevens et al., 1980). De plus, le plomb et le strontium, qui se comportent comme l'uranium dans les os de mammifères (Leggett, 1994), se déposent dans les régions minéralisées des écailles de poisson (Sauer et Watabe, 1984 et 1989).

5.1.3.2 - Fixation rénale

Chez les mammifères et en particulier chez l'Homme, le rein est l'un des sites principaux d'accumulation de l'uranium et constitue la cible majeure des effets chimiotoxiques de ce radionucléide (Voegtlin et Hodge, 1949, 1953 ; Jones, 1966 ; Leach et al., 1970 et 1973 ; Wrenn et al., 1985 ; Singh et al., 1987 ; Leggett, 1989 ; Tracy et al., 1992 ; ATSDR, 1999 ; WHO, 2001 ; Chen et al., 2004 ; Squibb et al., 2005). Le mécanisme d'accumulation de l'uranium chez les mammifères implique une ultrafiltration, au travers du glomérule, des complexes formés dans le compartiment sanguin entre l'uranium et des composés de faible poids moléculaire (hydrogénocarbonates ou citrates). Ces complexes sont ensuite dissociés au contact de l'environnement acide régnant dans la lumière des tubules proximaux. La majorité de l'uranium va alors être excrétée dans les urines. Le reste, 20 à 30 % de la quantité initiale dans le sang, va quant à lui se lier aux cellules épithéliales de la bordure en brosse des tubules proximaux et s'y fixer à long terme (Dounce, 1949).



Bien que le mécanisme d'accumulation de l'uranium dans les reins de poissons n'ait pas été investigué, certains auteurs suggèrent qu'il pourrait être comparable au mécanisme identifié chez les mammifères (Cooley et Klaverkamp, 2000).

5.1.3.3 - Fixation au système respiratoire

Chez les mammifères, ce sont les composés insolubles qui posent le plus problème au niveau des poumons. En effet, ces composés vont être caractérisés par un temps de résidence notablement plus important au niveau du tissu pulmonaire que les composés solubles qui vont quant à eux être transloqués très rapidement dans le compartiment sanguin. Cette persistance de l'uranium au contact des poumons va alors pouvoir être à l'origine d'effets toxiques (Leach et al., 1973).



Chez les poissons, même si l'appareil branchial ne semble pas constituer pas un site majeur d'accumulation de l'uranium, il est cependant intéressant de noter que les modalités d'accumulation de l'uranium dans les filaments branchiaux peuvent être influencées par le stade de

maturation sexuelle. En effet, une accumulation accrue d'uranium dans les branchies de corégonos exposés à l'uranium a été observée par [Cooley et Klaverkamp \(2000\)](#) durant les périodes de maturation sexuelle. Selon ces auteurs, cette accumulation accrue serait la conséquence de besoins métaboliques plus élevés (augmentation des besoins en oxygène ou encore en calcium) du fait du développement gonadique. Une accumulation importante d'uranium a également été montrée au niveau de l'appareil branchial de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) juvéniles exposées par voie directe à ce radioélément ([Buet et al., 2005](#)). Cette forte accumulation pourrait ainsi être corrélée à une demande métabolique accrue, souvent observée lors des phases de croissance des organismes, suggérant ainsi l'influence du stade de développement des organismes dans les processus d'internalisation.

5.1.3.4 - Fixation hépatique

Chez les mammifères, la rétention au niveau du foie est beaucoup plus faible que dans le squelette ou les reins. La quantité d'uranium retenue dans le foie après un épisode de contamination est comprise entre 1 et 2 %, dont une grande partie est éliminée dans les premières semaines, et environ 0,1 % est retenu à plus long terme ([Hengé-Napoli et al., 2001](#)). Ces données sont issues d'études exclusivement menées sur l'Homme.



Aucune donnée de cette fixation hépatique n'est disponible à ce jour sur poisson.

5.1.3.5 - Fixation au tractus gastro-intestinal

Chez les mammifères, peu de données sont disponibles, l'ingestion de particules d'uranium n'étant pas une voie de contamination très significative.



Chez les poissons, l'étude de [Cooley et Klaverkamp \(2000\)](#) a permis de montrer que l'uranium peut être absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal à la suite d'une exposition trophique. Cette faculté a également été montrée pour d'autres métaux ([Harrison et al. ; 1990 ; Haines et Brumbaugh, 1994 ; Handy, 1996 ; Farag et al., 1995 ; Pelletier et Audet, 1995](#)). Des concentrations plus élevées dans les tissus intestinaux que dans les branchies peuvent d'ailleurs être révélatrices d'une contamination par voie trophique[?] ([Dallinger et al., 1987](#)). C'est le cas dans l'étude de [Cooley et Klaverkamp \(2000\)](#) dans laquelle les poissons présentent des concentrations en uranium élevées au niveau du tractus gastro-intestinal mais faibles au niveau du tissu branchial.

5.1.3.6 - Atteinte du tissu cérébral

Chez les mammifères, mais également chez les vertébrés inférieurs que sont les poissons, il existe une barrière anatomique qui filtre et contrôle le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement du sang au liquide céphalo-rachidien. Cette barrière (dite hémato-encéphalique) isole ainsi le système nerveux central du reste de l'organisme et lui permet d'avoir un milieu spécifique, différent du milieu intérieur du reste de l'organisme. La localisation histologique exacte de la barrière n'est pas connue avec précision, mais un consensus semble se former pour la situer au niveau de l'endothélium vasculaire. Des jonctions serrées entre les cellules endothéliales empêcheraient tout transfert de molécules entre les cellules, obligeant celles-ci à utiliser les canaux et les pompes disponibles sur la cellule.

Or, chez des rats ayant reçu des implants sous-cutanés d'uranium appauvri (destinés à simuler une blessure), il a été montré que l'uranium peut franchir cette barrière hématoméningée ([Lemercier et al., 2003](#)). Il a de surcroît été montré que l'uranium était capable de s'accumuler de façon hétérogène dans le cerveau et le cervelet ([Pellmar et al., 1999a](#) ; [Lestaevel et al., 2005](#)).



Aucune donnée relative à cette atteinte du tissu cérébral chez le poisson n'est actuellement disponible.

5.1.3.7 - Atteinte des tissus impliqués dans la reproduction

Tout comme pour le cas du cerveau, dans le testicule, on considère que les cellules proches de la lumière du tubule séminifère sont protégées des agressions toxiques, chimiques ou radioactives par la barrière hémato-testiculaire (BHT). Cependant, des études récentes chez les rongeurs suggèrent un franchissement possible de la BHT par certains radionucléides grâce à la voie physiologique fer-transferrine ([Calmet et al., 2003](#)). Ces derniers pourraient alors se lier aux cellules germinales^① méiotiques et post-méiotiques. Les conclusions de ces études sont corroborées par les travaux de [Pellmar et al \(1999a\)](#) selon lesquels des taux significatifs d'uranium ont été retrouvés dans les testicules de rats implantés avec des fragments d'uranium appauvri. Des récepteurs à la transferrine étant exprimés par les cellules germinales de l'épithélium séminifère, un mécanisme analogue peut être envisagé chez l'Homme, expliquant la présence d'uranium dans le sperme de militaires blessés par des fragments d'uranium ([McDiarmid et al., 2000](#)).



Chez les poissons, plusieurs explications de l'accumulation de l'uranium dans les gonades sont possibles. L'importance de l'accumulation semble liée à la maturation gonadique (Cooley et Klaverkamp, 2000), l'accumulation dans les organes génitaux étant potentiellement plus importante durant la phase de maturation sexuelle. Chez les femelles, l'uranium est sans doute transporté vers les ovaires pour y être accumulé par liaison à la vitellogénine, comme décrit pour d'autres métaux (Ghosh et Thomas, 1995). Il n'est pas à exclure que l'uranium puisse être transféré aux œufs. Le mécanisme d'accumulation dans les testicules est moins clair et nécessite de plus amples recherches afin d'être mis à jour. Néanmoins, les testicules semblent accumuler des concentrations plus importantes d'uranium ($194 \pm 50 \mu\text{g/g}$ poids frais) que les ovaires ($17,8 \pm 3,4 \mu\text{g/g}$ poids frais). Cette différence observée entre les sexes pourrait être due à un effet de "dilution tissulaire", le volume des ovaires étant beaucoup plus important que celui des testicules alors que les charges tissulaires totales sont équivalentes (Cooley et Klaverkamp, 2000).

5.1.4 - Excrétion

L'uranium présent au sein du compartiment sanguin est d'abord filtré au niveau des glomérules, arrive au niveau de la lumière des tubules rénaux où il s'accumule avant d'être éliminé dans les canaux collecteurs de l'urine. Chez l'Homme, l'excrétion urinaire représente 60 à 86 % de la quantité d'uranium incorporée par l'organisme (Galletti et al., 2003). Ceci représente la valeur de l'épuration plasmatique en ion uranyle, quelle que soit la voie d'entrée ou la forme chimique initiale de l'uranium. Cependant, il n'est pas rare de retrouver, très longtemps après une exposition, des quantités non négligeables d'uranium dans les urines du fait du "relargage" osseux (Orloff et al., 2004). La mesure de l'uranium présent dans les urines est ainsi largement pratiquée dans le cadre de suivis de contaminations chez l'Homme (Ejnik et al., 2000 ; Gwiazda et al., 2004 ; McDiarmid et al., 2001a et 2004b).

L'excrétion fécale de l'uranium est quant à elle négligeable et ne représente que 1 à 2 % de la quantité totale absorbée (Hodge, 1973; Spencer et al., 1990).



Une étude menée sur le corégone (Cooley et al., 2000) laisse suggérer que l'excrétion biliaire d'uranium représente une voie non négligeable d'élimination de cet élément chez des organismes exposés par voie trophique. En effet, la survenue de lésions histopathologiques au niveau du foie et de la vésicule biliaire semble soutenir cette hypothèse. Ceci est d'ailleurs en

accord avec le rôle prédominant de la bile dans l'excrétion d'autres métaux administrés par voie alimentaire chez le poisson (Weisbart, 1973 ; Lanno et al., 1987 ; Handy, 1996).

5.2 - Toxicité aigüe

5.2.1 - Quelques valeurs de référence chez l'Homme

Chez les mammifères, plusieurs études ont porté sur l'évaluation de la toxicité aigüe de l'uranium (survenue de dommages biologiques graves, souvent létaux, à la suite d'expositions de courte durée impliquant des concentrations importantes). Ribera et al. (1996) ont réuni quelques uns de ces travaux au sein d'un article de synthèse sur la toxicité de l'uranium. Ces auteurs font référence à des études portant sur différentes espèces (chat, chien, lapin, cochon, souris, rat, homme) exposés à l'uranium par le biais de différents modes d'administration (injections uniques ou multiples, gavages, inhalations). Par injection, les doses létales couvrent 2 ordres de grandeur, de 0,1 à 25 mg d'U/kg. Ces valeurs sont comparables à celles observées lors d'expositions par inhalation à l'uranium, s'étendant de 2 à 50 mg d'U/kg. Les cas de contamination par la nourriture semblent quant à eux induire une mortalité à des doses beaucoup plus élevées, comprises entre 1,4 et 60 g d'U/kg.

5.2.2 - Les organismes aquatiques

5.2.2.1 - Les organismes benthiques

Les contaminants liés aux sédiments peuvent avoir des effets nocifs sur les macroinvertébrés benthiques et les poissons qui s'alimentent d'invertébrés contaminés. Il existe peu de données sur la toxicité aigüe de l'uranium vis-à-vis des organismes benthiques. Les rares études menées dans ce domaine concernent des invertébrés (mollusques bivalves, crustacés amphipodes, larves d'insectes, etc.).

Le rapport d'Environnement Canada (2003) évoque une étude menée sur des adultes et des juvéniles de *Hyalella azteca* exposés pendant 14 j à des sédiments contaminés par de l'uranium. Cette étude a permis de calculer une CL₂₀ de 15 mg U/kg de sédiments (poids sec) et une CL₅₀[?] de 57 mg U/kg de sédiments (poids sec) pour les juvéniles tandis que la CL₅₀ et la CL₂₀ étaient

respectivement de 436 et de 116 mg U/kg pour les adultes. Les amphipodes juvéniles se sont donc avérés beaucoup plus sensibles à l'uranium que les adultes.

Par comparaison, des essais de toxicité de sédiments contaminés à l'uranium d'une durée de 10 j ont permis d'obtenir une CL_{50} et une CL_{25} pour *Chironomus tentans* de respectivement 10,5 et 4,8 g U/kg (poids sec). Au cours de la même étude, des effets sur la croissance ont été notés à des CE_{50} et CE_{25} de respectivement 2,7 et 1,4 g U/kg (Environnement Canada, 2003).

5.2.2.2 - Les organismes pélagiques

Pour ce qui concerne les espèces évoluant au sein de la colonne d'eau, le nombre d'études s'élargit considérablement. Les différents travaux portent notamment sur des modèles d'invertébrés (principalement les daphnies) et de vertébrés (poissons).

Cas des organismes zooplanctoniques

Parmi les études répertoriées dans l'article de synthèse de Sheppard et al. (2005) faisant notamment état de la toxicité de l'uranium vis-à-vis des invertébrés d'eau douce, les valeurs de toxicité déterminées dans l'étude de Pickett et al. (1993) seraient les plus drastiques. Ainsi, ces auteurs dégagent de leurs travaux menés sur *Ceriodaphnia dubia* une valeur de CE_{25} à 7 j égale à 3 µg/L d'uranium. Cette valeur est en effet la plus basse parmi celles inventoriées par Sheppard et al. si l'on considère l'ensemble des données relatives aux invertébrés dulçaquicoles. De manière générale, les autres études menées sur des cladocères donnent des valeurs de CE_{25} comprises entre 15 et 900 µg/L (Poston et al., 1984 ; Hyne et al., 1993 ; Barata et al., 1999 ; Semaan et al., 2001).

En termes de létalité, une étude de Trapp (1986) menée en eau douce chez *Daphnia pulex* mentionne une CL_{50} à 48 h de 220 µg/L et une CL_{50} à 96h de 150 µg/L. Bywater et al. (1991) ont quant à eux signalé des CL_{50} à 24 h allant de 0,14 à 0,9 mg/L pour quatre espèces de cladocères dans une eau de faibles dureté et alcalinité.

Plus récemment, Liber et George (2000 - citée par Environnement Canada, 2003) ont étudié la toxicité de l'uranium pour *Ceriodaphnia dubia* dans l'eau d'un ruisseau dont la dureté naturelle est d'environ 27 mg/L de $CaCO_3$ et le pH de 7,3. Dans cette eau, la CL_{50} à 48 h de *C. dubia* était de 430 µg U/L. Au cours d'essais de toxicité chronique¹ de 7 j sur l'eau du ruisseau ajustée à une dureté de 60 mg/L de $CaCO_3$, une concentration seuil avec effet sur la reproduction de 19 ± 2 µg

U/L a été obtenue. Après ajustement de l'eau d'exposition à une dureté de 120 mg/L de CaCO₃, ces valeurs de toxicité ont été notablement réduites, la concentration seuil avec effet sur la reproduction étant alors de 218 µg U/L.

Cette variabilité des résultats obtenus en fonction des qualités d'eau d'exposition rappellent donc que les concentrations élevées de calcium ou de magnésium peuvent influencer sur la toxicité de l'uranium et doivent donc être pris en compte dans l'interprétation des données toxicologiques.

Cas des poissons



L'état des connaissances actuelles sur la toxicologie aigüe de l'uranium chez les poissons repose sur de nombreuses études (Tarzwell et Henderson, 1960 ; Davies, 1980 ; Parkhurst et al., 1984 ; Vinot et Larpent, 1984 ; Bywater et al., 1991 ; Holdway, 1992 ; Hamilton, 1995 ; Buhl et Hamilton, 1996 ; Labrot, 1996 ; Hamilton et Buhl, 1997 ; Sheppard et al., 2005). Les CL₅₀ à 96 h varient de 0,7 mg d'U/L (Bywater et al., 1991) à 135 mg d'U/L (Tarzwell et Henderson, 1960) en fonction de facteurs biotiques (espèce, stade de maturité) et abiotiques (température, dureté, pH).



Comme pour les invertébrés, la toxicité de l'uranium chez les poissons semble fortement dépendante de la dureté de l'eau d'exposition. Tarzwell et Henderson (1960) ont rapporté des CL₅₀ à 96 h chez le cyprinidé *Pimephales promelas* variant de 2,8 mg/L (pour une eau caractérisée par une faible dureté : 20 mg/L) à 135 mg/L (pour une eau très dure : 400 mg/L). Bywater et al. (1991) ont quant à eux constaté des CL₅₀ à 96 h variant de 0,73 à 3,46 mg d'U/L chez six espèces de poissons tropicaux (*Melanotaenia nigrans*, *Melanotaenia splendida inornata*, *Craterocephalus marianae*, *Pseudomugil tenellus*, *Ambassis macleayi* et *Mogurnda mogurnda*). Cette étude a impliqué deux stades de vie différents (7 et 90 j post-éclosion) et a été réalisée dans une eau très douce (dureté : 4 mg/L). Holdway (1992) a observé des résultats comparables chez *Melanotaenia splendida inornata* et *Mogurnda mogurnda*, les CL₅₀ à 96 h variant de 1,39 à 3,29 mg d'U/L, pour une eau également très douce (3,2 mg/L). Parkhurst et al. (1984) ont quant à eux trouvé une CL₅₀ à 96 h chez un salmonidé (*Salvelinus fontinalis*) de 5,5 mg d'U/L dans une eau douce (dureté : 35 mg/L) mais de 23 mg d'U/L dans une eau dure (dureté : 208 mg/L). L'étude de Hamilton (1995) a quant à elle permis d'obtenir une CL₅₀ à 96 h de 46 mg/L commune à trois espèces de poisson (*Ptychocheilus lucius*, *Xyrauchen texanus* et *Gila elegans*) et pour trois stades de vie différents et

une eau dure (dureté : 110 mg/L). Une étude plus récente de [Labrot et al. \(1996\)](#) impliquant le *Danio rerio*, donne une valeur de CL₅₀ à 96 h de 3,02 mg d'acétate d'uranyle/L (pour une eau caractérisée par une dureté de 178 mg/L).



Cette influence de la dureté des eaux d'exposition sur les données de toxicité aigüe de l'uranium chez les poissons a notamment été résumée dans l'article de [Sheppard et al. \(2005\)](#). Une corrélation entre le critère de létalité et le paramètre de dureté (mg/L de CaCO₃) a ainsi été établie sur la base de la fonction mathématique suivante : $CL_{10} = -0,52 + 0,96 \times \log_{10}(\text{dureté})$.



Ces données de toxicité aigüe permettent souvent de classer les contaminants les uns par rapports aux autres. Selon différentes classifications et notamment celle de [Passino et Smith \(1987\)](#) qui vise à ranger les valeurs de CL₅₀ à 96 h en mg/L, on observe quatre niveaux de toxicité : extrêmement toxique de 0,01 à 0,1 ; hautement toxique de 0,1 à 1 ; modérément toxique de 1 à 10 et quasiment non toxique de 10 à 100). L'uranium, du point de vue de sa toxicité aigüe est donc considéré comme un élément modérément toxique chez les poissons.

5.3 - Toxicité chimique

Du fait de ses caractéristiques chimiques de métal lourd, l'uranium doit être considéré, en termes de toxicologie, comme les autres éléments de cette catégorie. Ainsi, les métaux lourds peuvent induire un grand nombre de manifestations toxiques au niveau de nombreux organes comme le rein, le foie, le tractus digestif, l'appareil cardio-vasculaire, les os, le système reproducteur, le système nerveux, etc.

Cette partie du manuscrit sera donc dédiée à l'étude de la chimiotoxicité de l'uranium en décrivant tout d'abord les types d'interaction possibles entre l'uranium et différentes macromolécules cellulaires (protéines, membranes cellulaires, ADN), puis en déduisant les effets possibles de ces interactions à l'échelle de la cellule. Enfin, utilisant ces différents éléments de toxicologie cellulaire comme des clés de lecture permettant une meilleure interprétation des mécanismes mis en jeu, nous décrirons les effets de l'uranium à l'échelle des différents tissus et organes atteints lors d'épisodes de contamination.

5.3.1 - Toxicologie à l'échelle moléculaire

5.3.1.1 - Effets sur le statut oxydatif cellulaire et ses conséquences

Uranium et stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et les systèmes prooxydants en faveur de ces derniers impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène^①, source d'effets toxiques potentiels (Aït-Aïssa et al., 2003).

Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (communément appelées ERO, ou ROS en anglais) inclut les différentes formes actives de l'oxygène (comme le radical hydroxyle (OH[°]) ou l'anion superoxyde (O₂[°])) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi que les espèces radicalaires^① qui peuvent en être les initiateurs. Leur réactivité peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes. Toutefois, la formation d'espèces réactives ne s'accompagne pas systématiquement de phénomènes de toxicité. En particulier, certaines espèces réactives sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux (respiration cellulaire ou les phénomènes inflammatoires). Ainsi, dans des conditions physiologiques normales, des radicaux libres^① sont formés dans l'organisme du fait de certains phénomènes biologiques. La formation de ces radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires. Par exemple dans les mitochondries, lors de la respiration cellulaire, la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires peut être réalisée de façon incomplète et s'accompagner ainsi d'une formation parallèle d'environ 2 % d'espèces extrêmement réactives de l'oxygène (ERO). De même, au sein du cytosol, diverses réactions chimiques peuvent produire ces dérivés de l'oxygène. Par ailleurs, au sein de certaines cellules immunitaires, des enzymes interviennent dans la production de radicaux libres pour détruire les microorganismes, des macromolécules étrangères ou les cellules en décomposition de tissus nécrotiques (Wilson et Salamatian, 2003).

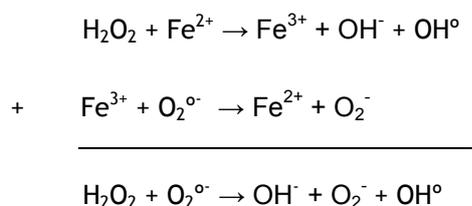
Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène non nulle. Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires (Bouaïcha, 2003). Le contrôle rigoureux de leur formation et de leur élimination par le biais de

différents systèmes antioxydants préserve donc les cellules de leurs effets délétères (Braut-Boucher et Plantin-Carrenard, 2003 ; Gharbi et Moussa, 2003).

Cependant, ces dérivés de l'oxygène peuvent également être induits par la présence de composés exogènes à l'organisme comme c'est notamment le cas pour les métaux (Stohs et Bagchi, 1995 ; Cossu et al., 1997a). De plus, les métaux peuvent altérer le fonctionnement des systèmes de contrôle. Si ces effets (surproduction de prooxydants et/ou dysfonctionnements des antioxydants) sont à l'origine d'une rupture de l'équilibre oxydatif, il peut alors survenir un stress cellulaire appelé "stress oxydant" (Jensen, 2003) dont les conséquences pour la cellule peuvent prendre la forme de dommages irréversibles (cf. § 5.3.1.2, 5.3.1.3 et 5.3.1.4).

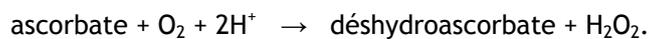
Taqi Khan et Martell (1969) ont décrit très tôt le fait que l'uranium soit capable d'induire la formation de radicaux hydroxyles en présence de peroxyde d'hydrogène. Les résultats de cette étude ont ensuite été corroborés par les travaux d'Hamilton et al. (1997). Le schéma réactionnel de ce phénomène a récemment été décrit, basé sur un mécanisme d'oxydoréduction de type Fenton.

En effet, tout comme certains métaux de transition (notamment Fe^{2+} et Cu^{2+}), l'uranium serait susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation d'un ion hydroxyde (OH^-) mais également d'un radical hydroxyle (Miller et al., 2002a). Cette réaction d'oxydoréduction est alors tout à fait similaire à la réaction de Fenton qui, dans le cas du fer, se décompose ainsi :



Dans le cas de l'uranium, Yazzie et al. (2003) suggèrent que la première de deux réactions initiées serait la suivante : $\frac{1}{2} \text{U(IV)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \frac{1}{2} \text{U(VI)} + \text{HO}^\circ + \text{HO}$.

La seconde étape (de réduction du métal) assurerait ensuite le passage de la forme U(VI) en U(IV) sous l'action d'agents réducteurs tel que l'ascorbate. Ce mécanisme, décrit par différents auteurs (Miller et al., 2002a ; Yazzie et al., 2003), serait défini par le schéma réactionnel suivant :



Dans ce schéma réactionnel, l'ascorbate (c'est-à-dire la vitamine D) et le dihydrogène servent de catalyseurs à la réaction faisant passer alternativement l'uranium de la forme U(VI) à U(IV) puis U(IV) à U(VI) selon un cycle libérant du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. [Pourahmad et al. \(2006\)](#) proposent le même mécanisme de réduction de l'uranium (VI) en uranium (IV) par le biais d'autres agents cellulaire, notamment le système d'oxydoréduction formé par l'isoforme 2E1 du cytochrome P450 (CYP2E1), sa réductase (la NADPH dépendante cytochrome P450 réductase) et une molécule clé du système antioxydante cellulaire : le glutathion sous sa forme réduite (GSH) ([Pourahmad et al., 2006](#)).

Il s'établirait donc un cycle d'oxydoréduction de l'uranium, successivement présent sous les formes U(VI) et U(IV), à l'origine de la libération dans le milieu intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle. Cette surproduction d'espèces réactives de l'oxygène pourrait donc être à l'origine d'un stress oxydant cellulaire dont pourraient résulter des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de désamination, de réduction, de rupture de chaînes carbonatées, de polymérisation, etc. dont les macromolécules telles que les protéines, les phospholipides membranaires et les acides nucléiques sont les cibles principales ([Ribera et al., 1996](#)).



Cette capacité de l'uranium à induire un stress oxydatif a été mise en évidence chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par le biais d'une étude récente ([Buet et al., 2005](#)). Les auteurs ont ainsi observé une perturbation de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la défense cellulaire antioxydante (inhibition des activités superoxyde dismutase et catalase) après une exposition par voie trophique à différentes concentrations d'uranium appauvri (20, 100 et 500 µg/L). Ces perturbations se sont avérées statistiquement significatives dès 6 h d'exposition et après 5 j mais n'ont plus été constatées après 10 j. De la même manière, une étude menée sur le *Danio rerio* a montré l'instauration d'un stress oxydatif suite à des expositions menées *in vitro* et *in vivo* à de l'uranium appauvri ([Labrot et al., 1996, 1999](#)). Ainsi, la perturbation d'enzymes telles que la catalase et la glutathion peroxydase ainsi que l'induction d'un marqueur direct de peroxydation

lipidique (le malondialdéhyde) ont été mesurées sur des fractions post mitochondriales obtenues à partir d'homogénats d'organismes entiers.

Conséquences du stress oxydant sur les protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées (Levine, 1983 ; Rokutan et al., 1990 ; Davies, 2003). D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées par des phénomènes de carbonylation ($=C=O$) notamment. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Elles deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles peuvent alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules.

Conséquences du stress oxydant sur les membranes biologiques

Les membranes étant constituées d'un double feuillet phospholipidique, les radicaux générés (en particulier les radicaux hydroxyles) sont susceptibles de réagir avec les chaînes d'acides gras insaturés au niveau des doubles liaisons. Le radical hydroxyle, HO^\bullet , initie une cascade de réactions en extrayant un atome hydrogène (réaction d'oxydation) par exemple à un groupement méthylène d'un acide gras insaturé ($RH + OH^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O$). L'atome de carbone muni d'un électron célibataire, va alors capturer une molécule d' O_2 donnant naissance à un radical peroxyde ($R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$). Cette réaction de peroxydation va ensuite pouvoir se propager de proche en proche par création d'un nouveau radical carboné, selon la réaction $ROO^\bullet + RH \rightarrow ROOH + R^\bullet$ (figure 2). Les acides gras ainsi modifiés, altèrent l'intégrité membranaire. Or, toute altération de la membrane peut être responsable de la modification des flux calciques, lesquels sont impliqués dans les mécanismes apoptotiques (Stark, 2005). Outre l'altération de la membrane, les peroxydes formés par cette réaction ou les produits de dégradation de ces dérivés (comme le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonanal) peuvent également s'avérer toxiques pour le matériel génétique cellulaire (Breton et al., 2003).

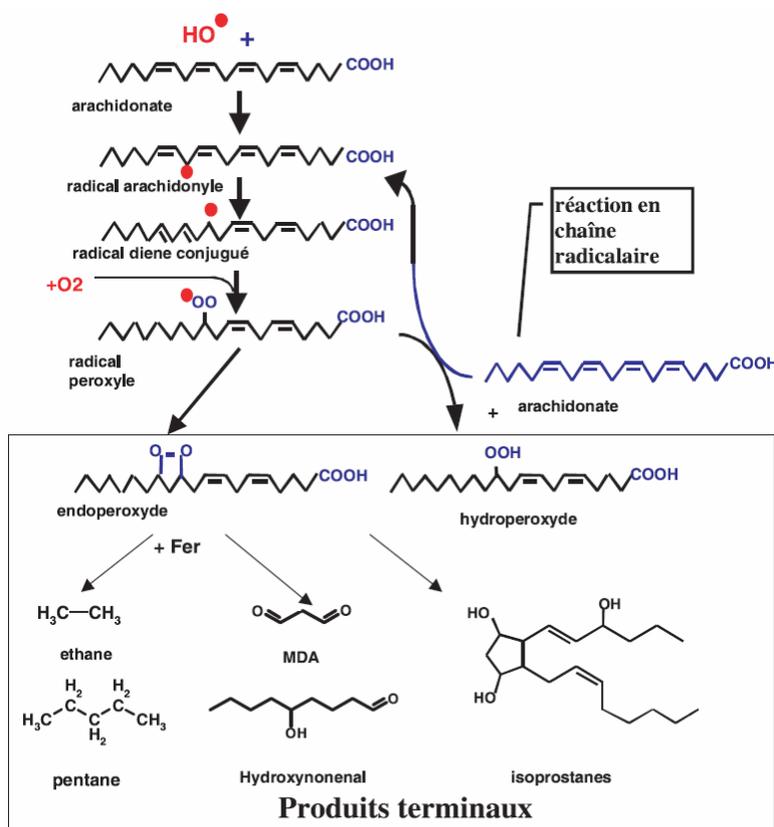


Figure 2. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

Une étude menée *in vitro* par [Tasat et de Rey \(1987\)](#) a ainsi permis de montrer que l'uranium absorbé par phagocytose au sein des macrophages alvéolaires pour y être stocké au sein de vacuoles formées lors de leur passage dans le milieu intracellulaire (lysosomes) peut induire des dommages membranaires conduisant à la destruction de ces organites. Des phénomènes d'oxydoréduction des phospholipides membranaires seraient à l'origine de cette désagrégation membranaire. D'autres études menées sur les mammifères indiquent également que l'uranium est un agent très efficace d'endommagement membranaire ([Carafoli et al., 1971](#) ; [Leggett, 1989](#), [Muller et al., 1989](#) ; [Pourahmad et al., 2006](#)). Parmi celles-ci, l'étude menée par [Pourahmad et al. \(2006\)](#) sur des hépatocytes en culture a permis de confirmer l'altération des structures membranaires lysosomales ainsi qu'une chute du potentiel membranaire des mitochondries.



Chez les poissons, l'étude de [Cooley et al. \(2000\)](#) menée sur des corégones (*Coregonus clupeaformis*) a permis de montrer que la concentration sérique en lipides peroxydés augmente en

cas d'exposition à l'uranium par voie trophique (démontrant une forte dépendance vis-à-vis de la concentration d'exposition) et constitue donc un indicateur sensible de l'exposition à l'uranium.

Conséquences du stress oxydant sur le matériel génétique

L'ADN se présente sous la forme d'un polymère constitué par l'enchaînement de nucléotides. Le nucléotide est lui-même une entité constituée d'un phosphate relié à un sucre (le 2-désoxyribose) lui-même relié par une liaison N-glycosidique à une base (purique ou pyrimidique). Outre les effets toxiques des peroxydes et autres dérivés formés par l'altération oxydative des membranes, les espèces radicalaires OH^\bullet et H^\bullet peuvent réagir directement avec les bases azotées ou le sucre (2-désoxyribose) constitutifs de la molécule d'ADN (Marnett, 2000 ; Dizdaroglu et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Breton et al., 2003).

Le produit de ces réactions conduit à la formation de coupures simple ou double brins, de bases modifiées, de sites abasiques et de pontages ADN - protéines (figure 3).

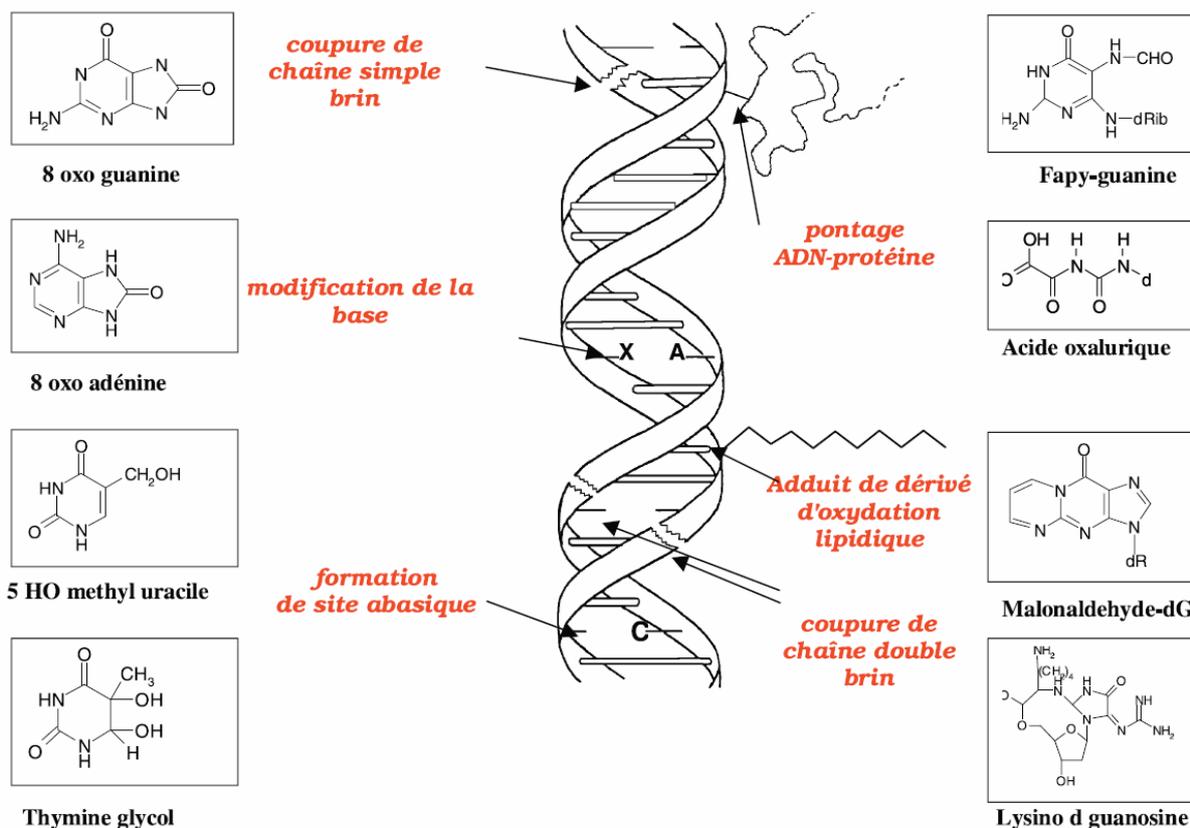


Figure 3. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire. Figure centrale : mécanismes généraux.

Cadres latéraux : exemples de bases modifiées (Favier, 2003).

*(a) Les coupures de brins**Les coupures simple brin (CSB)*

Elles sont essentiellement dues à la rupture des liaisons phosphate-sucre à la suite d'un arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par le radical OH^\bullet . Il s'agit de lésions relativement vite réparées (en moins d'1 h) et qui ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire. Elles peuvent également résulter de défaut de réparation par excision/resynthèse.

Yazzie et al. (2003) ont démontré que le cation d'uranyle est susceptible de provoquer des cassures simple brin de l'ADN. De même, des cassures d'ADN, mesurées par le test des comètes, ont également été mises en évidence dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois exposés à de l'uranium appauvri sous forme d'acétate d'uranyle (Stearns et al., 2005).

Les coupures double brins (CDB)

Il s'agit sans doute d'une catégorie de lésions parmi les plus délétères. Elles correspondent à une rupture des deux chaînes en des sites proches l'un de l'autre. Deux mécanismes sont avancés pour expliquer leur formation. Le premier suppose l'action d'un seul radical OH^\bullet sur le 2-désoxyribose avec transfert du radical sur le deuxième brin. Le deuxième implique l'attaque de l'ADN par plusieurs radicaux hydroxyle dans des zones rapprochées (Calmet et al., 2003).

(b) Les bases modifiées

La nature des produits obtenus dépend des propriétés redox des espèces mises en jeu et de leur environnement (présence d'oxygène ou non).

Les modifications des bases pyrimidiques résultent essentiellement de l'attaque des radicaux hydroxyles au niveau de leur cycle aromatique. Les radicaux OH^\bullet étant très électrophiles, leur attaque s'effectue préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine et de la cytosine. Les bases puriques peuvent subir quant à elles l'addition de radicaux OH^\bullet en position 4 ou 8 (Blakely et al., 1990 ; Kawanishi et al., 2001 et 2002).

Il a été montré qu'une altération de l'ADN par la formation de thymine glycol et de 8-hydroxy-désoxyguanosine (spécifiques d'un stress oxydatif) peut être induite en présence d'uranium appauvri, de peroxyde d'hydrogène et d'ascorbate (Miller et al., 2002a).

(c) Pontages ADN-protéines

Des pontages intra-chaînes, inter-chaînes ou entre l'ADN et les protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet d'un stress oxydant. Dans ce cas, le radical hydroxyle peut être impliqué. Ces pontages peuvent se former lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines proches de l'ADN. Des travaux (non spécifiques à l'uranium) ont ainsi mis en évidence la formation de pontage entre la tyrosine et la thymine mais aussi entre d'autres acides aminés et la thymine ou la cytosine (Pouget, 2000).

(d) Altération des sucres

L'attaque du 2-désoxyribose par les radicaux OH° qui se traduit initialement par un arrachement d'un atome d'hydrogène, peut conduire à : (i) une libération du sucre (formation d'une coupure de brin), (ii) une altération du sucre n'affectant pas ses liaisons en 3' et 5' au squelette phosphodiester (site abasique), ou (iii) une altération du sucre réduisant sa liaison au squelette phosphodiester à l'un ou l'autre des sites de fixation, 3' ou 5' (formation d'une coupure de brin) (Pouget, 2000).

5.3.1.2 - Effets directs sur les protéines

Outre les dommages oxydatifs potentiellement subis par les protéines, l'uranium peut interagir directement sur ces macromolécules. L'uranium a ainsi été décrit comme étant capable de se fixer *in vitro* à différentes protéines du sérum sanguin (Vidaud et al., 2005). L'ion uranyle UO_2^{2+} , est également capable de diminuer l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et de l'ATP (Nechay et al., 1980 ; McQueney et Markham, 1995) ainsi que dans la signalisation cellulaire (Nathanson et Bloom, 1976). La modification de l'activité enzymatique de certains cytochromes P450 a également été observée suite à l'inhalation de dioxyde d'uranium (Pasanen et al., 1995).

5.3.1.3 - Effets directs sur le matériel génétique

Certains auteurs suggèrent que l'uranium pourrait agir directement par fixation sur les groupements phosphate de l'ADN et catalyser une réaction d'hydrolyse de la liaison sucre-phosphate dont la manifestation directe serait l'apparition de cassures mono ou bicaténares (Lin et al., 1993 ; Stearns et al., 2005).

5.3.2 - Conséquences cellulaires et subcellulaires

Les effets cellulaires de l'uranium, qu'il soit naturel ou appauvri, ont été étudiés en majorité dans des systèmes *in vitro*. Les principaux effets toxiques démontrés sont issus, selon le type cellulaire, de différents mécanismes.

5.3.2.1 - Modifications morphologiques



Des altérations significatives de paramètres morphométriques au niveau des hépatocytes ont été observées chez des corégones (*Coregonus clupeaformis*) exposés à l'uranium par voie alimentaire (Cooley et al., 2000). L'augmentation de la taille relative de ces cellules hépatiques, de même que la réduction du rapport nucléo-cytosolique ont en effet été rapportées. Les auteurs suggèrent que ces altérations peuvent résulter de réserves excessives en lipides et/ou glycogène, de gonflements cellulaires causés par la dénaturation des ATPases, par l'altération des processus de transfert énergétique, ou encore par la prolifération des organites comme c'est souvent le cas du réticulum endoplasmique (Hinton et Lauren, 1990). Une réduction du rapport nucléo-cytosolique peut également être observée dans le cas d'étapes précoces de développements néoplasiques¹. En effet, cette caractéristique est typique des cellules indifférenciées à croissance rapide (Hinton et al., 1988). Cette diminution du rapport nucléo-cytosolique observée au niveau hépatique chez les corégones a également été observée sur des hépatocytes ayant survécu aux étapes initiales de la cytotoxicité induite par des contaminants chez les poissons (Hinton et al., 1988).

5.3.2.2 - Perturbations du cycle cellulaire et des capacités de réparation de l'ADN

En conséquence de la présence de lésions au sein des molécules d'ADN d'une cellule, un arrêt du cycle cellulaire peut être marqué afin de permettre aux systèmes de réparation de la cellule d'agir. Une étude menée *in vitro* sur des cellules d'ovaires de hamsters chinois a ainsi permis de montrer que le nitrate d'uranyle peut induire un tel ralentissement (Lin et al., 1993).

La mise en place de mécanismes de réparation peuvent alors permettre de rétablir l'intégrité du matériel génétique. La perturbation possible des mécanismes de réparation de l'ADN par certains métaux peut ainsi conduire à des dommages à l'ADN, de façon directe ou indirecte. Aucune étude ne fait état de telles perturbations dans le cas de l'uranium. Cependant, ce

phénomène a été décrit pour différents métaux comme le plomb, le cadmium et le nickel (Hartwig et al., 1994a,b et 2002a,b ; Hartwig et Schwerdtle, 2002).

5.3.2.3 - Atteintes géniques et chromosomiques

Lorsque les altérations de l'ADN peuvent être réparées, l'effet biologique se limite alors à l'échelle moléculaire et la cellule reste intacte. Lorsque la cellule ne peut pas réparer son ADN lésé ou que des réparations fautive surviennent, les modifications de l'ADN peuvent être à l'origine d'arrêts prolongés dans le cycle cellulaire, d'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, de problèmes de ségrégation des chromosomes. Peuvent alors apparaître des événements génétiques anormaux tels que des mutations géniques irréversibles et héréditaires ou des instabilités génomiques. A leur tour, ces dommages pourront être à l'origine d'effets tératogènes (si ces altérations concernent des cellules germinales ou si elles surviennent lors du développement embryonnaire) mais aussi de cancers (dans le cas d'atteintes de cellules somatiques⁷) ou peuvent encore induire la mort cellulaire.

Mutations géniques

Une mutation est un changement transmissible dans le matériel génétique. Des mutations au niveau de cellules somatiques favorisent l'apparition de cancers et au niveau des cellules reproductrices, elles peuvent entraîner des anomalies héréditaires.

Une étude menée par Stearns et al. (2005) a montré qu'une exposition *in vitro* à l'uranium de cellules de hamster chinois était ainsi à l'origine de mutations. *In vivo*, Miller et al. (1998a) ont détecté la présence de facteurs mutagènes au sein des urines et de sérum sanguin obtenus sur des rats contaminés à l'uranium appauvri par le biais d'implants sous-cutanés. Dans un document plus récent des mêmes auteurs (Miller et al., 2002b), le patrimoine génétique des cellules issues d'une lignée cellulaire d'ostéoblastes humains exposée *in vitro* à de l'uranium appauvri a ensuite fait l'objet d'analyses visant à détecter l'altération de certains gènes (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs). Les résultats de ces travaux ont ainsi permis de montrer que l'exposition à l'uranium appauvri a permis d'induire un effet significatif, la fréquence de cellules transformées ayant été multipliée par 25,5 par rapport à une lignée cellulaire témoin.

Instabilité génomique

Ces manifestations cytogénétiques résultent d'accidents mécaniques subis par le chromosome lors de la mitose. Deux mécanismes sont possibles : une mauvaise répartition des chromosomes aboutissant à des anomalies relatives à leur nombre (aneuploïdie lorsqu'un ou plusieurs chromosomes manquent) et une fragmentation des chromosomes (événements clastogènes) aboutissant à des anomalies de structure (translocations, inversions, fragments acentriques) (figure 4). En outre, l'intégrité du matériel génétique cellulaire peut être affectée par la formation de micronoyaux. Il s'agit d'entités nucléaires indépendantes du noyau, présentes dans le cytoplasme, provenant de chromosomes entiers ou de fragments séparés du reste des chromosomes au cours de l'anaphase.

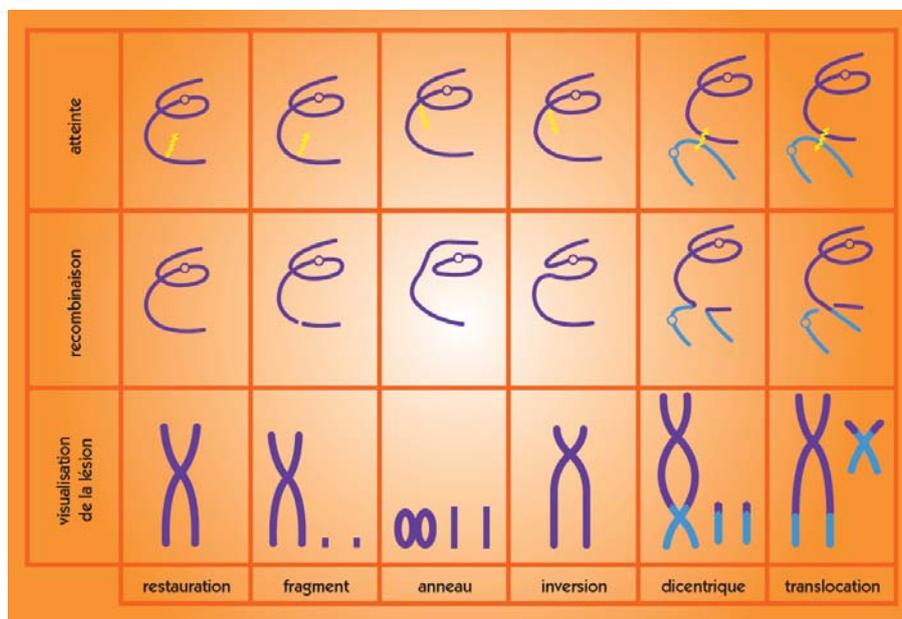


Figure 4. Nature et formation des aberrations chromosomiques. Selon la position et le nombre de lésions de l'ADN et en fonction de la qualité de la réparation ou de la recombinaison du chromosome sur lui-même ou avec un autre, soit des chromosomes normaux, soit différents types d'aberrations chromosomiques seront observés. (Moustacchi et al., 2000).

Les remaniements chromosomiques, lorsqu'ils surviennent dans les cellules somatiques, peuvent induire des perturbations à l'échelle de l'individu (altération de la traduction, de la transcription d'un gène, formation de protéines anormales, etc.) mais sans conséquences sur les descendants de celui-ci. Dans la lignée germinale, il en est tout autrement puisqu'un remaniement

chromosomique, même équilibré, peut entraîner une répartition erronée du matériel génétique à la méiose. Seules les aberrations stables (translocations, inversions) seront transmises à la descendance et pourront être mises en évidence après plusieurs générations cellulaires post-irradiation, les aberrations les plus complexes (anneaux dicentriques, acentriques) étant quant à elles difficilement transmissibles.

Une étude de [Coen et al. \(2001\)](#) a récemment permis de démontrer que les métaux lourds tels que le cadmium ou le nickel peuvent induire une instabilité génomique. Dans le cas de l'uranium, de nombreuses études font état d'aberrations chromosomiques survenant à la suite d'épisodes de contamination.

In vitro, l'étude de [Miller et al. \(2003\)](#) a été entreprise dans le but d'évaluer les capacités de l'uranium appauvri à induire une instabilité génomique au niveau de la descendance d'ostéoblastes humains exposés à cet élément. Elle a ainsi permis de démontrer que les cellules issues de la descendance de cellules exposées à de l'uranium appauvri présentent une fréquence d'apparition de micronoyaux jusqu'à 2,5 fois plus élevée que des cellules témoins. Dans une précédente étude des mêmes auteurs ([Miller et al., 2002b](#)), l'examen génotoxique d'une lignée cellulaire d'ostéoblastes humains exposée *in vitro* à de l'uranium appauvri a permis de détecter la présence de micronuclei, d'échanges de chromatides sœurs ainsi que de cassures de brins d'ADN. [Lin et al. \(1993\)](#) ont également montré la capacité de l'uranium à induire une instabilité génomique par le biais d'une augmentation du nombre de micronoyaux et d'échanges de chromatides sœurs, utilisant comme modèle cellulaire une lignée de cellules d'ovaires de hamsters chinois.

Chez l'Homme, [Martin et al. \(1991\)](#) se sont attachés à mesurer différents paramètres cytogénétiques (altération de la symétrie des chromosomes et échanges de chromatides sœurs) sur des cultures lymphocytaires issues de mineurs exposés à l'uranium. La fréquence d'apparition de ces deux paramètres de cytogénotoxicité s'est révélée significativement plus importante que pour des lymphocytes issus d'un groupe témoin. Les facteurs confondants que sont l'exposition externe aux radiations émises par le radon ainsi que la consommation de tabac des individus impliqués dans l'étude ont pu être écartés lors de l'interprétation de ces résultats, attribuant ainsi ces effets à la toxicité chimique de l'uranium. L'augmentation du taux d'échange de chromatides sœurs a également été observée chez des vétérans de la guerre du Golfe ([McDiarmid et al., 1995](#)) ainsi que

chez des personnes travaillant le minerai d'uranium (Prabhavathi et al., 1995). Ces derniers auteurs ont réitéré leur étude en investiguant un nombre plus important d'aberrations chromosomiques. Les résultats de ce travail montrent que le niveau d'aberration moyen (cassures, translocations, fragments, asymétrie, polyploidie) a été augmenté à la suite de l'exposition à l'uranium (Prabhavathi et al., 2000). L'étude de Krunic (2005) a quant à elle permis de démontrer l'augmentation significative de l'apparition de micronoyaux au niveau des lymphocytes de personnes vivant sur des sites contaminés en uranium appauvri à la suite des conflits ayant eu lieu dans les Balkans.

5.3.2.4 - Cancérogénicité

Une tumeur provient d'une seule cellule dont la division échappe à tout contrôle. La division cellulaire étant sous le contrôle de gènes, c'est la modification du code génétique (mutation) de ces gènes qui est responsable de l'initiation du processus tumoral.

Deux processus sont alors possibles. Le cancer peut être initié par activation d'un oncogène (une translocation spécifique active un oncogène) ou par inactivation d'antioncogènes. On considère qu'il est plus facile à une lésion de produire la perte d'une fonction que la création d'une nouvelle. La majeure partie des lésions induisent donc plutôt des délétions qui aboutissent à la perte de fonction d'un gène. S'il s'agit d'un antioncogène, la phase de promotion du cancer pourra alors s'enclencher. La cellule acquerra une totale indépendance et ne répondra plus à aucun contrôle de son environnement au cours de la phase suivante, dite de progression.

L'uranium appauvri a montré un pouvoir transformant sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (Yang et al., 2002) et sur une lignée d'ostéoblastes humains (Miller et al., 1998b ; 2002b). D'après Miller et al. (1998b), les cellules transformées sont notamment caractérisées par l'induction de l'expression d'un oncogène et la réduction de la production d'une protéine "suppresseur" de tumeur. De plus, d'après leur étude de 2002 (Miller et al., 2002b), l'inoculation de lignées cellulaires exposées à de l'uranium à des souris a permis d'observer l'apparition de tumeurs chez ces dernières. L'exposition de cellules à de l'uranium appauvri peut donc induire leur transformation vers un phénotype tumoral. Ces résultats suggèrent que, *in vitro*, l'uranium appauvri peut être un carcinogène. Les auteurs supposent que les mécanismes de

transformation induits par l'uranium pourraient être la conséquence des effets génotoxiques parallèlement observés (*cf.* étude précédemment décrite dans le paragraphe 5.3.2.3).

Des études utilisant de l'uranium appauvri administré sous la forme d'implants à des rats, montrent que la concentration d'uranium est corrélée à l'activation de plusieurs oncogènes dans le rein et le muscle où ils sont à l'origine de l'induction de sarcomes (Hahn et al., 2002).

Néanmoins, des études épidémiologiques menées depuis plus d'une cinquantaine d'années sur des cohortes de personnes travaillant à l'exploitation de minerais d'uranium n'ont pas permis de dégager clairement d'effet sur l'incidence de cancers (McDiarmid, 2001 ; Tirmarche et al., 2004). Ainsi, selon un rapport de l'ATSDR (1999), aucune augmentation significative de l'occurrence de cancers pulmonaires n'a pu être mise en évidence chez ces populations "à risque" car fortement exposées à l'uranium. Les seuls cas d'augmentation des cancers chez ces mineurs ont ainsi été attribués aux effets du radon et de ses descendants et non à l'uranium. De même, deux autres études (Kathren et Moore, 1986 et Kathren et al., 1989) ont montré qu'il n'existe pas d'évidence irrévocable quant au fait que la contamination par l'uranium par inhalation, par ingestion ou par contact puisse induire des cancers chez l'Homme.

5.3.2.5 - Mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus qui intervient dès que les atteintes de molécules cibles sont trop importantes. La mort cellulaire peut impliquer deux mécanismes, la nécrose et l'apoptose (ou mort programmée).

La nécrose se produit lorsque la cellule est soumise à des agressions. Les traits morphologiques de la cellule impliquent un œdème cytoplasmique et mitochondrial, une condensation de la chromatine et le phénomène est associé à un processus inflammatoire. Chez les mammifères, il a été montré que les nécroses tissulaires (de même que les phénomènes inflammatoires) sont liées au stress oxydant (Kehrer, 1993) et ces liens sont également supposés chez les poissons (Winston et Di Giulio, 1991).

L'apoptose elle, intervient dans les processus physiologiques des organismes pluricellulaires tels que l'embryogenèse, la métamorphose ou l'atrophie de tissus, etc. La morphologie des cellules apoptotiques se caractérise par une rupture des jonctions intercellulaires et une fragmentation de

l'ADN sous l'action d'endonucléases. Elle intervient également lorsque la cellule subit d'importantes altérations de son patrimoine génétique afin d'éliminer les cellules porteuses de dommages. De nombreux gènes de contrôle du cycle cellulaire sont impliqués dans le déclenchement de ce phénomène.

L'uranium a des effets cytotoxiques. Les différentes études, utilisant de multiples conditions expérimentales, suggèrent une différence de sensibilité vis-à-vis de l'uranium entre les types cellulaires. La concentration induisant 50 % de mortalité cellulaire (CL₅₀) est ainsi de l'ordre de 100 à 250 µM pour les macrophages (Kalinich et al., 2002 ; Lizon et Fritsch, 1999) et de 750 à 900 µM pour les cellules épithéliales rénales (Mirto et al., 1999a,b). L'effet sur la viabilité des macrophages serait lié à l'entrée en apoptose de ces cellules, mécanisme cellulaire dont l'initiation serait placée sous la dépendance de la quantité d'uranium ayant pénétré dans le compartiment intracellulaire (Kalinich et al., 2002 ; Lizon et Fritsch, 1999 ; Tasat et De Rey, 1987).



Chez le poisson, des nécroses hépatiques et rénales ont été constatées *in vivo* suite à l'exposition à l'uranium par voie trophique (Cooley et al., 2000). Les auteurs suggèrent que ces nécroses peuvent être la conséquence de différents mécanismes incluant une rupture des lysosomes, une hypoxie tissulaire et/ou une peroxydation lipidique. L'uranium est en effet accumulé au sein de lysosomes chez les mollusques et crustacés marins ou dulçaquicoles (Chassard-Bouchaud, 1982, 1983 ; Chassard-Bouchaud et Hallegot, 1984), de même que chez des mammifères (Galle, 1974 ; Tasat et De Rey, 1987 ; Muller et al., 1989 ; Galle et al., 1992). Comme nous l'avons vu précédemment, l'uranium (précipité sous la forme de microcristaux de phosphate d'uranium) peut endommager les structures subcellulaires. C'est notamment le cas des membranes lysosomales (Galle, 1974 ; Pourahmad et al., 2006). Tasat et De Rey (1987) suggèrent que le mécanisme d'endommagement des organites de même que la mort cellulaire observée sur des préparations de macrophages alvéolaires de rats sont dus à des dommages au niveau des membranes lysosomales entraînant le relargage d'enzymes hydrolytiques au niveau du cytosol. Les phénomènes de nécrose pourraient également être le résultat de la peroxydation lipidique et du dommage membranaire qui lui est consécutif (Kehrer, 1993). L'augmentation des lipides peroxydés au niveau du sérum sanguin constatée dans l'étude de Cooley et al. (2000) viendrait d'ailleurs corroborer cette dernière hypothèse.

5.3.2.6 - Phénomènes inflammatoires

Les macrophages sont impliqués dans les processus de la prise en charge et de la rétention de l'uranium. C'est notamment le cas au niveau des alvéoles pulmonaires dans le cas de contamination à l'uranium par inhalation (Tasat et De Rey, 1987). Les macrophages ainsi activés peuvent alors sécréter différents médiateurs : des cytokines pouvant être à l'origine de phénomènes pro- ou anti-inflammatoires. Cette réponse inflammatoire constitue l'un des éléments clés impliqués dans la défense d'un organisme. Cependant, une inflammation excessive ou persistante peut contribuer à l'apparition d'effets pathogènes.

Chez les mammifères, des études d'exposition à l'uranium *in vitro* de macrophages ont montré des effets sur la viabilité de ces cellules (Kalinich et al., 2002 ; Tasat et De Rey, 1987) mais également l'induction de la sécrétion de molécules impliquées dans les phénomènes d'inflammation (Gazin et al., 2004). D'autres études, menées *in vivo* sur des rats sujets à des inhalations de dioxyde d'uranium ont également permis de révéler l'induction de facteurs d'inflammation au niveau pulmonaire (Monleau et al., 2006).



Chez le poisson (*Coregonus clupeaformis*), des phénomènes inflammatoires ont également été rapportés par Cooley et al. (2000) lors d'examens histologiques réalisés à partir d'organismes exposés à l'uranium par voie alimentaire.

5.3.3 - Effets observés au niveau des différents tissus et organes

5.3.3.1 - Effets sur le système respiratoire

Chez l'Homme, après inhalation et dépôt de particules d'uranium au niveau du poumon, celles-ci vont gagner deux types cellulaires principaux : les macrophages et les cellules épithéliales (Monleau et al., 2006). Des phénomènes d'endocytose de l'uranium par les macrophages sont observés, suivis d'une accumulation importante au sein des lysosomes à l'origine de la formation de cristaux de phosphate et d'uranium (Hengé-Napoli et al., 1996 ; Hengé-Napoli et al., 1998). La présence de ces cristaux pourra ensuite induire des effets délétères pour les cellules qui les contiennent, à l'origine de nécroses. Concernant l'épithélium, des phénomènes d'inflammation pourront être déclenchés par la présence d'uranium, pouvant induire des fibroses (phénomènes de cicatrisation anormale liés à une augmentation de la prolifération des fibroblastes et à une

production excessive de composants de la matrice extracellulaire), des nécroses (ATSDR, 1999), de même qu'une prolifération cellulaire anormale (carcinomes, adénomes) (Leach et al., 1970, Leach et al., 1973, Mitchel et al., 1999).



L'atteinte branchiale des poissons exposés à des métaux à partir de la voie directe est fréquemment rapportée dans la littérature (Bywater et al., 1991). Néanmoins, aucune donnée relative à une atteinte de ce type chez des poissons exposés à l'uranium n'est disponible à ce jour.

5.3.3.2 - Effets sur l'appareil digestif

Du fait de l'occurrence beaucoup plus rare des cas de contamination à l'uranium par ingestion ainsi que du caractère non spécifique du système digestif en tant que cible de la toxicité de l'uranium, très peu de données concernant ce système sont accessibles dans la littérature. On pourra néanmoins citer différents travaux menés *in vitro* et *in vivo* sur les capacités d'assimilation des sucres au niveau du tractus gastro-intestinal qui semblent montrer un effet de l'uranium sur ce transfert (Newey et al., 1966 ; Rodriguez-Yoldi et Ponz, 1986). La dernière de ces études a ainsi permis de montrer l'inhibition du transports des sucres (glucose et galactose) par liaison de l'ion uranyle sur des groupements chimiques de protéines de transport situées à la surface ou plus en profondeur de la membrane des entérocytes.

Une étude *in vitro* relative à l'exposition de cellules de colon à de l'uranium a permis de montrer que les cellules étaient affectées par une inhibition de croissance, l'apparition d'un stress oxydant et des atteintes génotoxiques (bien que les systèmes de réparation ne semblent pas inhibés). Des cassures au sein des molécules d'ADN (ces cassures touchant notamment le gène *tp53* connu pour être impliqué dans les processus de cancérogénèse) ainsi que des aberrations chromosomiques (affectant notamment des chromosomes porteurs de gènes également connus pour être altérés au cours de la cancérogénèse) ont ainsi été observées (Knobel et al., 2006). Les auteurs suggèrent donc que l'ingestion d'uranium pourrait être à l'origine d'effets génotoxiques au sein du tractus gastro-intestinal.

Un organe particulier de l'appareil digestif a néanmoins fait l'objet d'attentions plus importantes vis-à-vis de la toxicité de l'uranium, notamment du fait de ses capacités de détoxification mises à contribution lors de contaminations par des xénobiotiques¹ : le foie. Parmi les études qui lui sont consacrées on notera ainsi l'observation de nécroses hépatiques chez des

modèles animaux exposés de façon chronique à du tétrafluorure d'uranium par inhalation (Dygart, 1949). Des observations du même ordre ont également été rapportées sur des rats sujets à des injections répétées d'uranium à des doses sublétales (Haven, 1949 ; Maynard et al., 1953). De plus, les capacités de détoxification du foie semblent être éprouvées suite à l'inhalation de dioxyde d'uranium chez le rat. On observe notamment une modification de l'activité enzymatique de certains cytochromes P-450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (Pasanen et al., 1995) ainsi qu'une perturbation de l'expression de certains des gènes codant pour ces cytochromes (Souidi et al., 2005).



Les résultats de l'étude de Cooley et al. (2000) menée sur *Coregonus clupeaformis* indiquent également que le foie est une des cibles principales sur lesquelles s'exerce la toxicité de l'uranium. La fréquence et la sévérité des lésions hépatiques sur le corégone sont directement corrélées à la concentration en uranium de leur alimentation de même qu'à la durée de l'exposition. La réduction de l'index hépato-somatique observée chez les individus exposés à la concentration la plus forte indique en outre une toxicité hépatique chronique.

5.3.3.3 - Effets sur le compartiment sanguin

Comme mentionné précédemment (paragraphe 5.1.2), quelle que soit la porte d'entrée empruntée par l'uranium lors d'épisodes de contamination, celui-ci va être véhiculé au travers de l'organisme par le sang.

Peu d'études ont porté sur l'évaluation des effets de l'uranium sur le compartiment sanguin. Néanmoins, il a notamment été observé, chez des rats exposés par inhalation à des composés uranifères, une diminution du nombre de cellules sanguines ainsi que de la charge en hémoglobine (Dygart, 1949 ; Roberts, 1949). De même, des perturbations de paramètres hématologiques ont été observés sur des bovins élevés dans des lieux contaminés en uranium appauvri à la suite de faits d'armes dans les Balkans (Jelka et al., 2005).

Chez l'Homme, des effets génotoxiques ont été observés sur les cellules du sang. Une augmentation de la fréquence des micronoyaux a ainsi récemment été rapportée dans les lymphocytes du sang de personnes vivant dans des zones de Bosnie-Herzégovine contaminées à l'uranium appauvri (Krunic et al., 2005). D'autres études montrent un lien entre une exposition à

l'uranium et l'augmentation des aberrations chromosomiques dans les cellules sanguines (Martin et al., 1991 ; Meszaros et al., 2004).



Sur le poisson, l'étude de Cooley et al. (2000) n'a pas permis de dégager d'effet significatif d'une exposition par voie alimentaire sur différents paramètres hématologiques (taux d'hématocrite, concentrations en K^+ , Na^+ et Cl^- , et osmolarité). Le suivi des paramètres hématologiques semble donc ne présenter aucun intérêt vis-à-vis de l'étude de l'uranium. Cette conclusion fait écho à deux articles de synthèse sur l'effet des contaminants sur les paramètres hématologiques chez le poisson, qui souligne également l'inadéquation de tels suivis (Mayer et al., 1992 ; Folmar, 1993).

5.3.3.4 - Effets sur le rein

Au sein de l'organisme, le rein joue un rôle dans le maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme. Il est également la principale voie d'excrétion des déchets métaboliques et des produits chimiques exogènes. Cette fonction est assurée par le concours de cellules épithéliales formant les néphrons, et endothéliales formant les vaisseaux sanguins. Le néphron, unité fonctionnelle du rein, est composé d'un glomérule et d'un tubule.

Chez les mammifères, l'exposition à l'uranium est à l'origine de pathologies³ rénales sévères quelque que soit la voie de contamination (Voegtlin et Hodge, 1949, 1953 ; Leggett, 1989) et le rein est considéré comme étant la cible principale de la toxicité de l'uranium (Hodge et al., 1973 ; Diamond et al., 1989 ; Leggett, 1989 ; Kurttio et al., 2002 ; Taulan, 2004). Dans les cas les plus sévères, l'intoxication à l'uranium peut conduire à une déficience rénale aiguë pouvant être létale (Ubios et al., 1994).

Les effets d'une contamination à l'uranium sur le rein s'apparentent (au même titre que ceux du cadmium, du plomb et du mercure) à ceux du syndrome de Fanconi. Il s'agit d'une atteinte du tubule proximal qui se traduit principalement par une protéinurie et une amino-acidurie (Griswold et McIntosh, 1973 ; Bentley et al., 1985). En fait, toutes les fonctions proximales sont progressivement atteintes, de sorte qu'est touchée non seulement la réabsorption rénale des acides aminés, mais encore celle des électrolytes, de l'urée, des sucres et de l'eau (Schwartz et Flamenbaum, 1976).

L'évaluation de cette néphrotoxicité de l'uranium a donc fait l'objet de nombreuses études (Bowman, 1970 ; Flamenbaum et al., 1972 ; Blantz, 1975 ; Haley et al., 1982 ; Diamond et al., 1989 ; Russel et al., 1996 ; Gilman et al., 1998a,b,c ; Zamora et al., 1998). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette toxicité.

Chez les mammifères, les complexes uranium-carbonate (filtrés au travers du glomérule) sont dissociés par l'environnement acide de la lumière des tubules proximaux, permettant ainsi à l'uranium d'interagir avec les cellules épithéliales de la bordure en brosse (Dounce, 1949). L'uranium ayant une haute affinité pour les sites anioniques de l'épithélium des tubules proximaux, c'est en partie au travers de ce type d'interaction que l'uranium est supposé exercer ses effets les plus sévères (Pasquale et al., 1986 ; Leggett, 1989). L'excès d'uranium dans l'urine provoquerait ainsi son entrée par endocytose dans les cellules épithéliales entourant le tubule. L'accumulation d'uranium au sein des lysosomes de l'épithélium tubulaire et la rupture lysosomale subséquente endommagerait alors les organites et autres constituants cellulaires (Galle, 1974 ; Tasat et De Rey, 1987 ; Diamond et al., 1989).

Alternativement, l'interaction chimique entre l'uranium et la surface apicale des cellules épithéliales interférerait avec le transport des ions et des métabolites, menant alors à des dysfonctionnements importants, notamment à une diminution de l'efficacité de la réabsorption des néphrons voire à la mort cellulaire (Tyraowski, 1979a,b,c). Les observations anatomopathologiques⁷ de tels dommages prennent alors la forme de nécroses, notamment au niveau de l'épithélium du tubule proximal (ATSDR, 1999, Morrow et al., 1982).



Les similarités entre les pathologies rénales observées dans l'étude de Cooley et al. (2000) et celles décrites chez des mammifères exposés à l'uranium (Leggett, 1989 ; Ubios et al., 1994), semblent indiquer que le rein est également la cible privilégiée de la toxicité de l'uranium chez les poissons. Les lésions tubulaires observées chez le corégone sont similaires à celles observées chez les mammifères, suggérant qu'elles soient issues des mêmes mécanismes d'action toxique.



Les lésions glomérulaires observées dans l'étude de Cooley et al. (2000), incluant des phénomènes de hyalinisation, de thrombose et de nécroses sont également en accord avec les effets de l'uranium observés chez les mammifères (Barnett et Metcalf, 1949 ; Domingo et al., 1987). Les phénomènes de hyalinisation observés dans le premier segment du tubule proximal, qui n'ont

été constatés que chez un nombre limité d'individus, constituent un indicateur symptomatique de dommages glomérulaires. Les dépôts éosinophiles présents au sein du cytosol à l'origine de ce phénomène sont dus à l'accumulation de quantités excessives de protéines ayant été filtrées au travers de glomérules lésés. Ils sont la manifestation de la protéinurie induite chez les organismes intoxiqués à l'uranium (Hinton et Lauren, 1990).



D'autres histopathologies induites par l'ingestion d'uranium au niveau du rein de coréogones ont été constatées, et corroborent une nouvelle fois les résultats d'études menées chez les mammifères (Cooley et al., 2000). Les auteurs ont ainsi relevé des dommages au niveau de segments du néphron situés en aval des tubules proximaux (Barnett et Metcalf, 1949 ; Bowman et Foulkes, 1970), de même que des inflammations (Barnett et Metcalf, 1949 ; Hursh et Spoor, 1973), et des hémorragies (Domingo et al., 1987).

5.3.3.5 - Effets sur le tissu osseux

Très peu d'études ont évalué les effets de l'uranium sur le tissu osseux alors qu'il en est le principal site d'accumulation à long terme (Pellmar et al., 1999a).

In vitro, il a ainsi été montré que l'uranium est capable de transformer les ostéoblastes, cellules jouant un rôle important dans la résorption de l'os (Miller et al., 2001).

In vivo, une diminution du taux de formation de l'os et une augmentation du taux de résorption ont été notamment observées chez des rats contaminés à l'uranium de manière aiguë (Guglielmotti et al., 1984, Ubios et al., 1991) ou chronique (Diaz Sylvester et al., 2002, Ubios et al., 1991). Ces données suggèrent que l'uranium pourrait contribuer à l'ostéoporose. Chez l'homme, une augmentation du turnover de l'os, particulièrement une augmentation de la résorption de l'os, a été associée à l'exposition à de l'uranium naturel via l'eau de boisson (Kurttio et al., 2005).

5.3.3.6 - Effets sur le système nerveux

Des études menées sur les effets de l'uranium sur le système nerveux ont été entreprises très tôt. Ainsi, dès 1949, des troubles neurologiques (tels que faiblesse musculaire, instabilité de la démarche et anorexie) ont été rapportés, suite à l'inhalation d'uranium par des chiens et des chats (Dygert et al., 1949 ; Roberts, 1949). Chez l'Homme, des états dépressifs ou des agitations anormales ont été décrits à la suite d'épisodes de contamination par des composés uraniques

industriels à cette même époque (Howland, 1949). Plus récemment des problèmes cognitifs¹ ont été constatés chez des soldats ayant reçu des fragments d'uranium appauvri au cours de combats dans le cadre de la guerre du Golfe (McDiarmid et al., 2000).

Différents travaux ont tenté d'apporter une explication mécanistique à ces observations. Il semblerait que le système cholinergique de transmission de l'influx nerveux soit altéré (Houpert et al., 2004 ; Bussy, 2005 ; Bussy et al., 2006). Cette toxicité cholinergique a en effet été démontrée, notamment par les travaux de Domingo et al. (1987) et d'Abou-Donia et al. (2002) menés chez des rats contaminés respectivement par administration orale et par des injections intramusculaires d'acétate d'uranyle. Concernant cette dernière étude, les auteurs ont suivi, en plus de l'activité du système cholinergique central, différents paramètres liés au comportement sensorimoteur et ce, jusqu'à 30 j après la fin du traitement. L'augmentation significative de l'activité de l'acétylcholinestérase (enzyme clé du système cholinergique) dans le cortex des animaux traités avec la plus forte dose d'acétate d'uranyle a ainsi permis de corroborer l'hypothèse d'une toxicité cholinergique. L'étude des paramètres neurocomportementaux a également permis de mettre en évidence une altération sensorimotrice significative. Des résultats comparables à cette étude ont également été rapportés par Briner et Murray (2005) quelques années plus tard.

Chez l'Homme, la majeure partie des études ont été menées sur des individus exposés de façon chronique à l'uranium. C'est notamment le cas de personnes travaillant dans le secteur de l'industrie nucléaire (mineurs par exemple). Ces études ont notamment permis de montrer l'existence de perturbations comportementales telles que des états de dépression ou d'agitation (Howland, 1949) ou l'incidence accrue de tumeurs ou de cancers du cerveau et du système nerveux central (ATSDR, 1999). Une autre "population à risque" qui a été largement sollicitée lors d'études des effets neurotoxiques de l'uranium a été constituée par les soldats exposés aux poussières ou aux éclats générés par l'explosion d'armes constituées d'uranium appauvri. Ces études, notamment portées sur les effets neuropsychiatriques, ont démontré une relation statistiquement significative entre un taux d'uranium élevé dans l'excrétion urinaire et une diminution des performances vis à vis de tests informatisés (McDiarmid et al., 2000).



Chez le poisson, l'étude de Labrot (1996) a permis de montrer une diminution significative de l'activité acétylcholinestérasique sous l'effet d'expositions de 4 et 11 j à l'uranium appauvri.

Cette étude, menée à la fois *in vivo* et *in vitro* présente toutefois de nombreux aspects sujets à critique. En effet, les mesures ont été faites sur des homogénats de poissons entiers et aucun test mentionnant l'utilisation d'un inhibiteur de la pseudo-acétylcholinestérase n'est mentionné. Or, deux types d'acétylcholinestérase existent chez les poissons et sont présents au sein des muscles. Les résultats de cette études peuvent donc comporter un facteur confondant du fait de l'incertitude liée à l'enzyme réellement suivie. De plus, les concentrations utilisées dans cette étude sont considérables, notamment pour les tests menés *in vitro* où les concentrations employées pour les tests étaient comprises entre 2,5 mg/L et 2,8 g/L.

5.3.3.7 - Effets sur le système reproducteur

La question des effets possibles d'une contamination à l'uranium sur la fonction de reproduction a fait l'objet d'un grand intérêt ces dernières années. De nombreuses publications sont ainsi apparues dans la littérature relative à la toxicité de l'uranium vis-à-vis des mammifères. Pour référence, nous pouvons ainsi citer les travaux de synthèse de [Domingo \(2001\)](#) et [Arfsten et al. \(2001\)](#).

Concernant les effets toxiques liés à cette présence d'uranium au niveau des systèmes reproducteurs, des altérations des cellules de Leydig (cellules de soutien dans les testicules) ont été rapportées chez des souris mâles contaminées en uranium par le biais de leur eau de boisson ([Llobet et al., 1991](#)). De même, des études menées chez des rats mâles exposés à l'uranium par le biais d'implants sous-cutanés ([Arfsten et al, 2005a,b](#)) ont montré des effets sur le succès reproducteur et certains paramètres relatifs à la qualité du sperme (concentration et mobilité).

En conséquence de ces atteintes des systèmes reproducteurs, les paramètres de la reproduction (fécondité, fertilité) peuvent être affectés. Ainsi, une baisse du nombre de portées et du nombre de petits par portée ont été rapportés dès 1949 suite à l'ingestion chronique de nitrate d'uranyle par différentes espèces animales ([Maynard et al., 1953](#)). D'autres études ont permis de compléter ces observations, démontrant notamment une diminution de la fertilité ainsi qu'une toxicité fœtale et embryonnaire chez la souris ([Bosque et al., 1993](#)).



Chez le poisson, en se basant sur l'étude de [Cooley et al. \(2000\)](#), il semblerait que les effets néfastes induits par l'uranium puissent apparaître, ou être magnifiés, quand l'organisme est simultanément sujet à une demande physiologique accrue. C'est notamment le cas lors des phases

de maturation sexuelle. Lors de leur étude, les auteurs ont en effet constaté que les fréquences d'apparition de lésions glomérulaires les plus fortes de même que les concentrations en lipides peroxydés les plus importantes ont été observées au stade de croissance gonadique le plus élevé. Ces conjonctions laissent donc penser que les capacités d'un organisme à faire face à un stress (exposition à un contaminant, stress physiologique tel que la maturation sexuelle, etc.) peuvent être surpassées quand cet organisme est exposé simultanément à plusieurs facteurs de stress.

5.3.3.8 - Effets sur le développement

Les effets sur la descendance d'animaux exposés à de l'uranium appauvri ont été étudiés sur des femelles gestantes dans lesquelles des fragments d'uranium appauvri avaient été implantés. Pour une exposition pendant toute la durée de la gestation (20 j), il a ainsi été montré que l'uranium appauvri peut franchir la barrière placentaire et affecter le développement d'embryons chez le rat (Pellmar et al., 1999). De plus, un retard dans le développement d'embryons de souris mis en culture en présence d'uranium préalablement à leur implantation a pu être mis en évidence par Kundt et al. (2000).

Des effets tératogènes ont également été observés au niveau de la descendance de rats femelles contaminées par ingestion pendant la durée de la gestation (Domingo et al, 1989a). Pour la plus forte dose testée, une mortalité embryonnaire a été observée. En deçà de cette dose, la toxicité fœtale s'est traduite par une diminution du poids et de la taille du fœtus associée à des malformations et des perturbations dans les différents stades de développement. Dans une seconde étude, ces mêmes auteurs ont évalué l'effet d'un gavage de femelles gestantes sur les dernières étapes du développement fœtal, la parturition, la lactation et la viabilité postnatale (Domingo et al., 1989b). La viabilité des nouveau-nés (baisse de la taille des portées, de la viabilité et de lactation) a été affectée. La même équipe a évalué les effets sur la survie postnatale chez la souris après contamination chronique via l'eau de boisson jusqu'au sevrage des portées (Paternain et al., 1989). Pour les doses élevées, le nombre de fœtus vivants, la croissance et le développement des nouveau-nés ainsi que leur survie ont été considérablement affectés.

5.3.3.9 - Effets sur le système immunitaire

Il semblerait que le système immunitaire puisse être affecté par une exposition à l'uranium. En effet, le système immunitaire est connu pour être affecté par des expositions chroniques à des métaux. Chez le rat, lors d'une exposition chronique à de l'uranium sous forme d'implants, l'uranium peut être accumulé au niveau de la rate et du tissu lymphatique (Pellmar et al., 1999a) de même que lors d'expositions chroniques par inhalation (Leach et al., 1970 et 1973). On peut donc s'attendre à ce que les particules d'uranium puissent affecter ces tissus impliqués dans la réaction immunitaire (Leach et al., 1970 ; Pellmar et al., 1999a ; Kalinich et McClain, 2001).

Peu de données relatives à la toxicité immunitaire de l'uranium sont disponibles. La principale expérimentation faisant référence dans le domaine est issue d'un projet de recherche mené par le centre de recherche des armées américaines de Bethesda. Elles ont montré que l'implantation de fragments métalliques contenant de l'uranium appauvri dans une blessure induisait des effets immunotoxiques (Kalinich et al., 2004). Une autre étude, dirigée par Arfsten et al. (2005a) a quant à elle étudié les effets sur les descendants de première génération de rats contaminés par de l'uranium appauvri par le biais d'implants. Cependant, les résultats indiquent qu'aucun effet n'a pu être mis en évidence sur le thymus ou la rate.

5.4 - Toxicité radiologique

La radiotoxicité de l'uranium est due aux radiations ionisantes^① issues de la décroissance physique des isotopes de l'uranium, ainsi que de leurs descendants. Un des paramètres permettant d'estimer l'importance de la radiotoxicité d'une source radioactive est son activité spécifique. Or, comme nous l'avons évoqué précédemment, la radioactivité spécifique de l'uranium appauvri est faible : moins d'une particule alpha est émise chaque minute par μg d'uranium appauvri. Il est donc généralement considéré qu'en présence d'uranium naturel, et surtout d'uranium appauvri, l'effet des radiations ionisantes est négligeable par rapport à l'effet chimique (Wrenn et al., 1985; Wrenn et al., 1987; Leggett, 1989 ; Aigueperse et al., 2001). Ainsi, lors d'une contamination par de l'uranium naturel ou appauvri, la toxicité principale exercée par l'uranium est liée à sa nature chimique. L'élément important à prendre en compte est alors la quantité pondérale. Cependant, lors d'une contamination par des composés dont l'activité spécifique est importante (^{234}U :

$2,31.10^8$ Bq/g ; ^{233}U : $3,57.10^8$ Bq/g), le risque radiotoxique devient significatif et est à prendre en considération. L'évaluation du risque lié à une telle contamination nécessite alors de prendre en compte l'activité en Bq en plus de la masse.

De plus, même pour des sources d'activités spécifiques faibles, il n'est également pas exclu qu'un effet radiologique apparaisse en particulier au niveau des tissus fixant l'uranium pendant de longues périodes (Aigueperse et al., 2001 ; Craft et al., 2004). La distribution hétérogène de l'uranium dans l'organisme conduit en effet à une irradiation non uniforme privilégiant certains organes. Des radiolésions peuvent ainsi apparaître au niveau de ces organes et tissus susceptibles de le stocker pendant de longues périodes. L'importance de ces lésions ainsi que leurs conséquences telles que l'induction d'effets stochastiques (cancers ou des effets héréditaires radio-induits) dépendront alors du niveau de radiosensibilité de l'organe ou du tissu considéré. Les cellules les plus sensibles étant des cellules peu différenciées et qui se divisent beaucoup, les tissus les plus radiosensibles sont les gonades, les tissus hématopoïétiques⁷ et les épithéliums.

5.4.1 - Définition d'un rayonnement ionisant

On entend par rayonnement ionisant tout rayonnement susceptible d'arracher un électron à la matière. On considère qu'il faut environ 10 électrons-Volts (eV) pour permettre cette ionisation. Les radiations ionisantes correspondent donc à des rayonnements électromagnétiques ou particulaires possédant une énergie associée supérieure à 10 eV. Si l'on compare ce niveau d'énergie avec l'énergie de la liaison C-C (3,6 eV) ou celle de la liaison O-H (5,16 eV), on peut ainsi constater qu'il est suffisant pour entraîner la dissociation des molécules.

5.4.2 - Origine des effets des radiations ionisantes

Les effets d'un rayonnement ionisant sur une molécule cible peuvent être produits par interaction directe du rayonnement avec la molécule ou par l'intermédiaire de l'eau environnante.

5.4.2.1 - Effet direct

Il résulte d'un dépôt d'énergie sur le substrat qui peut conduire à une ionisation ou à une excitation de la matière.

5.4.2.2 - Effet indirect

Il résulte de l'interaction du rayonnement avec la molécule d'eau. Ce phénomène est appelé radiolyse de l'eau. La radiolyse de l'eau comporte plusieurs étapes qui conduisent à la formation d'espèces radicalaires et ioniques ($^{\circ}\text{OH}$ et H° , e_{aq}^{-} , H^{+}) selon les processus décrits sur la **figure 5**. Lors de leur formation, ces espèces ne sont pas distribuées de façon homogène dans le milieu. Elles s'accumulent dans des zones situées à l'extrémité des trajectoires des électrons secondaires. Au cours de l'étape de diffusion, leur concentration décroît dans ces zones par réaction de recombinaison radicalaire, concomitamment à la formation de H_2 , H_2O_2 , mais aussi par diffusion dans tout le milieu ou encore par réaction avec des solutés éventuels.

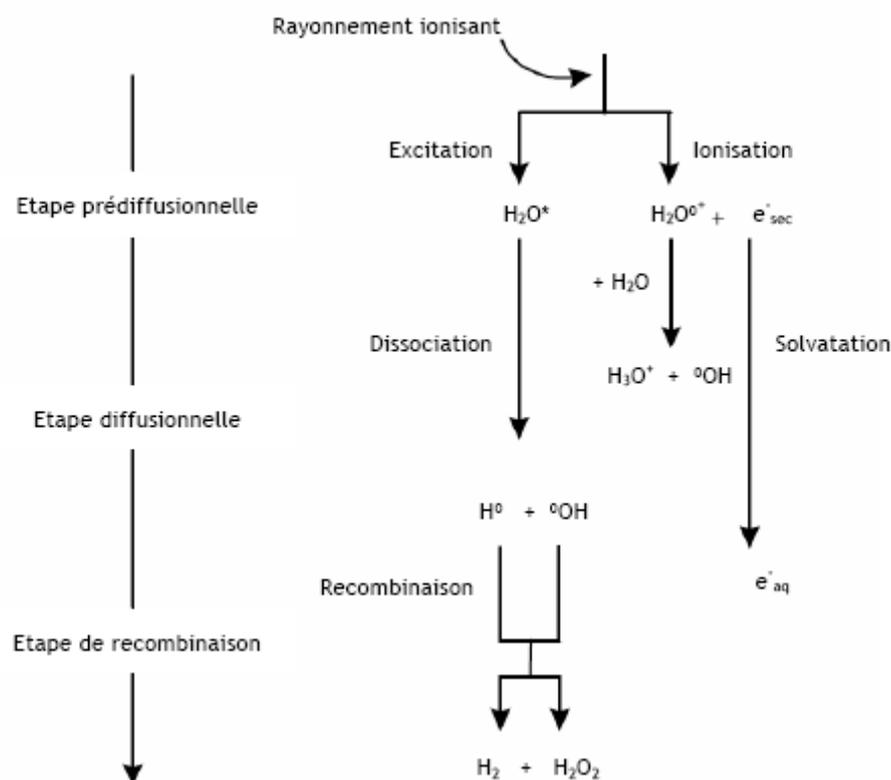


Figure 5. Radiolyse de l'eau (d'après Pouget, 2000).

5.4.3 - Aspects moléculaires de cette toxicité

5.4.3.1 - Effets directs sur le matériel génétique (ADN, chromosomes).

L'effet direct consiste en un arrachement d'électron avec formation d'un radical cation, conduisant notamment à la formation de cassures mono- et bicaténares mais également à la formation de bases modifiées identiques à celles induites par le stress oxydant (figure 6).

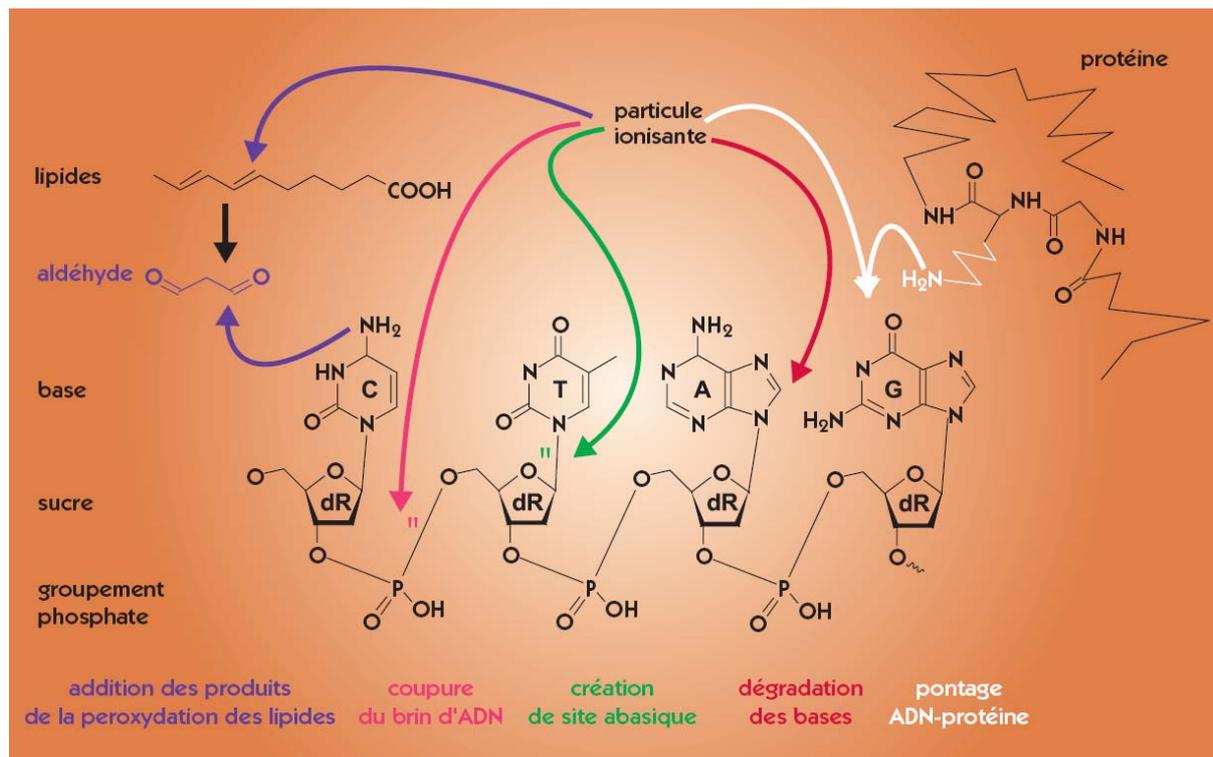


Figure 6. Les cinq grands types de dégradation de l'ADN, présentés sur les quatre bases pouvant être touchées, les pyrimidines (cytosine C et thymine T) et les purines (adénine A et guanine G). Le pontage ADN-protéine, en particulier, est illustré par un exemple. Dans un premier temps, un électron est arraché à la base guanine, dans un second temps le groupement amine NH₂ de l'acide aminé (ici une lysine) se lie à la guanine ionisée (Moustacchi et al., 2000).

Les coupures de brins

Cet effet peut concerner le 2-désoxyribose et conduire à la formation d'un radical cation qui, après déprotonation et réaction avec l'oxygène, conduit à une coupure de la chaîne d'ADN.

Du fait de leur diversité et de leurs dynamiques de réparation différentes, il n'est pas aisé de faire un décompte précis des lésions radio-induites *in vivo* par les radiations. En effet, celles qui persistent sont, par définition, celles qui sont mal ou non réparées dans les cellules survivantes. Des estimations ont cependant été proposées et celles de Goodhead (1993) sont les plus généralement acceptées (cf. tableau IV). Ces données, même si elles ne concernent pas directement l'effet des radiations α permettent de relativiser l'effet d'une exposition à 1 Gy de radiations par rapport aux lésions générées au cours de 24 h d'activité cellulaire normale.

Tableau IV. Types de lésions spontanées observées en 24 h ou induites après une irradiation de 1 Gy par des radiations à faible transfert linéique d'énergie^① (radiations γ) (d'après Calmet et al., 2003)

	Naturelles sans irradiation en 24 h	Ajoutées par 1 Gy de radiations γ	Ratio 1 Gy / naturelles
Cassures simple-chaîne	20 000 à 40 000	1 000	1 / 30
Cassures double-chaîne	Très peu	40	Très grand
Lésions de bases	20 000	2 000	1 / 10
Autres lésions	5 000	200	1 / 25
Total	- 50 000	3 240	1 / 20

Il est ainsi généralement admis que la caractéristique des radiations ionisantes est d'entraîner des cassures double-chaîne (dont la survenue naturelle est rare). Or, même si elles sont toujours très minoritaires, ces lésions sont souvent mal réparées (comparativement aux autres qui permettent une réparation complète). Ces cassures double-chaîne laissent donc une trace. Les radiations ionisantes vont donc être plus particulièrement à l'origine de cassures double brins persistantes dont les conséquences cellulaires vont généralement prendre la forme d'aberrations chromosomiques (§ 5.4.4.1).

Les bases modifiées

Le schéma réactionnel de l'oxydation des bases azotées est le même quelle que soit la base considérée. Ainsi, on assiste tout d'abord à la perte d'un électron, conduisant à la formation d'un radical cation. A partir de cette étape, le radical peut soit perdre un proton soit s'hydrater.

Il est toutefois intéressant de remarquer que la guanine possède le potentiel d'oxydation le plus bas des bases azotées. Elle est donc la plus sensible aux réactions d'ionisation.

5.4.3.2 - Effets indirects sur le statut oxydatif cellulaire et leurs conséquences

Comme nous avons pu le voir précédemment, les effets indirects des rayonnements ionisants sont liés au phénomène de radiolyse des molécules d'eau ayant pour conséquence l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans le milieu intracellulaire. De ce fait, les conséquences moléculaires de ces effets indirects sont celles de l'instauration d'un stress oxydant, précédemment décrites (§ 5.3.1.1).

5.4.4 - Conséquences cellulaires et subcellulaires

5.4.4.1 - Atteintes géniques et chromosomiques

L'étude de l'importance relative des effets chimiques et radiologiques de l'uranium en terme de génotoxicité a notamment été l'objet d'une publication de [Miller et al. \(2002b\)](#). Dans le souci de caractériser la contribution relative des propriétés chimiques et radiologiques de l'uranium, l'apparition d'aberrations chromosomiques telles que des dicentrismes ont été mesurées. Les résultats de cette étude montrent ainsi qu'une augmentation de la fréquence des chromosomes dicentriques n'est induite que par l'uranium appauvri et non pas après exposition au nickel. Or, une précédente étude ([Schmid et al., 1997](#)) a permis de montrer que de faibles doses de radiations caractérisées par un fort transfert d'énergie linéique (TEL) peuvent induire une augmentation de ce type d'aberrations chromosomiques. De ce fait, l'induction de telles aberrations par l'uranium suggère que ses caractéristiques radiologiques peuvent influencer sur sa capacité à induire à la fois des dommages génotoxiques et une transformation néoplasique. Ceci révèle donc un effet des radiations dans la toxicité de l'uranium appauvri *in vitro* ([Miller et al., 2002b](#)).

Sur des modèles *in vivo*, les cellules germinales (spermatogonies et spermatocytes primaires) de souris mâles exposées à de l'uranium enrichi injecté au niveau testiculaire présentent des aberrations chromosomiques (Hu et Zhu, 1990). Chez l'Homme, différentes études menées chez des cohortes de personnes travaillant dans des mines d'uranium ont fait l'objet d'investigations relatives à l'apparition d'aberrations chromosomiques (Meszaros et al., 2004). Cependant, les résultats obtenus ont été liés à l'exposition aux émissions radioactives du radon et non à un quelconque effet radiotoxique de l'uranium. Par exemple, une étude menée sur des mineurs namibiens a permis de détecter de nombreuses anomalies chromosomiques au niveau de cellules sanguines. Cependant, aucune mention n'est faite quant à la possibilité d'une exposition au radon ni même d'une atteinte chimiotoxique de l'uranium (Zaire et al., 1997).

Ces effets génotoxiques vont pouvoir influencer sur le devenir des cellules (apoptose[?], nécrose, cancérisation) et notamment être à l'origine d'anomalies héréditaires (figure 7).

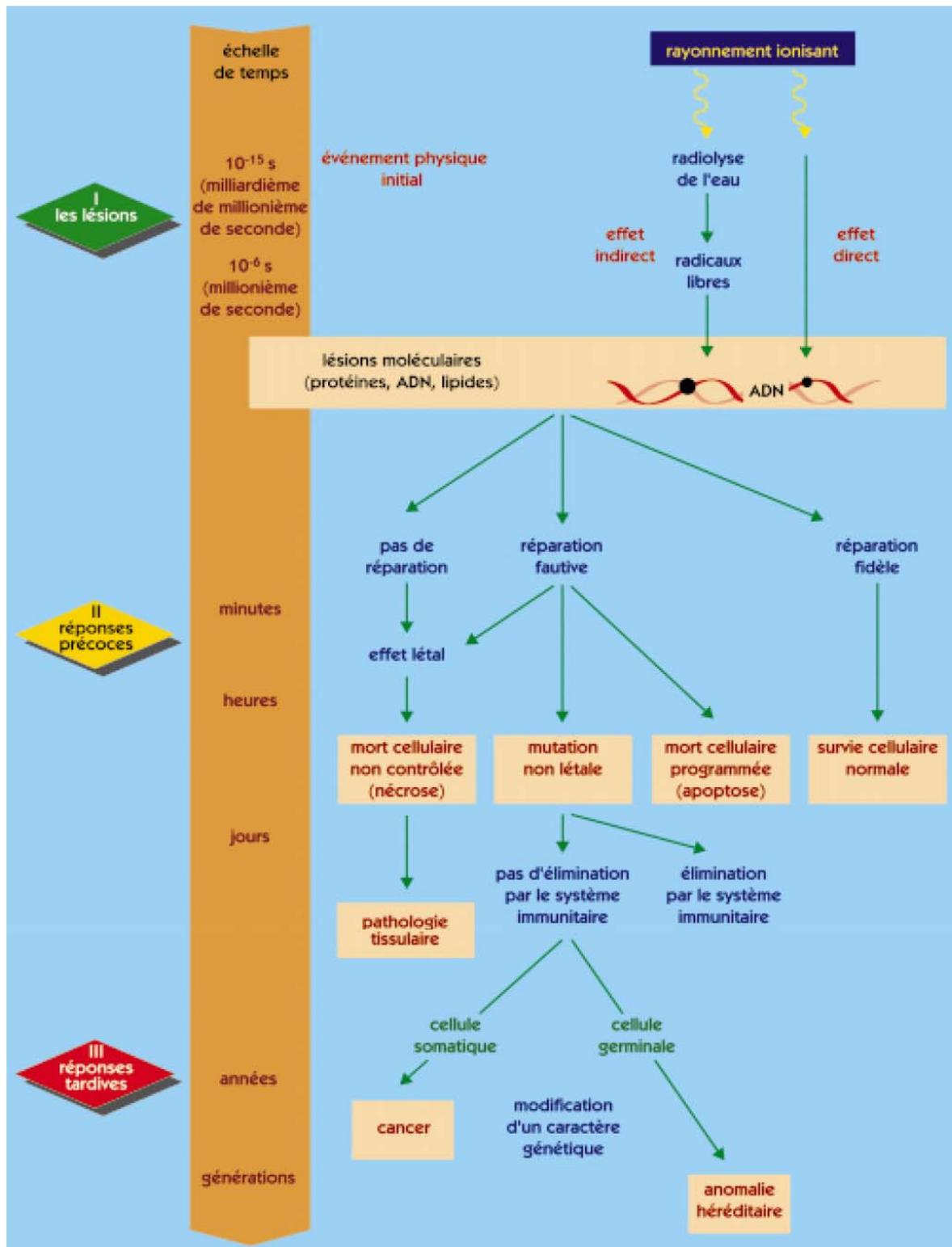


Figure 7. Effets biologiques des rayonnements ionisants. Evolutions possibles au niveau cellulaire en fonction du temps. (Moustacchi et al., 2000)

NB : Tous les évènements indiqués n'ont pas la même probabilité de se produire. La survie cellulaire normale, par exemple, est le cas le plus fréquent après réparation de l'ADN.

5.4.4.2 - Cancérogénèse radio-induite

S'il est difficile de distinguer un cancer radio-induit d'un autre, l'étude de certains gènes semble indiquer que le spectre de mutations induit par les rayonnements ionisants diffère du spectre de mutations spontanées. Peu de données existent à ce sujet et aucune d'entre elles n'a permis de décrire les mécanismes cellulaires impliqués dans les phénomènes de cancérisation radio-induits. Néanmoins, quelques études mentionnent l'apparition de cancers radio-induits suite à des scénarii d'exposition à l'uranium ([Mitchel et al., 1999](#) ; [Leach et al., 1973](#)) (§ 5.4.5.1).

5.4.4.3 - Mort cellulaire

Une des conséquences de l'induction de lésions peut être la mort cellulaire programmée (ou apoptose). Ainsi, une très forte dose d'irradiation s'accompagne généralement en quelques heures de l'arrêt des fonctions cellulaires et d'une cytolyse. C'est le moindre mal, car les lésions sont éliminées en même temps que la cellule. Cette mortalité dépend de la dose reçue, et n'atteint des taux élevés, dangereux pour la survie de l'organe touché ou de l'individu, que pour des fortes doses d'irradiations. Elle dépend toutefois aussi du tissu et du moment de la vie de l'individu.

5.4.4.4 - Les effets "non-ciblés" des radiations ionisantes

Au cours de la dernière décennie est apparue la preuve de l'existence de deux phénomènes cellulaires qui remettent en question les paradigmes classiques concernant l'induction d'effets biologiques par les rayonnements ionisants. Ainsi, selon ces paradigmes, (i) les dommages à l'ADN se produiraient pendant (ou très peu de temps après) l'irradiation des noyaux des cellules visées et (ii) la probabilité d'apparition de ces dommages se limiterait à une (voire deux) génération(s) de cellules ([Grosovsky, 1999](#)).

Or, quelques éléments probants ont maintenant émergé et remettent en cause les effets classiques résultant des dommages ciblés à l'ADN. Ces effets, dits "non-ciblés", s'expriment sous la forme d'importantes modifications génétiques survenant dans des cellules n'ayant pas été elles-mêmes exposées aux rayonnements ionisants ([Belyakov et al., 2001](#)). Il existe ainsi deux types d'effets "non-ciblés" : des effets de proximité (ou "effets bystander") et une instabilité génomique transmissible dans les cellules (pouvant survenir chez les descendants des cellules irradiées

originellement, après plusieurs générations de réplication). La caractéristique principale des effets "non-ciblés" est leur survenue particulière à de faibles doses.

(1) L'effet "bystander"

L'effet bystander induit par les rayonnements est ainsi un phénomène par lequel des dommages cellulaires (échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques, apoptose, micronucléation, transformation, mutations et expression de gène) sont exprimés dans des cellules non irradiées mais voisines d'une ou plusieurs cellules irradiées (Nagasawa et Little, 1992 et 1999).

Un article récent (Zhou et al, 2000) a démontré que des cellules irradiées par des particules alpha pouvaient induire un effet mutagène de proximité dans les cellules voisines non directement traversées. Les auteurs démontrent également que le processus de communication de cellule à cellule joue un rôle critique dans la médiation de cet effet.

Le mécanisme de l'effet bystander n'est pas encore connu. Cependant, il y a des preuves que l'effet bystander peut avoir au moins deux voies différentes pour le transfert des dommages des cellules irradiées aux voisines non irradiées : par les jonctions de cellule à cellule ("*gap junctions*") ou par des facteurs émis dans le milieu extracellulaire.

Azzam et al (1998) ont ainsi démontré que l'effet bystander dépend de la communication intercellulaire dans les cultures confluentes de fibroblastes diploïdes humains exposés à des flux bas d'irradiation alpha. Ils ont notamment prouvé que les voies métaboliques p53 et p21 sont activées.

Le deuxième mécanisme de l'effet bystander proposé est la médiation de l'effet par la sécrétion de facteurs dans le milieu extracellulaire (Mothersill et Seymour, 1997 ; Cummins et al, 1999). Une série d'études (Lehnert et Goodwin, 1997a,b ; Narayanan et al, 1997) suggèrent un mécanisme alternatif dans lequel les cellules irradiées sécrètent des cytokines ou d'autres facteurs qui agissent pour augmenter les taux intracellulaires de formes réactives d'oxygène dans les cellules non irradiées. Narayanan et al (1997) ont montré que des facteurs issus du milieu de culture de cellules irradiées peuvent induire une augmentation des taux intracellulaires de formes réactives de l'oxygène, y compris le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ils pourraient jouer un rôle important dans le phénomène de transfert des dommages.



Les effets bystander radio-induits ont été largement décrits *in vitro* et *in vivo* sur des cellules d'une même lignée ou d'un même organisme, mettant en avant l'effet d'une communication intercellulaire. Cependant, peu d'études se sont portées sur une communication interindividuelle. Dans l'étude *in vivo* de [Mothersill et al. \(2006\)](#), des truites arc-en-ciel juvéniles ont été soumises à une irradiation de 0,5 Gy (dose reçue au niveau de l'organisme entier) avant d'être mises en contact pendant 2 h avec des poissons non irradiés. De plus, d'autres individus non irradiés ont été placés pendant 2 h dans une eau ayant préalablement contenu des poissons irradiés. A l'issue des 2 h de contact, les poissons (mis en présence de truites préalablement irradiées ou placés dans une eau en ayant contenu) ont été euthanasiés afin de procéder à différents prélèvements tissulaires (peau, nageoire, branchies, rein et rate). Les explants ainsi obtenus ont ensuite été mis en culture. Après 2 j, du milieu de culture a été collecté et analysé pour déterminer si un effet de type bystander a été induit. Après 14 j, des mesures de protéines impliquées dans la réponse aux radiations ont été effectuées. Des réponses significatives ne sont obtenues que pour les poissons mis en présence d'individus irradiés. Elles varient selon le tissu considéré, les branchies de même que les nageoires semblent être ceux pour lesquels la réponse est la plus prononcée. Ces résultats suggèrent que des facteurs de communication conduisant à l'induction de réponses spécifiques aux radiations peuvent être échangés entre les poissons, ces facteurs étant probablement sécrétés dans le milieu environnant sous la forme de messagers chimiques.

(2) L'instabilité génomique

Une autre conséquence de l'exposition cellulaire aux radiations est l'installation d'une instabilité génomique, qui accélère l'accumulation de mutations qui s'ajoutent à celles induites initialement. L'instabilité génomique induite par le rayonnement est définie comme une élévation persistante dans le taux d'apparition *de novo* de changements génétiques (mutations, aberrations chromosomiques et micronuclei) chez une population clonale ([Little et al, 1997](#); [Ulrich et Ponnaiya, 1998](#)). Les cellules clonales subissent donc une sénescence accélérée, avec un risque accru de dérapage vers la transformation néoplasique. Cependant, ce processus ne semble guère concerner le risque héréditaire, bien que des instabilités génomiques aient été décrites chez des descendants d'irradiés ([Calmet et al., 2003](#)).

5.4.5 - Effets observés au niveau des tissus et organes

Les cibles principales de la radiotoxicité de l'uranium sont l'appareil pulmonaire et le tissu osseux pour lesquels les seuils de toxicité fixés par le CIPR sont respectivement de 2,5 mg et 59 µg d'uranium par jour chez l'Homme (Ribera et al., 1996).

5.4.5.1 - Radiotoxicité pulmonaire

Une étude menée par Mitchel et al. (1999) sur des rats soumis à des inhalations quotidiennes d'uranium naturel (à raison de plus de 4 h/j, 5 j par semaine pendant 65 semaines) a mis en évidence l'apparition de tumeurs pulmonaires primaires malignes et bénignes. Deux concentrations ont été testées. Aucune différence dans la durée d'apparition des tumeurs n'a été constatée, cependant, la fréquence d'apparition des tumeurs malignes est apparue proportionnelle au débit de dose reçue.

Lors d'inhalation, les composés d'uranium insolubles persistent dans le système respiratoire et peuvent être responsables d'une irradiation locale et interne des poumons (Leach et al., 1973). Dans les poumons, l'action radiotoxique de l'uranium serait avant tout cancérogène dont les deux effets les plus connus à long terme sont la formation de fibroses pulmonaires et la transformation néoplasique (Leach et al., 1973).

Chez l'Homme, différentes études épidémiologiques ont concerné diverses cohortes d'individus exposés à l'uranium : des mineurs, des victimes d'Hiroshima et Nagasaki, mais aussi des vétérans de la guerre du Golfe ou des Balkans (Kathren et Moore, 1986 ; Kathren et al., 1989 ; ATSDR, 1999 ; Ritz et al., 2000 ; Mould et al., 2001 ; McDiarmid, 2001b ; Tirmarche et al., 2004). Cependant, dans la plupart des cas, aucune augmentation de l'incidence de cancers quels qu'ils soient n'a pu être attribuée aux effets radiotoxiques de l'uranium. En effet, de part l'importance de facteurs confondants tels que l'exposition aux émissions γ du radon chez les mineurs, l'exposition à des agents chimiques cancérigènes tels que le benzène contenu dans les feux de puits de pétrole en Irak ou la mort prématurée des individus (notamment pour les militaires), aucun lien direct n'a pu être établi entre l'émission de radiations ionisantes issues de la décroissance radioactive de l'uranium et des phénomènes de cancérisation (Roscoe, 1997; Hornung et al., 1998; Tirmarche et al., 2004).

5.4.5.2 - Radiotoxicité osseuse

La présence d'émetteurs alpha tels que les isotopes de l'uranium au sein du tissu osseux peut engendrer des complications graves telles que l'apparition de radionécroses de l'os (phénomène qui correspond à la rupture d'un équilibre entre la matrice et les cellules osseuses, conduisant à une perte de substance ou à la mort cellulaire). De même, l'augmentation significative de l'induction de tumeurs osseuses (Wrenn et al., 1985 et 1987 ; Bosshard et al., 1992 ; Ribera et al., 1996) ainsi que des atteintes de la moelle osseuse peuvent survenir. Pour exemple, chez l'Homme, une dose seuil au-delà de laquelle l'incidence des tumeurs osseuses serait significativement accrue a été fixée à 0,8 Gy (appartenant au domaine des fortes doses).

Des études révèlent que les pathologies osseuses radio-induites sont en relation directe avec la répartition et la durée effective de rétention du radionucléide dans le squelette. En fonction du site de rétention et de la nature des rayonnements émis, l'irradiation touchera majoritairement la matrice osseuse calcique et/ou les cellules osseuses impliquées dans la formation et le remaniement de l'os. La dose moyenne délivrée localement dans les différentes parties du squelette représente donc le paramètre prépondérant à l'origine des effets biologiques radio-induits (radionécroses, tumeurs osseuses).

5.4.5.3 - Radiotoxicité rénale

Le tissu rénal est considéré comme peu radiosensible aussi bien en ce qui concerne les effets déterministes à court terme que les effets stochastiques à long terme. Les études histologiques n'ont pas permis de définir le site initial du dommage rénal (vasculaire, glomérulaire ou tubulaire). L'expression retardée du dommage est due au fait que les cellules rénales sont à renouvellement lent et que l'apparition et l'aggravement des manifestations fonctionnelles sont liées au déclenchement des mitoses qui entraînent la mort cellulaire. A la suite d'une contamination par l'uranium, il existe dans le rein des "points chauds" constitués par des microprécipités de phosphate d'uranium présents dans les cellules tubulaires proximales du rein.

5.4.5.4 - Radiotoxicité neurologique

Il a été montré que dans certaines conditions d'expositions chroniques, l'uranium peut atteindre le système nerveux central de rats (Gilman et al., 1998a,b,c ; Pellmar et al., 1999b).

L'étude de [Houpert et al. \(2005\)](#) apporte de nouvelles informations relatives au comportement de l'uranium vis-à-vis du système nerveux.

Dans le cadre de ce travail, les effets sur le cycle sommeil-éveil ainsi que sur le comportement ont été étudiés après exposition chronique à de l'uranium enrichi ou appauvri par voie orale. Il a été démontré que les rats exposés durant six semaines à de l'uranium enrichi en ^{235}U (4 % de la composition isotopique) par leur eau de boisson ont accumulé deux fois plus d'uranium dans des zones cérébrales telles que l'hippocampe, l'hypothalamus et les glandes surrénales que les individus exposés à de l'uranium appauvri. Cette accumulation semble en outre corrélée avec une augmentation de la durée du sommeil paradoxal, une réduction des capacités relatives à la mémorisation de l'environnement spatial ainsi qu'une anxiété accrue. En effet, les trois sites d'accumulation précédemment mentionnés sont connus pour être impliqués dans les processus comportementaux répertoriés comme étant affectés. Ainsi, l'étude de [Houpert et al.](#) souligne que l'hippocampe est impliqué dans la mémoire de l'environnement spatial et l'axe "hypothalamus - hypophyse - glandes surrénales" intervient dans la gestion du cycle sommeil-éveil ainsi que dans les comportements anxieux.

L'exposition à de l'uranium appauvri dans des conditions comparables n'a pas induit d'effets comparables à ceux-ci, suggérant que l'activité radiologique est à leur origine.

Les mécanismes par lesquels l'uranium induit de tels effets restent encore à élucider. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que, lors de cette étude, la quantité d'uranium retrouvé dans les reins n'a été que de 0,12 mg d'U/g de tissu, c'est-à-dire bien en deçà de concentrations décrites comme étant néphrotoxiques soit 1,2 mg d'U/g selon [Diamond et al. \(1989\)](#). Ceci contribue donc à nuancer le fait que les reins soient la cible la plus sensible des effets toxiques de l'uranium.

Dans l'étude de [Houpert et al. \(2005\)](#), une question reste cependant sans réponse pour les auteurs. En effet, l'uranium enrichi n'a pas été distribué au sein des différentes régions cérébrales de la même façon que l'uranium appauvri. Or, l'uranium, qu'il soit appauvri ou enrichi, a été introduit sous la même forme chimique à l'eau de boisson et au même pH. Cela signifie que les espèces chimiques mises en jeu ont été les mêmes. La seule différence séparant l'uranium enrichi de l'appauvri réside dans leurs activités spécifiques respectives. De ce fait, l'accumulation différentielle de l'uranium enrichi ne peut être expliquée que par le fait que son activité

radiologique soit quatre fois plus importante. Les auteurs suggèrent que ces résultats mettent en évidence le fait que la composition isotopique influe sur le dépôt et la distribution de l'uranium dans les différentes régions cérébrales. Les mécanismes sous-jacents n'ont cependant pas été identifiés.

5.4.5.5 - Radiotoxicité et reproduction

Les lésions causées par l'irradiation des organes de la reproduction peuvent entraîner deux types d'effets : la mort cellulaire, avec une diminution transitoire ou définitive de la fertilité, ou des mutations dans les cellules germinales pouvant être transmises lors de la fécondation et se manifester en tant que désordre héréditaire chez les descendants de l'individu exposé.

Le développement de modèles expérimentaux d'irradiations des gonades après contamination interne est resté très modeste, car les premières expériences menées sur les actinides ne démontraient pas de forte affinité pour ces organes, notamment par rapport aux principaux organes de dépôt et de rétention (poumon, squelette, rein).

Par contre, certaines études font état de dommages chromosomiques sur les spermatogonies de rongeurs exposés à de l'uranium enrichi. En effet, l'induction d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales a également été observée chez des souris mâles exposées par injection intratesticulaire de fluorure d'uranyle contenant de l'uranium enrichi (Hu et Zhu, 1990).

Chez l'Homme, on considère généralement que, pour les gonades, le seuil de stérilisation pourrait varier d'un facteur 10 (entre 1 et 10 Gy) selon le moment de l'irradiation dans la vie de l'individu et son sexe (Calmet et al., 2003).

Même si le risque d'effets héréditaires radio-induits n'est pas au premier plan des risques des rayonnements et si les niveaux de contamination par des actinides rendent très improbable l'observation d'effets sur la fertilité, certaines questions relatives aux conséquences sur la reproduction restent en suspens. Dans les gonades, les lésions peuvent conduire à une mutagenèse accrue, à une altération des fonctions hormonales ou de la fertilité (Calmet et al., 2003).

5.4.5.6 - Autres manifestations d'effets radiotoxiques

Différents travaux menés chez des mineurs d'uranium ont permis de conclure à une augmentation de mortalité liée au développement de cancers tel que les cancers de l'estomac, du

rectum, etc. (Laurier et al., 2001). Néanmoins, ces résultats ne sont pas associés à la radiotoxicité de l'uranium mais à celle du radon présent dans l'environnement professionnel de ces individus.

Une relation dose-réponse a été observée pour des cancers hématopoïétiques et lymphopoïétiques chez des travailleurs du nucléaire exposés de manière chronique à des radionucléides, principalement uranium et produits de fission (Ritz et al., 2000). De même, des dommages à l'ADN et des aberrations chromosomiques ont été observés dans les cellules sanguines de travailleurs exposés de manière chronique à des composés uranifères ainsi qu'à de faibles doses de radiations ionisantes (Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2003 ; Prabhavathi et al., 1995 ; Prabhavathi et al., 2000, Touil et al., 2002).

SYNTHESE DU CHAPITRE SUR L'URANIUM

Le risque associé à un xénobiotique est la combinaison de deux composantes : l'exposition (concentration, temps de contact, etc.) et le danger (toxicité). Au travers de ce premier chapitre, nous avons pu voir qu'un certain nombre de données relatives aux niveaux d'exposition environnementaux ainsi qu'à la toxicité de l'uranium sont disponibles dans la littérature.

En terme d'exposition, nous avons pu voir que l'uranium est un radionucléide naturellement présent dans l'environnement. Néanmoins sa distribution dans les différents compartiments environnementaux peut être notablement influencée par les activités humaines. Ces activités anthropiques peuvent en effet influencer directement sur les concentrations auxquelles on retrouve l'uranium dans les écosystèmes, conduisant par exemple à l'observation de zones géographiques très fortement impactées par l'uranium (du fait notamment de l'exploitation de minerais uranifères). La gamme des concentrations environnementales de l'élément est donc très large, s'étirant de quelques ng/L à quelques mg/L dans les systèmes aquatiques.

L'examen de sa toxicité nous a quant à lui permis de constater que les caractéristiques chimiques (métal lourd) et radiologiques (émetteur α) de l'uranium sont à l'origine d'un certain nombre d'effets délétères chez les organismes. L'uranium est ainsi capable d'agir à différents niveaux de l'organisation biologique : depuis les interactions moléculaires (déséquilibre de la balance oxydative cellulaire, altérations de macromolécules biologiques : ADN, protéines, etc.), jusqu'à l'observation d'altérations histologiques (nécroses, cancérisation, etc.) voire d'effets délétères sur certaines grandes fonctions physiologiques (excrétion, reproduction, etc.).

Il semblerait donc que l'uranium constitue un risque pour les biocénoses. Néanmoins, la majeure partie des informations toxicologiques relatives à l'uranium fait référence à des études menées sur l'Homme ou des modèles animaux qui en sont proches (notamment les rongeurs). Dans la littérature, nous avons ainsi pu recenser plus de 250 publications relatives à de telles études alors que seule une quarantaine d'articles porte sur les effets de l'uranium sur des organismes aquatiques (poissons et bivalves pour la plupart). Il s'agit donc maintenant de déterminer en quelle mesure nous pourrions accroître les connaissances disponibles sur la toxicité environnementale de l'uranium et, plus particulièrement, sur sa toxicité envers les biocénoses aquatiques.

Si l'on s'intéresse en détail aux données de toxicologie disponibles à la fois sur les modèles "mammifères" et "poissons", il semblerait que les effets de l'uranium ou, du moins, les mécanismes mis en jeu soient les mêmes (comportement toxicocinétique, instauration d'un stress oxydant, phénomènes inflammatoires, néphrotoxicité, etc.). Si l'on s'appuie sur ces similitudes, nous pouvons donc supposer que les données bibliographiques disponibles sur l'Homme et les rongeurs peuvent constituer de solides bases sur lesquelles fonder notre projet d'étude environnementale.

Le prochain chapitre nous permettra de présenter quels sont les outils disponibles dans le domaine de l'évaluation d'un risque toxicologique environnemental. Nous verrons ainsi en quelle mesure nous pourrions concilier les "pistes de recherche" mises à jour au travers du présent chapitre et les "outils d'évaluation" potentiellement disponibles.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II. OUTILS D'ÉVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE



ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II. OUTILS D'ÉVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE

1 - L'ECOTOXICOLOGIE

L'évaluation des conséquences toxicologiques de la présence d'un xénobiotique au sein d'un écosystème aquatique est complexe. Cette démarche suppose une approche intégrative de différents paramètres. En effet, la seule présence d'un xénobiotique dans un système écologique donné ne constitue pas, en soi-même, un élément suffisamment pertinent pour en déduire un risque pour les biocénoses. Des liens doivent être établis entre les niveaux externes d'exposition (mesures chimiques de la présence du contaminant dans l'écosystème), les niveaux internes de contamination tissulaire (sa bioaccumulation^① dans les organismes) et les effets biologiques induits. Ainsi, l'exposition, le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes aquatiques nécessitent une étude écotoxicologique multiparamétrique.

Contrairement au domaine de la toxicologie humaine, l'unité biologique visant à être préservée en écotoxicologie n'est pas l'individu mais la population. Cependant, les effets préjudiciables au niveau des populations exposées sont souvent difficiles à détecter. En effet, la plupart des effets induits à ce niveau d'organisation biologique ne tendent à se manifester que dans des situations d'exposition extrêmes (durées d'exposition importantes et/ou concentrations élevées). Ainsi, quand l'effet devient finalement identifiable au niveau populationnel, le processus toxicologique peut avoir pris des proportions telles que le point au-delà duquel des actions de remédiation ou de réduction du risque sont encore possibles a sans doute été dépassé.

Le défi de l'écotoxicologie réside donc dans le fait qu'il s'agira de repérer des dommages préjudiciables aux populations bien en amont de leur apparition. Afin de comprendre la cascade d'évènements aboutissant à l'apparition de ces effets, l'ordre séquentiel des réponses à un stress est présenté en **figure 8**.

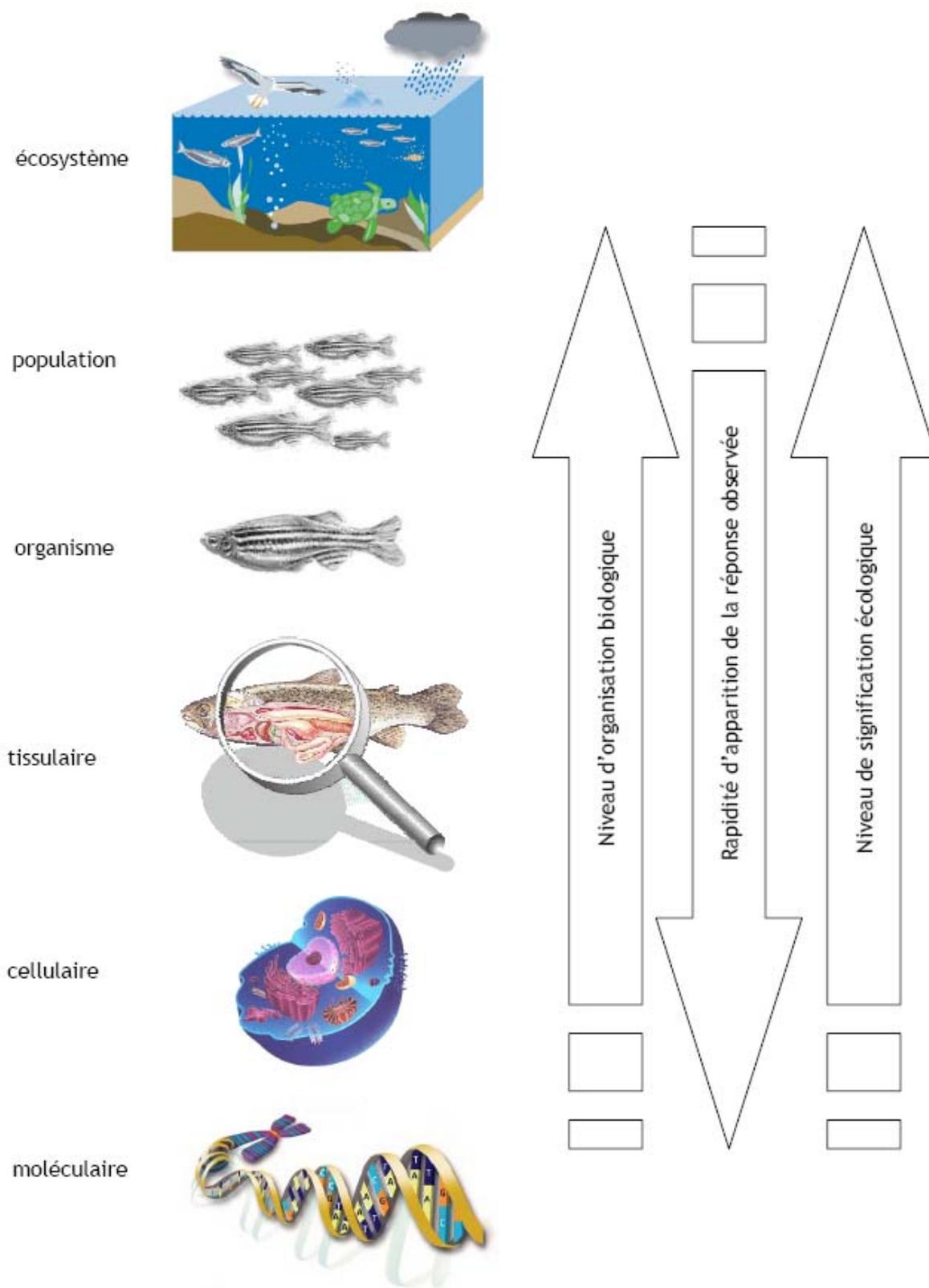


Figure 8. Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique (modifié d'après van der Oost et al., 2003)

Ces enjeux impliquent donc, en théorie, la nécessité de développer des outils permettant une détection précoce de la toxicité exercée par un contaminant. Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont, le plus souvent, précédés par des changements de processus biologiques à des niveaux inférieurs. C'est sur la base de ce postulat que le développement d'indicateurs biologiques prédictifs d'effets plus tardifs a été motivé (van der Oost et al., 2003). Pour cela, des paramètres biologiques sont utilisés comme signaux d'alarme : les biomarqueurs¹ (Bucheli et Fent, 1995).

En résumé, dans le contexte environnemental, les biomarqueurs offrent l'avantage d'être des indicateurs sensibles démontrant que le contaminant a été internalisé par l'organisme, a été distribué dans les différents tissus et a induit des effets toxiques au niveau de cibles spécifiques (McCarthy and Shugart, 1990).

Néanmoins, il est important de mentionner qu'après bientôt deux décennies durant lesquelles la communauté scientifique a largement contribué au développement des biomarqueurs, de nombreuses interrogations restent en suspens quant au bien-fondé de l'engouement porté à cette approche dans le domaine de l'évaluation du risque écotoxicologique. En effet, depuis quelques années, différents documents tentent de dresser un bilan des études menées sur les biomarqueurs à ce jour et certaines zones d'ombre transparaissent, nuanciant quelque peu l'émulation des premières heures (Forbes et al., 2006). Ainsi, les "pionniers" dans le domaine des biomarqueurs présentaient cette approche comme une solution permettant de réduire les coûts des programmes de surveillance environnementale du fait que les mesures à des niveaux d'organisation biologique supérieurs deviendraient moins nécessaires voire inutiles (McCarthy, 1990). Cependant, au regard des études menées depuis cette période, cet objectif semble irréaliste. En effet, le raccourci consistant à dire que le suivi de biomarqueurs suffirait à estimer l'état de santé des écosystèmes n'est pas permis. En effet, si l'on considère la quantité d'informations additionnelles nécessaires à l'interprétation correcte des réponses observées au niveau des biomarqueurs, il semble que cette approche n'est pas si "directe" et économique qu'on le laisse penser. Ainsi, en l'absence de modèles mécanistiques permettant de relier pertinemment les réponses des biomarqueurs à des effets avérés sur des paramètres tels que la *fitness*¹ (survie et reproduction) d'un organisme, l'utilisation des biomarqueurs ne peut prétendre qu'à contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'action des agents polluants sur les organismes. En effet, l'étude

des biomarqueurs ne permet pas de conclure quant à un éventuel risque écotoxicologique car elle ne permet pas d'évaluer ou de prédire l'impact d'un xénobiotique sur les populations, les communautés ou les écosystèmes (Forbes et al., 2006).

2 - LES BIOMARQUEURS : NOTIONS ET CONCEPTS

2.1 - Définition et rôle(s) biologique(s)

Différentes définitions ont été données au terme "biomarqueur". Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (WHO, 1993).

La définition ayant été retenue par Lagadic et al. (1997) est la suivante : un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental (Peakall, 1994).

A ce stade, il est important de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, ce que l'on considère comme biomarqueur consiste en une modification d'une structure ou encore en une variation anormale d'une activité biologique. Or, dans des conditions normales, toute structure ou activité biologique joue un rôle dans l'état d'homéostasie¹ d'une cellule, d'un tissu, d'un organisme ou même d'une population. En ce sens, l'analyse de son rôle fonctionnel présente un intérêt important.

Ainsi, selon Depledge (1994), en deçà d'une certaine pression toxique (exposition à des concentrations et/ou des durées importantes), on considère que le métabolisme basal des organismes suffit à assurer le maintien de leur homéostasie. En d'autres termes, le fonctionnement des différentes structures et activités biologiques "tamponne" l'action des polluants sur les individus lorsque celle-ci est relativement limitée. En effet, qu'elles soient spécifiquement

impliquées dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures ou non, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxiques dans le milieu.

Néanmoins, au-delà d'un certain seuil (en termes de concentration du contaminant ou de temps de contact), les capacités de maintien de l'homéostasie peuvent être dépassées, ceci pouvant finalement mener à la manifestation d'effets néfastes à des niveaux hiérarchiques supérieurs (Fig. 9). Ainsi, lorsque les capacités de compensation ne sont plus suffisantes pour limiter l'action des polluants toxiques, l'état de santé des individus contaminés peut évoluer vers une dégradation, réversible ou non selon le degré d'atteinte toxique.

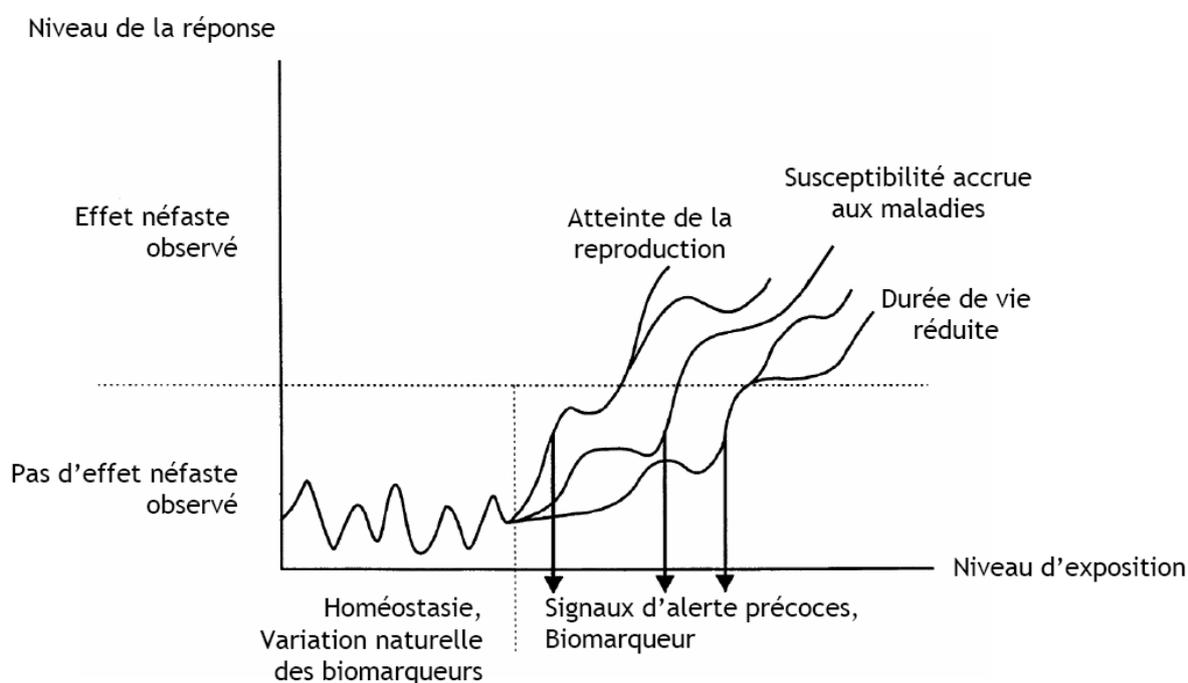


Figure 9. Représentation graphique des niveaux de réponses attendus en fonction du niveau d'exposition à un facteur de stress (d'après van der Oost et al., 2003).

2.2 - Biomarqueurs d'exposition, d'effet, de susceptibilité

Il est classique, en écotoxicologie, de distinguer trois types de biomarqueurs: les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets (Lagadic et al., 1997 ; van der Oost et al., 2003).

Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s). Il peuvent être le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels (métabolites spécifiques de la conjugaison au glutathion, adduits à l'ADN, etc.). Dans ce cas, leur suivi consiste en la détection au sein d'un individu de métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles (adduits à l'ADN par exemple). Les biomarqueurs d'exposition peuvent également prendre la forme d'activités ou de quantités anormales d'enzymes (telles que celles impliquées dans les activités de biotransformation). En effet, certaines enzymes sont capables d'être induites ou activées par les polluants, cette induction pouvant revêtir un caractère plus ou moins spécifique d'un type de polluant donné.

L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique. Il s'agit donc d'altérations (biochimiques, physiologiques ou autres) mesurables au sein des tissus ou des fluides corporels d'un organisme et pouvant être reconnues comme étant associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état sanitaire altéré.

Les biomarqueurs de susceptibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques. En effet, cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (tels que les gènes codant pour les isoenzymes des mono-oxygénases à cytochrome P450, les glutathion-S-transférases, les N-acétyl-transférases) ou dans la réparation des lésions de l'ADN (tels que les gènes impliqués dans la réparation des bases et dans la réparation des cassures de brins). Néanmoins, malgré l'intérêt croissant suscité par le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par les polluants, les études incluant le suivi de biomarqueurs de susceptibilité sont rares. Les facteurs impliqués sont en effet très complexes tant au niveau de la multiplicité des nuisances rencontrées en milieu environnemental que de la multiplicité des voies métaboliques et des mécanismes de réponse. Par contre, leur intérêt principal pourrait résider dans leur capacité à fournir un éclairage nouveau sur l'interprétation collective des

biomarqueurs d'exposition et d'effet, ce qui encourage leur développement ([Livingstone, 1993](#) ; [Depledge et al., 1993](#); [Lagadic et al., 1994](#)).

Cette subdivision des biomarqueurs dans la littérature est quelque peu imprécise du fait que les biomarqueurs d'exposition et d'effet se distinguent plus de part la manière dont ils sont utilisés que par une réelle dichotomie ([Suter, 1993](#)). Les réponses des biomarqueurs peuvent ainsi être interprétées comme étant des effets biologiques ou biochimiques induits suite à l'exposition à l'agent toxique ; ceci conférant théoriquement à ces réponses la capacité de mettre en évidence à la fois l'exposition et les effets toxiques.

Cas de la bioaccumulation

La bioaccumulation au sein des organismes de certains contaminants environnementaux persistants peut être considérée comme étant un biomarqueur d'exposition ([NRC, 1987](#) ; [WHO, 1993](#)). Cependant, si l'on se base sur les définitions proposées par [Van Gestel et Van Brummelen \(1996\)](#), les teneurs corporelles ne peuvent pas être considérées comme des biomarqueurs du fait qu'elles n'informent pas d'éventuelles altérations biologiques. Dans le but d'éviter de telles confusions, les données de chimie analytique relatives aux mesures des teneurs en contaminant des organismes seront regroupées dans ce chapitre sous le terme de "marqueurs chimiques de bioaccumulation", tandis que l'ensemble des marqueurs biologiques (qu'ils soient biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques) mesurés au sein des organismes seront regroupés sous le terme de "biomarqueurs".

2.3 - Qualités requises

Un biomarqueur doit être un indicateur sensible de la biodisponibilité d'un polluant et de réponses biologiques précoces. De manière à évaluer objectivement les qualités des biomarqueurs, six critères sont généralement admis ([van der Oost et al., 2003](#)):

- La technique analytique permettant de quantifier le biomarqueur doit être efficace (en termes de sensibilité, justesse et précision), d'un coût relativement peu élevé et facile à mettre en œuvre ;
- La réponse doit être sensible pour constituer un paramètre d'alarme précoce ;

- Le niveau basal de la variable biologique doit être clairement identifié de manière à distinguer le bruit de fond naturel (variabilité naturelle) du niveau induit par la contamination (signal) ;
- Les mécanismes impliqués dans la relation entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant doivent être connus ou, tout au moins, supposés ;
- La signification toxicologique du biomarqueur (c'est-à-dire la relation entre sa réponse et un impact possible sur l'organisme) doit être établie.

A cela il faut ajouter qu'un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire les effets des polluants sur les populations et communautés (Lagadic et al., 1997). Cette exigence n'est pourtant que rarement satisfaite, les biomarqueurs sont alors étudiés plus pour leur contribution à la compréhension mécanistique de l'action des polluants que pour leur pertinence écologique (Forbes et al., 2006).

En plus de ces critères, il a été suggéré que les biomarqueurs doivent être préférentiellement des outils dont l'utilisation s'avère non-invasive ou destructive pour les organismes, de façon à permettre leur mesure sur des espèces protégées voire en voie de disparition (Fossi et Marsili, 1997).

Les caractéristiques biologiques et physiologiques de l'organisme modèle doivent enfin être connues, de manière à ce que les sources de variations non contrôlables (croissance, développement, reproduction, etc.) soient minimisées (Stegeman et al., 1992).

3 - LES POISSONS, DES ORGANISMES AQUATIQUES MODELES

Les poissons, compte tenu de leur diversité dans le règne animal (28 000 espèces recensées, soit plus que l'ensemble de toutes les autres espèces de vertébrés), de leur ubiquité dans les eaux de surface (présence dans la quasi-totalité des environnements aquatiques) et de leur position dans les chaînes trophiques, sont parmi les plus à même de constituer de bons intégrateurs de la qualité de l'environnement aquatique (Labrot, 1996). C'est pourquoi un fort intérêt a été porté aux

poissons dans le cadre d'études visant à estimer les réponses biologiques et biochimiques à des contaminations environnementales aquatiques (Powers, 1989).

Les espèces sentinelles doivent en outre être sélectionnées au sein de communautés biocénétiques sur la base de leur pertinence vis-à-vis des types de biomarqueurs choisis ainsi que de leur praticité expérimentale (Suter, 1993). Dans l'optique d'une évaluation de la qualité des écosystèmes, de nombreuses espèces de poissons répondent à ces deux critères (van der Oost et al., 2003). La compréhension des mécanismes de prise en charge des toxiques, leurs comportements ainsi que leurs effets chez les poissons peuvent, de ce fait, constituer des éléments dont la pertinence écologique est importante.

Cependant, selon les différentes espèces de poisson considérées, des variations considérables peuvent exister, notamment au niveau de leurs caractéristiques physiologiques ou de leurs capacités de réponse vis-à-vis d'évènements de contamination. Bien que le modèle poisson puisse présenter certains inconvénients tels que sa mobilité parfois importante, il est généralement considéré comme l'organisme dont l'étude est la plus pertinente dans le cadre de surveillance des écosystèmes aquatiques (van der Oost et al., 2003).

Dans ce chapitre, les différents marqueurs retenus pour cette thèse seront présentés.

3.1 - Marqueurs chimiques de bioaccumulation chez les poissons

Les marqueurs de bioaccumulation consistent en des mesures des niveaux de contamination en agents toxiques, leurs métabolites et/ou leurs dérivés au sein de différents types cellulaires, tissulaires, dans les fluides corporels ou les excréta.

Dans l'évaluation de l'exposition, une distinction est faite entre la pression de contamination externe (définie comme la quantité d'agent chimique présent dans l'environnement proche de l'organisme, et estimée par le biais des techniques de surveillance chimique) et la pression de contamination interne (quantité d'agent chimique absorbé par l'organisme sur une certaine période, déterminée par la surveillance de la bioaccumulation). Les marqueurs de bioaccumulation et les biomarqueurs d'exposition vont ainsi refléter la distribution de l'agent toxique ou de ses métabolites au sein de l'organisme. Théoriquement, cette distribution peut être

retracée à différents niveaux biologiques (tissus, cellules, etc.), jusqu'aux cibles biologiques du polluant (WHO, 1993).

3.2 - Biomarqueurs chez les poissons

Différents paramètres biochimiques ont été testés chez les poissons pour leur sensibilité vis-à-vis de différentes catégories de stressés environnementaux ainsi que pour l'adéquation de leurs caractéristiques avec celles demandées aux outils d'évaluation, qu'il s'agisse de biomarqueurs d'exposition ou d'effet.

Il est donc possible d'analyser l'impact d'agents toxiques chez les poissons par le biais de différents biomarqueurs d'exposition et d'effet. Parmi ceux-ci peuvent notamment être cités les modulations d'activité et/ou de quantité de certaines molécules telles que les enzymes et produits de biotransformation, les protéines de stress, les métallothionéines et autres facteurs de résistance aux xénobiotiques (MXR) ; les marqueurs de stress oxydant, de génotoxicité, de neurotoxicité ; les modifications de paramètres hématologiques, immunologiques, de reproduction ou encore de paramètres physiologiques et anatomo-morphologiques (van der Oost et al., 2003).

4 - PISTES DE RECHERCHE RETENUES POUR L'ETUDE DE L'URANIUM

Au regard de la synthèse bibliographique précédemment établie sur la toxicologie de l'uranium, certaines pistes d'études peuvent être dégagées. L'objet de cette section sera donc de décrire et de justifier les pistes retenues dans le cadre de notre travail. Nous présenterons pour cela chacune des différentes pistes de recherche du point de vue de leur application dans le domaine général de l'écotoxicologie, à la suite de quoi nous listerons les paramètres biologiques retenus dans le cadre de cette thèse pour l'étude de chacune d'elles.

4.1 - Etude du stress oxydant

Comme présenté dans le chapitre relatif à la synthèse des données issues d'études toxicologiques (I.5), il a été démontré que l'uranium était capable d'initier à la fois chimiquement et radiologiquement un stress oxydant au niveau des organismes exposés. Bien que largement

évoqué précédemment, il semble important de présenter de manière approfondie ce qu'est le stress oxydant et en quoi son étude peut être envisagée dans le cadre du présent travail.

4.1.1 - Le système antioxydant cellulaire

Afin d'éliminer les espèces radicalaires et de limiter les dommages provoqués par le stress oxydant, les cellules disposent de trois mécanismes de défense antioxydant. On pourra ainsi citer : (i) l'élimination des espèces réactives et des catalyseurs de leur formation, (ii) l'induction de la synthèse d'antioxydants et (iii) l'augmentation de l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Une vue d'ensemble des mécanismes enzymatiques de défense qui contribuent à la détoxification des espèces réactives est proposée dans la **figure 10**. Ce schéma illustre la complexité des réactions qui coexistent au sein de la cellule lors d'un stress oxydant.

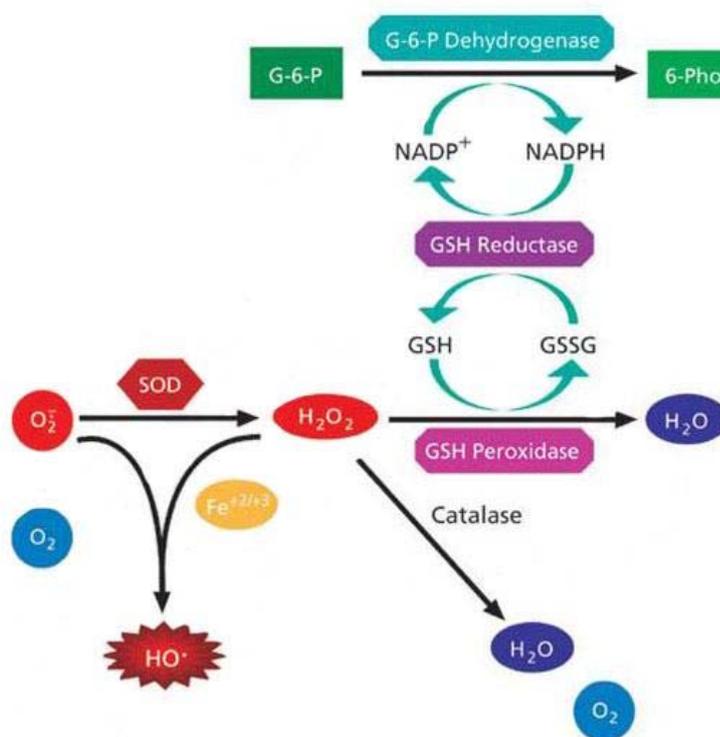


Figure 10. Systèmes enzymatiques impliqués dans la défense antioxydante cellulaire.

4.1.2 - L'étude du stress oxydant, son intérêt en écotoxicologie

Le caractère ubiquiste des processus oxydants et leur implication possible en tant que facteurs de toxicité ont suscité des recherches dans le domaine de l'écotoxicologie. La formation d'oxydants et le déficit en antioxydants étant des signes avant-coureurs potentiels de toxicité, ces paramètres constituent des indicateurs précoces d'une agression toxique, ce qui rejoint la définition précédemment donnée d'un biomarqueur. C'est ainsi que l'étude du stress oxydant et de ses implications toxicologiques chez les organismes aquatiques a été initié il y a une vingtaine d'années, suite à la mise en évidence d'activités enzymatiques antioxydantes chez les poissons (Livingstone, 2001 ; Di Giulio et al., 1989 ; Winston et Di Giulio, 1991 ; Cossu et al., 1997b).

L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse qui se traduit, en général, dans une première phase par une augmentation de l'activité des enzymes impliquées. L'induction d'activité est en général transitoire, relativement modérée et aspécifique. Ce phénomène traduit l'adaptation des organismes à un nouvel environnement. L'inhibition de certaines composantes des systèmes antioxydants peut également survenir, en liaison avec l'altération de l'état des individus et la perte de l'homéostasie cellulaire. Ce phénomène d'inhibition est souvent associé à des effets de peroxydation lipidique qui constitue alors un indice de toxicité relatif à un état de non-compensation des lésions cellulaires initiales. Il semble donc que le suivi de l'induction ou de l'inhibition des systèmes antioxydants en tant que biomarqueurs apparaît pertinent du fait qu'elles traduisent un état de souffrance cellulaire et de toxicité précoce.

Plusieurs exemples d'utilisation chez les poissons des paramètres antioxydants comme biomarqueurs ont été rapportés dans la littérature (Otto et Moon, 1995; Bairy et al., 1996; Paris-Palacios et al., 2000). La grande diversité des modèles animaux aquatiques, des types de polluants testés, des conditions d'exposition, et des organes étudiés rendent difficiles les comparaisons d'une étude à l'autre. Ainsi, divers scénarios (induction, inhibition ou absence d'effet) sont observés d'une étude à l'autre. Ces observations suggèrent que la mesure de ces paramètres donnera des informations sur la physiologie de l'organisme à un temps donné et pour des conditions d'expositions données. L'utilisation de ce type de paramètres en tant que biomarqueurs d'écotoxicité sera donc associée à un certain nombre de contraintes liées aux propriétés même des effets oxydants et des

paramètres de défenses associés : durée de vie très courte des radicaux libres, action très localisée à un type de tissu ou à un organe, aspect transitoire de la réponse biochimique, systèmes de défenses multienzymatiques complexes.

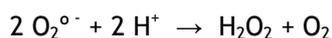
La validation de biomarqueurs de stress oxydant nécessite donc, pour un organisme et un type de polluant donnés, d'identifier les organes cibles potentiels des toxiques et de caractériser la cinétique des réponses des paramètres biochimiques étudiés. De même, du fait de la complexité des systèmes antioxydants et de leurs nombreuses interactions au sein du métabolisme cellulaire, il est généralement nécessaire de mesurer plusieurs paramètres de la défense antioxydante pour pouvoir interpréter l'effet des polluants sur cette dernière.

4.1.3 - Biomarqueurs de stress oxydant retenus pour notre étude

A la suite d'une étude bibliographique sur les biomarqueurs de stress oxydant et d'une collaboration scientifique avec Olivier Palluel et Jean-Marc Porcher, membres de l'Unité d'Evaluation du Risque Ecotoxicologique de l'INERIS, notre choix s'est porté sur le suivi de quatre marqueurs de stress oxydant : l'activité de trois enzymes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) et la concentration d'une molécule clé du système antioxydant (le glutathion). Le choix d'une approche multiparamétrique dans le cas de l'étude du stress oxydant a en effet été motivé par le fait que le système cellulaire de défense antioxydante est complexe et régi par de nombreuses interactions entre l'ensemble de ses éléments (*cf.* [figure 10](#)).

4.1.3.1 - L'activité superoxyde dismutase

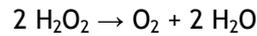
Le catabolisme des espèces réactives de l'oxygène est assuré en premier lieu par les superoxyde dismutases (SOD ; EC 1.15.1.1). Ces enzymes catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, selon la réaction suivante :



D'autres systèmes enzymatiques tels que les catalases ou les peroxydases doivent alors intervenir pour compléter cette action par la prise en charge du peroxyde d'hydrogène formé.

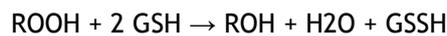
4.1.3.2 - L'activité catalase

Les catalases (CAT ; EC 1.11.1.6) sont des enzymes héminiques localisées dans les peroxysomes d'un grand nombre de tissus, essentiellement le foie et les globules rouges où elles catalysent la décomposition de H₂O₂ en eau et en oxygène selon la réaction :



4.1.3.3 - L'activité glutathion peroxydase

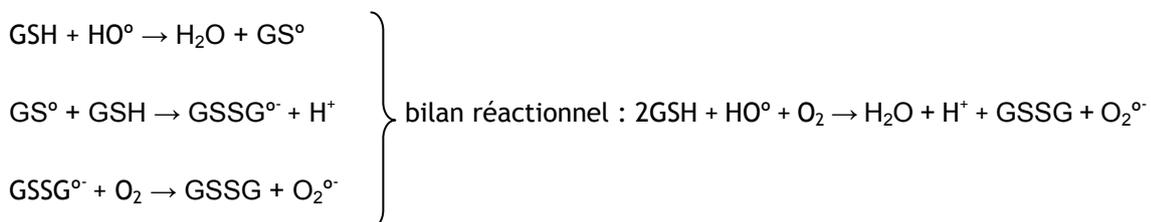
Les glutathion-peroxydases (GPx ; EC 1.11.1.9 à EC 1.11.1.12) utilisent le glutathion comme substrat pour catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène. Cependant, ces peroxydases sont également capables de réduire les peroxydes membranaires issus de l'oxydation des acides gras et du cholestérol, selon le schéma réactionnel suivant :



4.1.3.4 - Le glutathion, un antioxydant non enzymatique

Le glutathion est un tripeptide (L-γ-glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui représente l'un des antioxydants majeurs chez les vertébrés parmi les agents non enzymatiques du système antioxydant cellulaire. Le glutathion est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire.

En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde (schéma réactionnel ci dessous) qui doit être pris en charge par une SOD, ce qui témoigne, là encore, de l'importance de la coopération entre les différents systèmes de défense anti-radicalaire.



Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense anti radicalaire par son implication dans les réactions de détoxication catalysées par la glutathion-S-transférase. L'étude de ce composé semble donc justifiée.

4.1.3.5 - Les tissus d'intérêt

Il faut noter qu'il existe une répartition non équivalente des moyens de défense antioxydants dans les différents tissus. En effet, de nombreuses études rapportent que les moyens de défense antioxydants sont plus importants dans les organes "cibles" où s'accumulent les toxiques générateurs d'espèces réactives de l'oxygène comme le foie et les branchies plutôt que dans les muscles (Aït-Aïssa et al., 2003). L'étude des biomarqueurs de stress oxydant sera donc réalisée au niveau du tissu hépatique.

4.2 - Etude de la génotoxicité

Comme c'est le cas pour le stress oxydant, diverses études toxicologiques et écotoxicologiques présentées dans le chapitre précédent ont fait état du caractère génotoxique de l'uranium. Le suivi de l'intégrité du matériel génétique de cellules issues d'organismes exposés semble donc pertinent dans le cadre de cette thèse.

4.2.1 - Les altérations possibles de l'ADN et leurs mesures

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'exposition à un xénobiotique est susceptible d'initier toute une cascade d'évènements toxiques au niveau moléculaire notamment (Shugart et al., 1992). Cette perspective revêt un caractère particulièrement critique pour l'ADN, compte tenu du rôle clé de cette macromolécule dans l'expression et dans la transmission du patrimoine génétique d'un individu. Ainsi, la mesure qualitative et quantitative des modifications induites sur l'ADN par un xénobiotique devrait permettre de rendre compte de la présence dans l'environnement de substances génotoxiques ainsi que des effets induits par ces dernières.

Il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques et les altérations chromosomiques (effets clastogènes et aneugènes) (voir [tableau V](#)).

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutif à l'action d'un agent génotoxique. On observe tantôt des ruptures de liaisons covalentes qui, lorsqu'elles se situent sur le désoxyribose, conduisent à des cassures de brins, tantôt l'établissement de liaisons covalentes conduisant à des adduits, à des alkylations de bases, à des pontages ADN - ADN intra- ou inter- brins

etc. Ces modifications de la structure chimique de l'ADN font l'objet (ou non) d'une réparation parfaite ou fautive. Dans ce dernier cas de figure, peuvent alors apparaître des mutations, modifications stables du patrimoine génétique transmissibles de division cellulaire en division cellulaire. A ce niveau, on distingue les mutations concernant une à quelques paires de bases, qualifiées de mutations géniques, et les mutations chromosomiques de structure concernant le plus souvent des dizaines de kilobases. La dernière classe de mutations concerne les modifications chromosomiques de nombre (Orsière et al., 2005).

Tableau V. Diversité des altérations de l'ADN et principaux tests de génotoxicité associés (modifié d'après Orsière et al., 2005).

Evènements			
<i>lésions primaires</i>	<i>mutations géniques</i>	<i>altérations chromosomiques</i>	
		<i>structurales</i> (effets clastogènes)	<i>numériques</i> (effets aneugènes)
Types d'altération de l'ADN			
adduits	addition de bases	réarrangements	aneuploïdie
pontages ADN-protéines	délétion de bases	translocations	
pontages ADN-ADN	substitution de bases	micronoyaux	
Cassures de brins			
Tests de génotoxicité et de mutagénéicité			
mesure des adduits	test d'Ames	test des micronoyaux	
post marquage au ³² P	étude du locus hprt	étude de caryotypes	
test des comètes		échange des chromatides sœurs	

La génotoxicologie est une discipline ayant essentiellement pour objet l'identification des agents génotoxiques, la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les phases de bioactivation, d'interaction avec l'ADN, de réparation des lésions primaires, et l'évaluation des conséquences initiales des dites lésions. Compte tenu de la grande diversité des

anomalies susceptibles d'être induites au niveau d'un patrimoine génétique, il n'existe pas un mais plusieurs tests de génotoxicité susceptibles de révéler tels ou tels types de lésions ou de mutations (comme par exemple le tests des comètes, la détection des adduits ou des micronoyaux).

Comme pour le stress oxydant, il convient néanmoins de rappeler que l'atteinte par des composés génotoxiques de la molécule-cible que constitue l'ADN n'est susceptible d'être observée qu'en cas de débordement des systèmes de régulation dont disposent les cellules.

4.2.2 - L'étude de la génotoxicité, son intérêt en écotoxicologie

L'écotoxicologie génétique peut être définie comme étant l'étude des changements induits par un polluant au niveau du matériel génétique des organismes vivants. Ce domaine de l'écotoxicologie revêt deux aspects : (1) initialement, la génotoxicité des polluants (telles que les altérations structurelles de l'ADN) et (2), par voie de conséquence, la résultante et l'expression de ces dommages à l'ADN pouvant conduire à des effets héréditaires sur le long terme tels que des changements de la fréquence de certains gènes dans les populations exposées, des mutations, etc. (Shugart et Theodorakis, 1997). La détection et la quantification d'évènements variés pris dans cette séquence peuvent être utilisées comme biomarqueurs d'exposition et d'effets chez des organismes exposés dans leur environnement à des substances génotoxiques. Au sein de la discipline, la recherche s'est historiquement développée selon trois niveaux (Maccubin, 1994) : (1) l'identification du type et la détermination de la fréquence des maladies génétiques ; (2) l'étude des mécanismes d'altérations génétiques par les agents chimiques ou physiques ; et (3) l'évaluation des agents vis-à-vis de leur capacité à induire des dommages génétiques.

L'évaluation de l'activité génotoxique des polluants pose la question de la signification écotoxicologique de ce phénomène (Nielsen, 1993). Cette question ne peut être dissociée d'une réflexion sur le type cellulaire au niveau duquel une altération de l'ADN est mise en évidence.

L'évolution des populations humaines a amené à une prise en compte de plus en plus forte de l'état de santé de l'individu. Ainsi, des altérations génétiques qui surviennent au sein des cellules somatiques et qui peuvent se traduire par l'apparition de cancers ou d'autres maladies, revêtent une importance prépondérante, et des efforts thérapeutiques considérables sont consentis pour les enrayer. De telles pathologies n'ont pas du tout la même signification vis-à-vis des espèces

animales autres que l'Homme. Or, comme précisé en début de ce chapitre, l'unité biologique visant à être préservée dans le cadre d'études écotoxicologiques est la population et non l'individu. Dans une perspective environnementale, les manifestations génotoxiques relatives aux cellules somatiques, sans être minimisées, semblent donc devoir être relativisées.

Il est sans doute nécessaire de porter un regard différent sur les altérations génotoxiques survenant au sein des cellules germinales, en raison de la transmissibilité à la descendance des caractères nouveaux ainsi acquis (Rether et al., 1997). De telles modifications peuvent néanmoins être sans conséquences durables si, limitée à une fraction de la population, elles aboutissent à des mortalités embryonnaires ou à une disparition précoce de la descendance. Des modifications génétiques neutres peuvent par contre persister et fournir une source de variabilité, augmentant ainsi les capacités adaptatives de la population. La propagation au sein de la population peut être plus rapide si la mutation confère un avantage sélectif immédiat. Ces quelques éléments ont donc conduit certains auteurs à penser que, dans une perspective écotoxicologique, un effort particulier doit être accordé à la recherche de biomarqueurs de génotoxicité au sein des cellules germinales plutôt que dans les cellules somatiques.

L'étude des adduits à l'ADN chez l'Homme comme chez les modèles animaux représente un part importante des études menées dans le domaine de la génotoxicologie. Une approche plus générale s'appuie sur la détection des cassures de brins d'ADN qui sont produits soit directement par les agents toxiques ou leurs métabolites soit indirectement (Shugart et al., 1992). Les modifications induites au niveau de certaines bases azotées de l'ADN, les effets cytogénétiques de même que certaines mécanismes impliqués dans la cancérogénèse sont également susceptibles d'être utilisés comme biomarqueurs.

4.2.3 - Biomarqueurs de génotoxicité retenus pour notre étude

4.2.3.1 - Fragmentation du matériel génétique

La quantification de l'état de fragmentation du matériel génétique de différents types cellulaires a été choisi comme biomarqueur de génotoxicité dans le cadre de ce travail. Ce choix de suivre les lésions primaires de l'ADN permet ainsi de détecter des manifestations précoces de

l'altération du matériel génétique, en amont de phénomènes aux conséquences plus lourdes pour le devenir de la cellule tels que les effets clastogènes ou aneugènes.

La version alcaline de l'essai des comètes a été choisie comme méthode principale de quantification de la génotoxicité. Ce choix a été motivé par différentes raisons : cet essai est applicable de nombreux types cellulaires (à la condition de pouvoir disposer de cellules isolées en suspension), il est extrêmement sensible (il peut détecter jusqu'à 100 cassures de brins par génome), facile à mettre en œuvre notamment lors d'exposition *in vivo* et il ne nécessite qu'un faible nombre de cellules. De plus, cette technique analytique rend compte, non seulement des cassures simple et double brins de l'ADN, mais également de la présence de sites abasiques (caractérisés par le fait qu'ils soient labiles en milieu alcalin). Les dommages estimés sont donc de plusieurs types mais relèvent tous d'une altération du patrimoine génétique.

A titre exploratoire, une seconde technique de mesure de la génotoxicité (utilisant la cytométrie en flux) a également été employée en complément à l'essai des comètes, le type de dommages révélés par cette seconde méthode étant similaire à ceux présentés précédemment.

4.2.3.2 - Estimation des dommages oxydatifs

Comme évoqué dans le chapitre dédié à la synthèse bibliographique des données toxicologiques de l'uranium, nous avons pu voir que, parmi les événements susceptibles d'altérer le patrimoine génétique d'une cellule, l'oxydation de certaines bases azotées de l'ADN peut être une conséquence d'un stress oxydant au niveau cellulaire. Or, par le biais d'une modification du protocole de l'essai des comètes, il est possible de révéler la présence de certaines bases modifiées. Nous avons donc choisi de profiter de cette opportunité pour tenter d'établir un lien concret entre stress oxydant et génotoxicité. Pour cela, une version modifiée de l'essai des comètes (ajout d'une étape d'incubation en présence d'une enzyme à activité glycosylasique) a été réalisée. L'action des enzymes choisies (Fpg et EndoIII issues de souches bactériennes d'*E.coli*) conduit alors à la conversion des sites porteurs d'une base oxydée en cassures, ces cassures surnuméraires sont alors détectées par l'essai des comètes. L'essai consiste donc en une préparation des cellules d'un même échantillon selon deux protocoles différents : l'un comprenant cette étape d'incubation avec l'enzyme, l'autre avec un tampon "contrôle". L'estimation des dommages oxydatifs se fait alors par différence entre les comètes obtenues avec ou sans incubation avec l'enzyme.

4.2.3.3 - Les types cellulaires d'intérêt

Les techniques d'évaluation génotoxique employées dans le cadre de ce travail ont nécessité le recours à des suspensions de cellules isolées. Notre premier choix s'est donc immédiatement porté vers le tissu sanguin, naturellement constitué de cellules isolées (majoritairement des érythrocytes). Néanmoins, du fait du rôle central du foie dans l'expression de la toxicité des métaux lourds (site d'accumulation mais aussi de détoxification) et de la pertinence écotoxicologique de l'évaluation de l'atteinte du matériel génétique des cellules gonadiques (pérennité possible du message toxique d'une génération à l'autre), il a été décidé d'investiguer les effets génotoxiques sur deux autres types cellulaires : les hépatocytes et les cellules spermatiques.

4.3 - Etude de la neurotoxicité

Il n'existe que peu de marqueurs de neurotoxicité, notamment lorsque l'on s'intéresse au modèle poisson. Le marqueur le plus fréquemment utilisé dans ce cas est le suivi de l'activité de l'acétylcholinestérase. Notre choix s'est donc porté sur l'étude de ce marqueur.

4.3.1 - L'acétylcholinestérase, une enzyme clé du système nerveux

Dans les jonctions neuromusculaires et interneuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. Lorsque l'acétylcholine est libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, elle se fixe sur l'un des récepteurs cholinergiques (nicotiques ou muscariniques) qui se trouvent sur la membrane post-synaptique (nerfs, muscles lisses ou glandes). L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'AChE, en inactivant rapidement l'acétylcholine, permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser rapidement l'acétylcholine afin de stopper la stimulation du récepteur et, par conséquent, le transfert du signal par repolarisation de la membrane.

L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques va provoquer l'accumulation dans l'espace synaptique de l'acétylcholine qui maintient alors une transmission permanente de l'influx nerveux. Lorsque l'AChE est inhibée, l'acétylcholine reste en effet fixée au récepteur et de ce fait,

maintient la dépolarisation de la membrane. Si ce phénomène se prolonge excessivement, l'ensemble de la membrane post-synaptique se dépolarise, et la synapse s'en trouve bloquée. Le blocage de toutes les synapses du système nerveux central conduit rapidement à la mort. Le blocage des synapses des jonctions neuromusculaires conduit à la tétanie ; la mort peut alors survenir par asphyxie, à la suite de la tétanie du muscle du diaphragme.

4.3.2 - Les métaux : inhibiteurs des cholinestérases

Quelques études *in vivo* ont rapporté les effets inhibiteurs (mais parfois aussi des effets activateurs) de métaux lourds sur l'activité AChE de muscle ou de cerveau de poisson, mais les concentrations utilisées dans ces tests sont généralement très éloignées des concentrations mesurées *in situ* (Bocquené et al., 1997).

La conformation des cholinestérases peut être modifiée par la présence de métaux lourds. La modification conformationnelle de l'AChE de la torpille (*Torpedo californica*) par certains organomercurels a été décrite en détail par Kreimer et al. (1994).

Les effets inhibiteurs de quelques ions métalliques sur l'activité AChE de quatre espèces marines ont été rapportés *in vitro* (Bocquené et al., 1997). Toutefois, les indications obtenues *in vitro* à partir de solutions métalliques simples sont peu réalistes.

4.3.3 - Le suivi de l'AChE, son intérêt en écotoxicologie

Puisque les AChEs cérébrales constituent une cible moléculaire pour différents types de contaminants, il n'est pas surprenant que leur degré d'inhibition puisse être mis en relation avec la nature et la gravité des effets toxiques. Il est d'ailleurs fait mention dans divers ouvrages de l'utilisation des cholinestérases en tant que biomarqueur chez les vertébrés (Mineau, 1991 ; Bocquené et al., 1997). En effet, l'inhibition des AChEs du cerveau constitue un marqueur fiable de toxicité chez les vertébrés quand ces derniers sont amenés à être en contact avec des substances neurotoxiques.

La signification écotoxicologique de l'inhibition de l'acétylcholinestérase repose sur le fait qu'il existe généralement une relation entre le taux d'inhibition de l'AChE cérébrale et la nature et l'ampleur des effets toxiques. Cette relation est d'ailleurs vérifiée à deux échelles d'observations :

l'une relative aux effets sublétaux physiologiques et comportementaux et la seconde relative aux effets létaux découlant du blocage des synapses cholinergiques.

L'importance des conséquences neurotoxiques est liée à l'étendue de l'inhibition de l'ACHé dans les différentes parties du système nerveux. En général, une inhibition supérieure à 70 % de l'activité acétylcholinestérasique du cerveau a de grandes chances de causer la mort à brève échéance. A des niveaux moindres, une inhibition comprise entre 30 et 70 % se traduit généralement chez les vertébrés par divers effets sublétaux observés notamment aux niveaux physiologiques et comportementaux (Grue et al., 1991). Il est important de souligner le fait que de tels effets sublétaux peuvent avoir des répercussions non négligeables du point de vue écologique, dans la mesure où ils peuvent affecter des activités telles que l'alimentation et la reproduction et, plus largement, les relations sociales entre les organismes.

4.4 - Altérations histologiques

L'examen des effets néfastes ou de leurs conséquences en termes anatomopathologiques peuvent également constituer des outils d'évaluation biologiques très intéressants. Ainsi, l'examen histopathologique de lésions, d'altérations ou de formation de tumeurs (néoplasmes) chez les poissons peut conduire à l'établissement d'un diagnostic environnemental.

Au contraire de la plupart des paramètres biochimiques qui ont été présentés jusqu'à présent, les paramètres physiologiques et morphologiques constituent des éléments dont l'examen permet de rendre compte de réponses à un niveau d'organisation biologique supérieur. Ces réponses sont en effet consécutives de celles observées aux niveaux d'organisation inférieurs (interactions chimiques et cellulaires) et sont généralement indicatrices de dommages irréversibles (Hinton et al., 1992).

La pertinence du recours à des paramètres histopathologiques chez les poissons en tant que biomarqueurs d'un événement contaminant au niveau des écosystèmes aquatiques a fait l'objet de plusieurs articles de synthèse (Hinton et al., 1992 ; van der Oost et al., 2003). Au bilan de ces publications, seul un nombre limité d'études ont pu être identifiées comme réellement révélatrices de l'existence d'un lien entre des événements de pollution et l'occurrence de manifestations histopathologiques (Brown et al., 1977 ; Malins et al., 1985 ; Myers et al., 1992 et 1994).

Néanmoins, quand un tel lien a pu être établi, les réponses histopathologiques ont également été corrélées avec d'autres résultats obtenus par le biais d'études menées aux échelles comportementale, limnologique et analytique. De plus, elles sont le reflet des niveaux de pollution.

L'étude menée par [Cooley et al. \(2000\)](#) a conforté notre choix quant au fait de suivre de tels marqueurs dans le cadre de l'étude de l'uranium. Dans le cadre de leur étude menée sur des corégones exposés par voie trophique à de l'uranium, des lésions histopathologiques ont en effet été observées dans le parenchyme hépatique, la vésicule biliaire, les néphrons et les tissus interstitiels rénaux. L'une des conclusions de cette étude a donc été de dire que les lésions s'avèrent être des biomarqueurs sensibles. En effet, la fréquence et la sévérité des lésions hépatiques sur le corégone se sont avérées directement corrélées à la concentration en uranium de leur alimentation de même qu'à la durée de l'exposition. La réduction de l'index hépato-somatique observée chez les individus exposés à la concentration la plus forte indiquent en outre une toxicité hépatique chronique. Les nécroses apparues au niveau hépatique (mais également rénal) peuvent être la conséquence de différents mécanismes incluant une rupture des lysosomes, une hypoxie tissulaire et/ou une peroxydation lipidique ([Cooley et al., 2000](#)).

Les tissus choisis pour les analyses d'histopathologie ont été les tissus gonadiques, branchiaux, cérébraux et musculaires (le tissu rénal n'étant pas accessible de par la taille réduite de notre organisme modèle).

SYNTHESE DU CHAPITRE SUR LES BIOMARQUEURS

Dans le domaine de la toxicologie environnementale, l'approche "biomarqueurs" a largement montré sa pertinence. Nous avons donc pris le parti de nous engager dans cette voie dans le cadre de notre étude.

Au besoin d'accroître les connaissances disponibles relatives aux effets de l'uranium sur les biocénoses aquatiques, nous avons choisi de privilégier différentes pistes de recherche sur lesquelles nous focaliser. Nous avons ainsi fait le choix de nous intéresser au comportement toxicocinétique de l'uranium (internalisation, distribution tissulaire) ainsi qu'à différentes aspects toxicologiques : instauration d'un déséquilibre de la balance oxydative cellulaire, génotoxicité, neurotoxicité et manifestations histopathologiques.

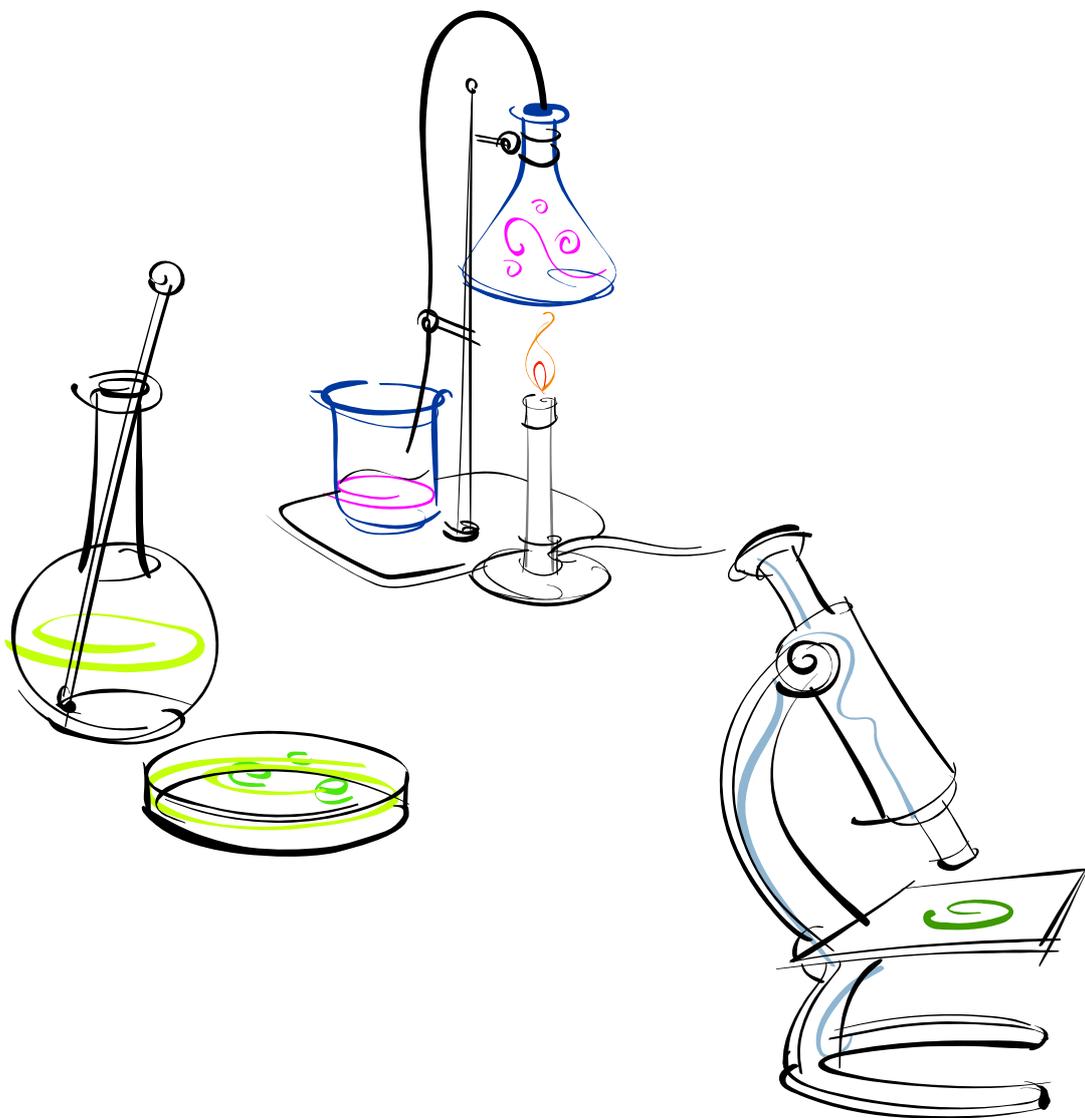
Au travers des expérimentations mises en place dans le cadre de cette thèse, nous tenterons d'apporter des réponses à ces questions. Pour cela, nous avons donc décidé de suivre :

- (1) la bioaccumulation (à l'échelle des organismes entiers mais également à l'échelle tissulaire) ;
- (2) l'évolution de paramètres hépatiques relatifs au stress oxydant (activités SOD, CAT, GPx et quantité de GShtot) ;
- (3) l'évolution de l'activité AChE cérébrale, enzyme clé du système de neurotransmission cholinergique ;
- (4) l'évolution de l'intégrité du matériel génétique de différents types cellulaires (érythrocytes, hépatocytes et cellules gonadiques) ;
- (5) l'apparition de pathologies tissulaires au niveau de l'appareil branchial, des muscles, du cerveau et des gonades.

Nous verrons donc en quelle mesure l'uranium est susceptible d'induire des réponses à ces différents niveaux.

DEMARCHE EXPERIMENTALE

PREAMBULE AU CHAPITRE MATERIELS ET METHODES



DEMARCHE EXPERIMENTALE

1 - MODELE BIOLOGIQUE : LE POISSON ZEBRE

1.1 - Phylogénie

Le poisson zèbre est un poisson téléostéen de l'ordre des Cypriniformes (Sterba, 1962). Sa place dans la classification animale est détaillée en figure 11. La nomenclature originelle de cette espèce, *Brachydanio rerio*, a été proposée par Buchanan-Hamilton en 1822.

1.2 - Caractéristiques de l'espèce

1.2.1 - Origine

Le poisson zèbre fait partie de la famille des Cyprinidés largement répartie dans le monde (Europe, Afrique, Asie et Amérique du Nord). Le genre *Danio* est originaire d'Inde, de Malaisie et de Sumatra. On trouve plus particulièrement l'espèce *Danio rerio* en Inde de l'Est (Sterba, 1962).

1.2.2 - Biotop[?]

Il peuple généralement les cours d'eau rapides et peu profonds, mais on peut également le retrouver au sein de rivières à courant lent ou d'étangs. Son adaptation thermique est importante puisqu'on le rencontre dans des eaux dont la température varie de 10 à 40 °C. Il en est de même vis-à-vis des caractéristiques des eaux dans lesquelles il évolue puisqu'il est capable de supporter de larges gammes de pH[?] (6,5 à 8) et de dureté[?] (12 à 21 °TH[?]).



Règne:	Animal		
Embranchement :	Cordés	Sous embranchement :	Vertébrés
Superclasse:	Ostéichtyens	Classe :	Actinoptérygiens
Sous-classe :	Néoptérygiens	Infra-classe :	Téléostéens
Superordre :	Ostariophysiens	Ordre :	Cypriniformes
Superfamille :	Cyprinoidés	Famille :	Cyprinidés
Genre :	<i>Danio</i>	Espèce :	<i>rerio</i>

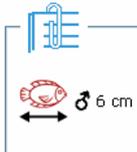
Noms communs

- Leopard danio, Rerio, Striped danio, Zebra, Zebra danio, Zebrafish
- Poisson zèbre

Milieu de vie

Poisson **benthopélagique** vivant dans les régions **tropicales**.

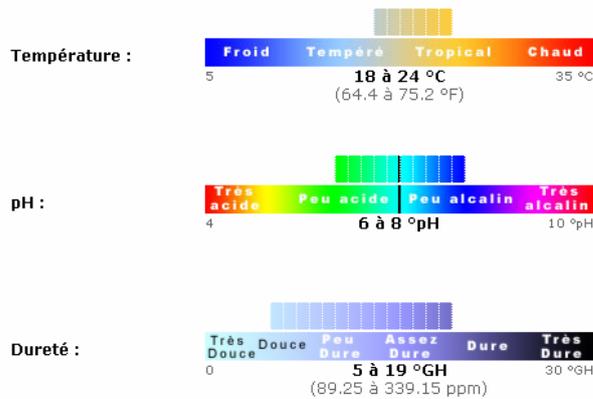
- Eau douce
- Eau saumâtre
- Eau de mer



Economie

- Pêcheries : peu intéressantes
- Pêche de loisir
- Appâts
- Aquaculture
- Aquariophilie : commerce

Caractéristiques de l'eau



Répartition géographique

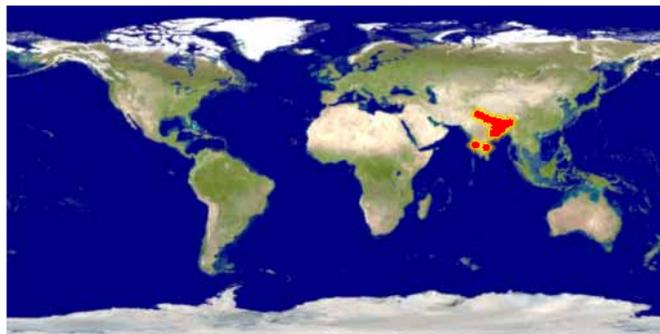


Figure 11. Fiche signalétique du modèle biologique choisi : le poisson zèbre (*Danio rerio*).

1.2.3 - Comportement

L'espèce *Danio rerio* est grégaire. Son élevage ou son maintien par groupe de 10 à 20 individus au minimum est un facteur important à respecter au risque de perturber fortement le comportement des organismes.

Il s'agit de plus d'une espèce décrite comme étant benthopélagique, c'est-à-dire qu'elle évolue préférentiellement dans la partie basse de la colonne d'eau.

1.2.4 - Morphologie

Le poisson zèbre se caractérise par une taille comprise entre 3 et 5 cm au stade adulte (atteint vers l'âge de 100 j). Son corps est fusiforme et très flexible ce qui facilite une progression rapide ainsi que des changements de direction fréquents. Il existe un léger dimorphisme sexuel, les mâles étant légèrement plus petits et plus élancés que les femelles. Les femelles présentent en effet un abdomen plus bombé et sont dotées d'une papille urogénitale présente à l'arrière des nageoires pelviennes.

Leur corps est bleu foncé et possède quatre bandes longitudinales jaunâtres et brillantes, s'étendant des opercules à la nageoire caudale. La nageoire dorsale est bleue, l'anale rayée, les pectorales et ventrales sont transparentes. Les opercules sont bleus avec des tâches dorées. Cependant, selon l'environnement dans lequel sont placés les poissons, ces couleurs peuvent changer.

La bouche est dirigée vers le haut du fait de la proéminence de la mâchoire inférieure. Elle porte deux paires de barbillons (organes tactiles) insérés dans la commissure des lèvres et sur la mâchoire supérieure. D'après la morphologie buccale ainsi que la tâche claire que certains individus possèdent sur le sommet du crâne (suspectée d'être utilisée comme un leurre permettant d'attirer les insectes), son alimentation est à tendance insectivore (proies nageant en surface ou en pleine eau). Cependant, en captivité, toutes les nourritures sèches distribuées en surface sont acceptées, ainsi que celles ayant sédimenté au fond de l'aquarium (Labrot, 1996).

1.2.5 - Cycle de vie

Cette espèce se caractérise par un cycle de vie court (figure 12). Son développement embryon-larvaire est très rapide et a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à une description détaillée. Ainsi, le développement embryon-larvaire est divisé en huit périodes fondamentales constituées chacune de plusieurs stades (quelques unes de ces périodes sont illustrées en figure 13).

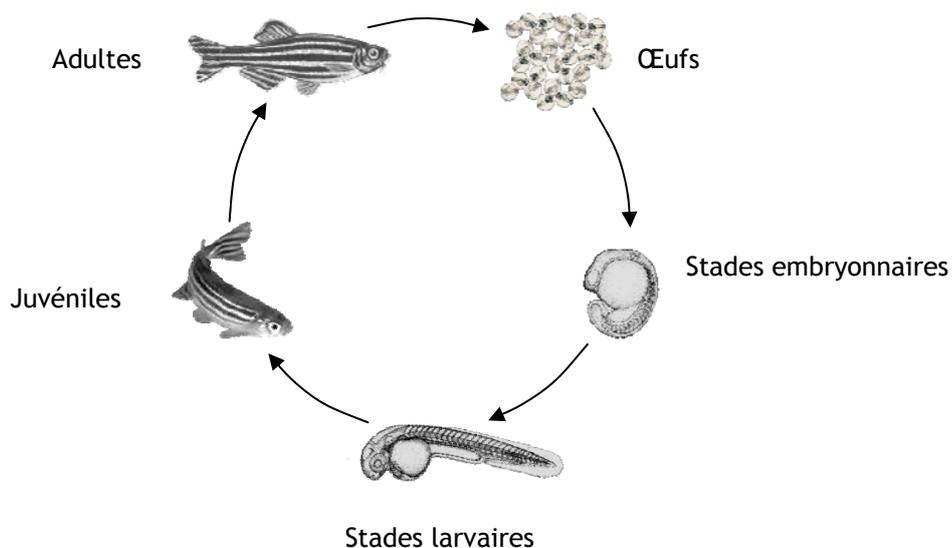


Figure 12. Description du cycle biologique chez *Danio rerio*.

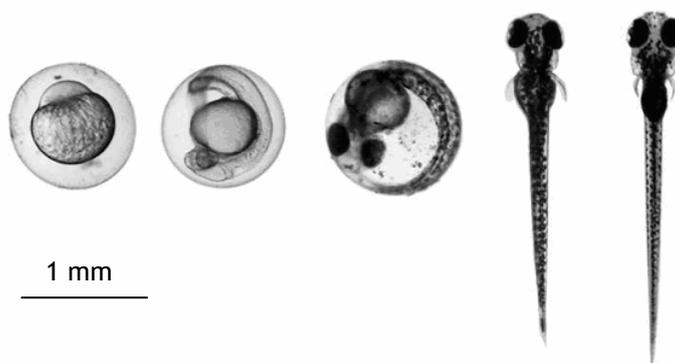


Figure 13. Principales étapes de développement embryon larvaire du poisson zèbre (de gauche à droite : 0, 24, 48, 72 et 120 hpf)

Les premières périodes fondamentales sont les suivantes : le stade unicellulaire, le zygote (0 hpf¹, suivi des premières divisions), le stade blastula (2,25 hpf), le stade gastrula (5,25 hpf) auquel fait suite la période de segmentation (10 hpf) et la pharyngula (24 hpf). La période de l'éclosion commence à 48 hpf. En général, l'éclosion n'a lieu qu'à partir du dernier stade, à 72 hpf. La période "larve précoce" est atteinte à 120 hpf. Trois jours après l'éclosion (144 hpf), la larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et continue à grandir jusqu'à ce que son développement lui permette de réagir rapidement à des stimuli par la fuite, de respirer, de rechercher de proies et de s'alimenter de manière autonome (le sac vitellin disparaissant peu à peu) (Porcher et al., 2003).

La maturité sexuelle est ensuite atteinte entre l'âge de 75 et 100 j. Une fois cette maturité acquise, une femelle peut pondre de 50 à 200 œufs tous les 3 à 5 j (Eaton et Farley, 1974).

La durée de vie moyenne des individus de cette espèce est de l'ordre de 3 ans lorsqu'il évolue dans son milieu naturel (où la température de l'eau est généralement comprise entre 18 et 24 °C). Cette durée peut néanmoins être significativement réduite (environ 2 ans) si les organismes sont maintenus à des températures de l'ordre de 24 à 26 °C comme c'est souvent le cas en conditions de laboratoire.

1.3 - Justification du choix du *Danio* comme modèle biologique

Danio rerio est l'une des espèces de poisson dont l'utilisation a fait l'objet de recommandations d'instances internationales pour les tests de toxicité (CE, 2001a,b ; ISO, 1996a,b,c et "en projet" ; OECD, 2004a,b,c,d,e ; US EPA, 2002, 2003). En effet, cette espèce est aisément maintenue en stabulation dans les conditions d'un laboratoire, elle est peu exigeante vis-à-vis des caractéristiques de l'eau d'exposition (T°C, pH, dureté), sa taille réduite et son caractère grégaire concourent à son adéquation pour des expérimentations nécessitant un grand nombre d'individus. Son cycle de vie relativement court en fait également un modèle biologique de choix pour des études couvrant plusieurs générations dans le but d'obtenir des informations relatives aux conséquences populationnelles d'une exposition à un agent toxique (US EPA, 2002). De plus, le fait que le développement des embryons ait lieu à l'extérieur de la mère favorise l'étude de mutations affectant le développement (effets tératogènes ou létalité) (OECD, 2004c,d). Enfin, il est important de mentionner que le génome de cette espèce a été récemment séquencé dans sa totalité.

De plus, du fait que la présente étude implique un travail avec des activités radiologiques non négligeables et soit menée sur un élément lié au cycle du combustible nucléaire, il a fallu porter notre choix sur des organismes de taille réduite, ne nécessitant pas de grands volumes d'eau pour leur maintien et leur exposition en laboratoire. En effet, les aspects réglementaires liés au travail avec de tels composés restreignent les possibilités de travailler avec de grandes quantités d'uranium. Il a donc fallu limiter au maximum les volumes d'eau utilisés dans les différentes expérimentations afin de pouvoir atteindre des concentrations suffisamment importantes et de manière à limiter les volumes d'eaux contaminées à retraiter.

Enfin, ce travail s'inscrivant dans un projet de recherche impliquant d'autres équipes de l'IRSN, le choix de ce modèle a été motivé par le fait que des études multi-générationnelles ont été prévues en aval des présents travaux. Il a donc fallu recourir à un modèle biologique caractérisé par un cycle de vie court.

L'ensemble de ces exigences et contraintes expérimentales nous ont donc conduits à choisir le *Danio rerio* comme modèle d'étude.

2 - VARIABLES ECOTOXICOLOGIQUES MESUREES

2.1 - Etude toxicocinétique

2.1.1 - Mesures chimiques et radiochimiques de l'accumulation

Afin d'estimer les quantités d'uranium ayant été internalisées à la suite des diverses expérimentations menées dans le cadre de ce travail, des mesures de bioaccumulation ont été réalisées. Elles ont consisté en des analyses menées à l'échelle de l'organisme entier ou à l'échelle tissulaire. Les données issues de ces analyses ont ainsi permis de déterminer des concentrations internes, des facteurs de bioaccumulation, mais également d'évaluer l'hétérogénéité de la distribution de l'uranium au sein de l'organisme et ainsi de révéler l'existence de tissus cibles en terme d'accumulation.

2.1.2 - Microlocalisation

L'observation de coupes histologiques par le biais d'un système de microscopie électronique à transmission couplé à une sonde EDX a permis l'analyse des éléments chimiques présents au niveau de zones d'intérêt choisies sur ces coupes. Une localisation intracellulaire de l'uranium au sein de différents tissus (gonades, branchies, muscle et cerveau) a ainsi été pu être réalisée.

2.2 - Etude écotoxicologique

Dans le cadre de ce travail de thèse, il est apparu important de disposer d'une approche multidimensionnelle en ayant recours à des biomarqueurs associés à différents aspects de l'action toxique possible de l'uranium. Comme évoqué dans le chapitre précédent, nous avons donc choisi de focaliser nos efforts sur quatre principaux axes de recherche : étude du stress oxydant, de la génotoxicité, de la neurotoxicité, des histopathologies (présentés dans le précédent chapitre).

Les biomarqueurs retenus pour notre étude (présentés dans le chapitre précédent) sont en effet susceptibles de répondre à une contamination par l'uranium à des concentrations sublétales . De plus, leurs modulations sont le reflet d'altérations de molécules et de systèmes cellulaires impliqués dans des grandes fonctions de la cellule (mécanismes de défense et d'adaptation, de maintien du cycle cellulaire, de communication intercellulaire).

Il est important de préciser dès à présent que l'ensemble des techniques analytiques nécessaires au suivi de ces biomarqueurs retenus (qu'il s'agisse des marqueurs de stress oxydant, de neurotoxicité ou de génotoxicité) a dû être mis en place au laboratoire d'accueil puisqu'aucune de ces techniques n'y était disponible. Certaines techniques analytiques ont ainsi dû faire l'objet d'un transfert technologique depuis des laboratoires extérieurs (l'INERIS de Verneuil en Halatte pour les marqueurs de stress oxydant, l'ENTPE de Vaulx en Velin pour l'essai des comète, l'ENV de Lyon pour la cytométrie en flux). D'autres techniques ont quant à elles nécessité un développement et une optimisation au laboratoire sur la base de publications scientifiques (avec la collaboration de B. Ksas pour le marqueur de neurotoxicité et de V. Larno pour la modification de l'essai des comètes visant à estimer les dommages oxydatifs à l'ADN).

3 - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX MIS EN PLACE

3.1 - Les choix stratégiques

3.1.1 - La voie directe

Dans le cadre de ce travail, la voie directe (contamination de l'eau d'exposition) a été choisie dans l'élaboration de l'ensemble des scénarii d'exposition envisagés.

Cependant, il est important de noter que, selon [Cooley et al. \(2000\)](#), les études d'exposition par voie directe sont peu représentatives vis-à-vis des sources de contamination dans l'environnement. Toujours selon ces auteurs, ces études ne contribueraient que peu à l'amélioration des connaissances relatives aux risques associés aux contaminants tels que l'uranium puisqu'il a été démontré que la voie trophique représente la voie majeure d'exposition à l'uranium pour les poissons pélagiques ([Kovalsky et al., 1967](#) ; [Emery et al., 1981](#) ; [Swanson, 1982, 1983, 1985](#)). Néanmoins, bien que l'alimentation ait été reconnue comme étant la voie principale de contamination par les métaux et, a fortiori d'autant plus pour les poissons exposés de manière chronique ([Harrison et al., 1990](#) ; [Handy, 1996](#)), peu d'études se sont intéressées aux effets d'une exposition par voie trophique à l'uranium.

Cette tendance est sans doute attribuable au fait que les études d'exposition par voie trophique en laboratoire sont complexes à mettre en place et à interpréter. En effet, de telles expérimentations nécessitent l'estimation de paramètres tels que les taux d'ingestion, d'absorption intestinale ou encore d'excrétion de l'uranium chez les organismes impliqués dans l'étude. De plus, les mesures d'accumulation tissulaire requièrent l'extraction préalable des aliments présents au sein du tractus gastro-intestinal de chaque organisme afin de ne pas ajouter l'uranium présent dans le bol alimentaire à celui réellement internalisé. Compte tenu de la taille de notre modèle biologique, ces exigences expérimentales semblent difficiles à satisfaire.

En outre, dans l'optique d'une étude de la part relative des effets chimio et radiotoxiques, nous devons recourir à l'emploi d'une composition isotopique d'uranium caractérisée par une activité radiologique importante comme source de contamination. Or, si la voie d'exposition choisie avait été la voie trophique, l'irradiation interne des organismes n'aurait pas pu être considérée

comme homogène (puisque principalement localisée au niveau du tractus gastro-intestinal). Ceci aurait donc nécessité une évaluation de débits de doses internes spécifiques à différentes régions de l'organisme. Or, en l'état des connaissances et des outils actuellement disponibles, ces estimations nous semblaient difficiles à réaliser de manière précise.

Enfin, les taux de transfert trophique de l'uranium sont généralement très faibles comme nous avons pu le voir dans le chapitre dédié à l'uranium (paragraphe 4.4.3.4.2). Or, dans le cadre de la présente étude, le choix a été fait de nous placer dans les conditions les plus favorables à l'accumulation d'uranium dans les organismes de façon à augmenter la probabilité d'apparition d'effets. C'est pourquoi la voie directe nous a paru être la meilleure des options possibles.

3.1.2 - Le stade adulte

Les travaux réalisés durant cette thèse s'inscrivent dans un projet impliquant l'ensemble du laboratoire d'accueil. Un des objectifs fixés pour ce projet consiste en une approche multigénérationnelle de l'évaluation des effets de l'uranium. Ceci implique donc notamment l'étude des effets aux différents stades du cycle de vie de notre organisme modèle. Cependant, les travaux présentés dans ce document ont été les premiers engagés dans le projet du laboratoire impliquant le poisson-zèbre. L'état des connaissances et les outils dont nous disposions au moment de la mise en place de ce travail de recherche nous ont donc amenés à considérer en premier lieu le stade adulte. En effet, l'expérimentation menée à ce stade de vie ne nécessite pas la maîtrise d'un élevage. Nous avons donc pu nous limiter au maintien et à l'acclimatation d'organismes obtenus auprès d'un éleveur qualifié.

3.1.3 - Le sexe

En se basant sur l'étude de [Cooley et al. \(2000\)](#), il semblerait que les effets néfastes induits par l'uranium puissent apparaître, ou être magnifiés, quand l'organisme est simultanément sujet à une demande physiologique associée à des phases de maturation sexuelle. En effet, au cours de leur étude menée sur le corégone, les fréquences d'apparition de lésions glomérulaires les plus fortes et les concentrations de lipides peroxydés les plus importantes ont coïncidé avec le stade de croissance gonadique le plus élevé. Ces corrélations laissent donc penser que les capacités d'un organisme à faire face à différents stress (exposition à un contaminant mais également stress

physiologique tel que la maturation sexuelle) peuvent être dépassées quand cet organisme est exposé aux deux simultanément.

De plus, certaines enzymes choisies comme biomarqueurs d'effet dans le présent travail (notamment celles relatives à l'étude du stress oxydant) ont été montrées comme étant modulées suivant le stade de maturation et le sexe des organismes (Sobocanec et al., 2003). Afin d'éviter tout facteur de confusion relatif à ces questions et à l'issue d'une expérimentation menée dans le but d'évaluer cette influence du sexe des individus, il a été décidé de n'utiliser que des individus mâles dans la suite de notre travail.

3.2 - Les approches expérimentales

3.2.1 - Influence de l'acclimatation et du sexe des individus

Comme abordé dans le paragraphe précédent, une expérimentation a été menée dans le but d'évaluer l'influence de la durée d'acclimatation (2, 3 ou 4 semaines) et du sexe des individus (mâles ou femelles).

En effet, l'acclimatation est une étape cruciale dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Il est généralement admis qu'un maintien au laboratoire durant une période minimale de deux semaines après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers au nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental (physico-chimie de l'eau par exemple). Nous sommes donc partis de cette valeur et avons testé deux autres durées (3 et 4 semaines).

En parallèle à cette étude, l'effet du sexe des individus a été testé de façon à estimer les niveaux basaux des différentes enzymes du stress oxydant (potentiellement sensibles à ce facteur). Des mesures de stress oxydant ont donc été réalisées sur des pools d'individus mâles d'un côté et femelles de l'autre.

3.2.2 - Etude toxicologique de l'uranium

Un tableau récapitulatif des différentes expérimentations menées dans le cadre de l'étude de l'uranium est présenté ci-contre ([tableau VI](#)).

3.2.2.1 - Etude de la chimiotoxicité

Bien que l'uranium soit un radionucléide, il présente à l'état naturel une activité spécifique très faible et représente donc un risque d'irradiation très faible, étant peu susceptible d'émettre de doses critiques de radiations ([Cooley et al., 2000](#)). De ce fait, la toxicité de l'uranium naturel ou appauvri est principalement attribuable aux caractéristiques chimiotoxiques et non radiotoxiques de l'uranium.

La première expérimentation menée dans le cadre de ce travail a donc été menée en vue d'une investigation des effets chimiotoxiques de l'uranium. Pour cela, elle a été réalisée au moyen d'uranium appauvri dont la toxicité est quasi essentiellement due à des mécanismes chimiques. Pour cela, trois concentrations d'uranium appauvri (20, 100 et 500 µg/L) ont été testées en vue d'établir des relations dose-réponse entre la pression chimique représentée par l'uranium et les réponses biologiques observées. Le choix de cette gamme de concentrations a été fait en prenant comme référence des valeurs réalistes d'un point de vue environnemental. En effet, dans l'environnement, la concentration en uranium dans les systèmes aquatiques est très variable et s'étend de quelques ng/L à 2 mg/L. Pour exemple, en aval d'une exhaure de mine il n'est pas rare de retrouver de 50 à 100 µg d'uranium/L. Nous avons donc décidé de prendre comme valeur intermédiaire 100 µg/L pour nos expérimentations. C'est à partir de cette première concentration que les valeurs hautes et basses ont été décidées. La valeur basse est issue d'un compromis entre le fait d'abaisser au maximum la concentration en uranium et celui de pouvoir maîtriser correctement la contamination de l'eau au cours de l'expérimentation. Or, la limite de détection de l'appareil employé pour les mesures d'uranium appauvri dans les eaux d'exposition (ICP-AES) est de 10 µg/L. Il a donc été décidé de travailler autour d'une valeur double de cette limite : 20 µg/L. A partir de ces valeurs de 20 et 100 µg/L il a été décidé de garder un rapport de 5 entre la valeur intermédiaire et les valeurs les plus extrêmes. De plus, 500 µg/L reste une valeur suffisamment réaliste pour ne pas limiter l'extrapolation des résultats à quelques rares écosystèmes dans le monde fortement contaminés en uranium.

Tableau VI. Conditions expérimentales et marqueurs biologiques investigués lors des différentes expérimentations

	Type de pression				Durées d'exposition	Outils d'évaluation écotoxicologiques utilisés				Bioaccumulation
	chimique			radiologique		Stress oxydant	Génotoxicité	Neurotoxicité	Histopathologie Microlocalisation	
	U _{appauvri} (µg/L)	²³³ U (µg/L)	U _{total} (µg/L)	Activité (Bq/L)						
A	20	-	20	-	0,5 à 20 j	foie	érythrocytes	cerveau	organismes entiers	
	100	-	100	-						
	500	-	500	-						
B	100	-	100	-	3 à 20 j	foie	érythrocytes	cerveau	gonades	
	93,35	6,65	100	2 375					muscle	foie - viscères - gonades - branchies
C	20	-	20	-	3 à 20 j				organismes entiers	
	19,335	0,665	20	237,5						
	13,35	6,65	20	2 375						gonades
	0	20	20	7 150						muscle
	100	-	100	-						branchies
	93,35	6,65	100	2 375						cerveau
	80	20	100	7 150						♂ spermatozoïdes

Cette première expérimentation (expérimentation A) a été conçue de manière à étudier les cinétiques d'accumulation de l'uranium et d'apparition d'effets toxiques en fonction d'une gamme de pressions chimiques *via* l'étude des biomarqueurs de stress oxydant, de génotoxicité et de neurotoxicité.

Cette expérimentation a consisté en un suivi de la bioaccumulation à l'échelle des organismes entiers ainsi que des biomarqueurs de stress oxydant, de génotoxicité (sur sang uniquement) et de neurotoxicité. Six pas de temps différents ont été investigués (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 5 - 10 et 20 j). En effet, les marqueurs hépatiques de stress oxydant sont connus pour être des indicateurs très précoces d'une atteinte toxique d'un organisme. Il a donc été décidé de suivre les paramètres biologiques dès les premières heures de contact avec l'uranium. Lors de cette première expérimentation, il avait été initialement prévu de limiter l'étude de ces paramètres à une exposition de 10 j, néanmoins, au regard de résultats au sein du laboratoire obtenus parallèlement à notre expérimentation (Buet et al., 2005), il a été décidé de maintenir la contamination jusqu'à 20 j. En effet, une étude menée sur la truite et visant à estimer des paramètres identiques aux nôtres a montré qu'une atteinte génotoxique n'apparaissait qu'après 20 j d'exposition à l'uranium. Ces résultats ayant été acquis après le t_0 de notre expérimentation, il n'a pas été possible d'ajouter de nouveaux organismes pour l'étude de ce nouveau temps d'exposition. Nous avons donc dû limiter cette étude à 20 j aux seuls individus "surnuméraires" qui avaient été ajoutés afin de palier à une éventuelle mortalité des organismes lors de l'exposition. Du fait de la nécessité de mettre en commun les tissus hépatiques et cérébraux de plusieurs individus (4 au total) pour pouvoir réaliser les mesures de stress oxydant et de neurotoxicité, seule la mesure de génotoxicité a pu être réalisée à 20 j. En effet, l'effectif résiduel après le 10^{ème} jour d'exposition n'était alors que d'une dizaine d'individus.

3.2.2.2 - Etude de la part relative entre chimio et radiotoxicité

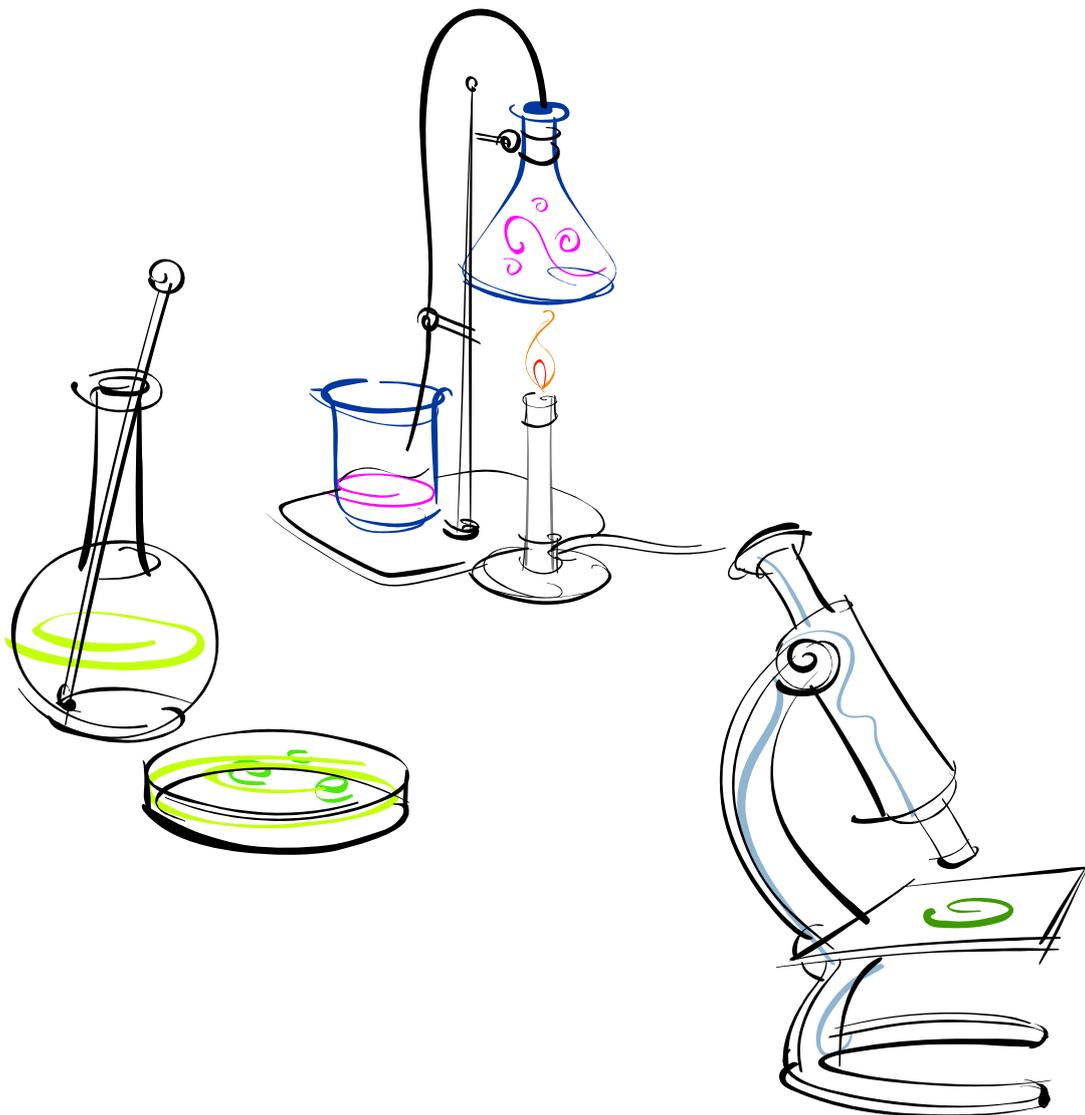
Par la suite, l'orientation que nous avons voulu donner à ce travail nous a amenés à étudier la part relative des effets chimiques et radiologiques de la toxicité de l'uranium.

Pour cela, une deuxième expérimentation (expérimentation B) a été menée en exposant des organismes à deux mélanges isotopiques de l'élément uranium délivrant des activités radiologiques différentes tout en conservant une même concentration massique de l'uranium total (100 µg/L).

Ainsi, une première condition expérimentale a consisté en une exposition à 100 µg/L d'uranium appauvri (essentiellement caractérisé par sa chimiotoxicité), la seconde consistant en un enrichissement de la solution d'uranium appauvri par de l'uranium 233 (93,35 µg/L d'uranium appauvri + 6,65 µg/L d'²³³U). L'activité radiologique du second mélange a ainsi été 1500 fois plus importante que celle du premier. Les pas de temps investigués ont alors été de 0, 3, 10 et 20 j. Lors de cette seconde expérimentation, en plus des mesures de bioaccumulation à l'échelle de l'organisme entier et de biomarqueurs de stress oxydant, de génotoxicité (sur sang uniquement) et de neurotoxicité précédemment explorés, des mesures de bioaccumulation à l'échelle tissulaire et des observations histopathologiques (sur les tissus branchiaux, gonadiques, cérébraux et musculaires) sont venues renforcer le panel d'outils d'évaluation écotoxicologiques.

A la suite de cette expérimentation, une dernière a été mise en place de façon à investiguer les effets radiotoxiques de l'uranium sur de plus larges gammes de pressions chimiques et radiologiques (expérimentation C). Pour cela, deux concentrations massiques de l'élément total ont été utilisées : l'une pour laquelle la pression chimique de l'uranium appauvri seul n'avait pas permis de dégager d'effet génotoxique lors de l'expérimentation A (20 µg/L), et l'autre pour laquelle un effet génotoxique avait été mis en évidence (100 µg/L). A partir de ces deux conditions de pression chimique, différentes combinaisons isotopiques d'uranium (obtenues à partir d'uranium appauvri et d'²³³U et faisant varier l'activité radiologique de l'eau d'exposition de 0 à 7 150 Bq/L) ont été constituées. Pour cette dernière expérimentation, 7 conditions d'exposition à l'uranium ont ainsi été appliquées (*cf.* tableau I). Ces différentes combinaisons isotopiques et massiques de l'élément ont eu pour but d'affiner les résultats obtenus au cours de deux précédentes expérimentations et n'ont concerné que des études de génotoxicité (sur les tissus sanguin, hépatique et gonadique) et d'histopathologie (sur les tissus branchiaux, gonadiques, cérébraux et musculaires).

MATERIELS ET METHODES



MATERIELS ET METHODES

1 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1.1 - Origine et maintenance des poissons

Les poissons utilisés au cours de ce travail ont été obtenus auprès d'un fournisseur extérieur, la société HB Développement, située en région lyonnaise. La qualité de la prestation de cet éleveur, notamment du fait de la traçabilité de l'historique de chacun des lots de poissons fournis (géniteurs, dates d'éclosion, alimentation, caractéristiques de l'eau d'élevage, traitements éventuels), nous a permis de nous affranchir d'un certain nombre de soucis techniques liés au maintien des organismes au laboratoire (déclenchement d'épidémies lors des premiers jours d'acclimatation, morts durant les expérimentations, etc.) comme cela est souvent le cas avec des organismes obtenus auprès de fournisseurs n'assurant qu'une stabulation de poissons d'importation.

Leur maintenance au laboratoire a été conçue de façon à ce que les conditions de densité des organismes, de caractéristiques de l'eau, de photopériode, etc. allient bien-être des organismes et exigences expérimentales. Ainsi, comme préconisé dans l'article de [Matthews et al. \(2002\)](#), les poissons (toujours obtenus au stade adulte) ont été maintenus à une densité de 5 individus par litre, dans une eau thermostatée entre 26 et 28 °C. La composition en gaz respiratoires a également été régulée par le biais d'un bullage d'air assurant une pression partielle d'O₂ de l'ordre de 20 kPa et une pression partielle de CO₂ de 0,003 kPa. La photopériode a été fixée à 14h d'éclairage (de 7 h à 21 h) et 10 h d'obscurité par jour. Les organismes étaient quotidiennement nourris à l'aide de granulés composés de farine de poissons, d'huile de poissons, de céréales, de vitamines et minéraux, l'apport alimentaire journalier étant fixé à 1 % environ de leur poids frais. L'entretien des aquariums a été assuré manuellement pendant toute la durée du maintien au laboratoire des organismes (phases d'acclimatation et d'expérimentation). Ainsi, la nourriture non consommée et les fèces ont été collectés par siphonage. De même, les individus morts ont été prélevés dès leur détection.

1.2 - Caractérisation de l'eau synthétique

Du fait de la large tolérance du poisson zèbre vis-à-vis des caractéristiques physico-chimiques de l'eau dans laquelle il évolue, il a été possible d'utiliser une eau artificiellement recomposée présentant des spécificités jugées intéressantes vis-à-vis de la spéciation de l'uranium lors des phases de contamination. Les choix ayant conduit à la composition de cette eau synthétique ont été largement dirigés de façon à ce que la biodisponibilité de l'uranium y soit optimale (selon le modèle de l'ion libre). L'uranium présentant une spéciation chimique très complexe et le dosage direct de chacune des espèces présentes dans le milieu s'avérant impossible, nous avons dû recourir à un logiciel de modélisation géochimique afin de prédire cette spéciation. Le modèle utilisé, CHESS (acronyme de Chemical Equilibrium of Species and Surfaces), a ainsi permis la simulation (sous une plate-forme de type "java") de l'état d'équilibre des différentes espèces de l'uranium au sein du système aqueux complexe que constitue l'eau d'exposition (Van der Lee, 1998). Pour cela, la base de données (IRSN_LRE_TDBV6) revue et complétée pour les complexes de l'uranyle par Denison (2004) a été utilisée. Au vu des résultats obtenus, il a ainsi été décidé de travailler avec des concentrations minimales de bicarbonates et de phosphates afin d'éviter des complexations trop importantes avec l'ion uranyle et à un pH relativement faible (6,5) afin d'augmenter de façon significative la fraction de l'ion libre que l'on pense classiquement être le plus perméant. En effet, pour comparaison, à pH 8 la fraction d'ion libre est uniquement de l'ordre de $1,7 \cdot 10^{-5}$ % alors qu'à pH 6,5 elle est de 1,3 %. La composition de l'eau synthétique adoptée a donc été la suivante :

	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	HCO ₃ ⁻
mM	0,290	0,195	0,500	0,160	0,915	0,100	0,500	0,015
mg/L	11,600	4,738	11,495	6,256	32,437	9,600	31,000	0,915

Une liste plus complète des espèces en solution estimée par le modèle CHESS ainsi qu'un descriptif complet du protocole de réalisation de cette eau sont présentés en [annexe A](#).

Le suivi des anions et des cations majeurs présents dans cette eau a été réalisé tout au long des phases d'expérimentation (acclimatation et exposition à l'uranium). Les anions ont ainsi été dosés par chromatographie anionique en phase liquide (par Daniel Orjollet) et les cations par spectrométrie d'émission atomique (par Virginie Camillieri et Ludivine Boggiato).

1.3 - Dispositifs expérimentaux

Suivant le nombre d'individus impliqués ou l'activité radiologique manipulée lors des différentes expériences menées, les dispositifs expérimentaux n'ont pas été tout à fait les mêmes. En effet, les volumes d'eau mis en jeu lors des différentes expériences ont été fixés en fonction de deux critères : le nombre d'organismes impliqués dans l'étude mais aussi "l'activité maximale manipulable" (AMM) qui fait référence à une notion de protection radiologique de l'expérimentateur. Cette activité manipulable est définie selon plusieurs critères tenant notamment compte du (ou des) radionucléide(s) considéré(s), de l'état physico-chimique de ce(s) radionucléide(s), de l'habilitation de la zone de travail (zone surveillée ou contrôlée) et du type d'équipement dont l'on dispose (simple paillasse ou hotte ventilée). Cette limitation de l'activité radiologique manipulable a donc été à l'origine de restrictions vis-à-vis des volumes d'eaux contaminées employées, conduisant également à une diminution du nombre d'organismes pouvant être impliqués dans l'étude.

De ce fait, deux cas de figures ont été rencontrés lors des différentes expérimentations :

- pour les expériences où les volumes d'eau étaient importants, des systèmes d'exposition à grande échelle ont été mis en place (cf. [figure 14](#)) ;
- pour celles où les volumes d'eau manipulables étaient plus restreints, des systèmes d'exposition de taille plus adaptée ont été nécessaires (cf. [figure 15](#)).

Néanmoins, on peut constater que ces dispositifs sont tout à fait comparables. Ainsi, l'exposition des organismes à l'uranium se déroule au sein d'unités expérimentales. Une unité expérimentale est associée à un type de contamination donné (une concentration d'un contaminant). Par exemple, pour une expérience avec un groupe témoin, un groupe exposé à une faible concentration d'uranium et un autre exposé à une forte concentration, trois unités expérimentales seront nécessaires. Au sein de chacune des unités, les organismes sont distribués en sous-groupes, physiquement séparés par des systèmes de cages ou de parois grillagées. Cette répartition des individus au sein des unités expérimentales a été conçue afin de limiter dans un volume d'eau restreint les organismes prélevés à chaque temps de prélèvement (optimisant ainsi les conditions de capture des individus) mais également afin de ne pas engendrer de stress sur

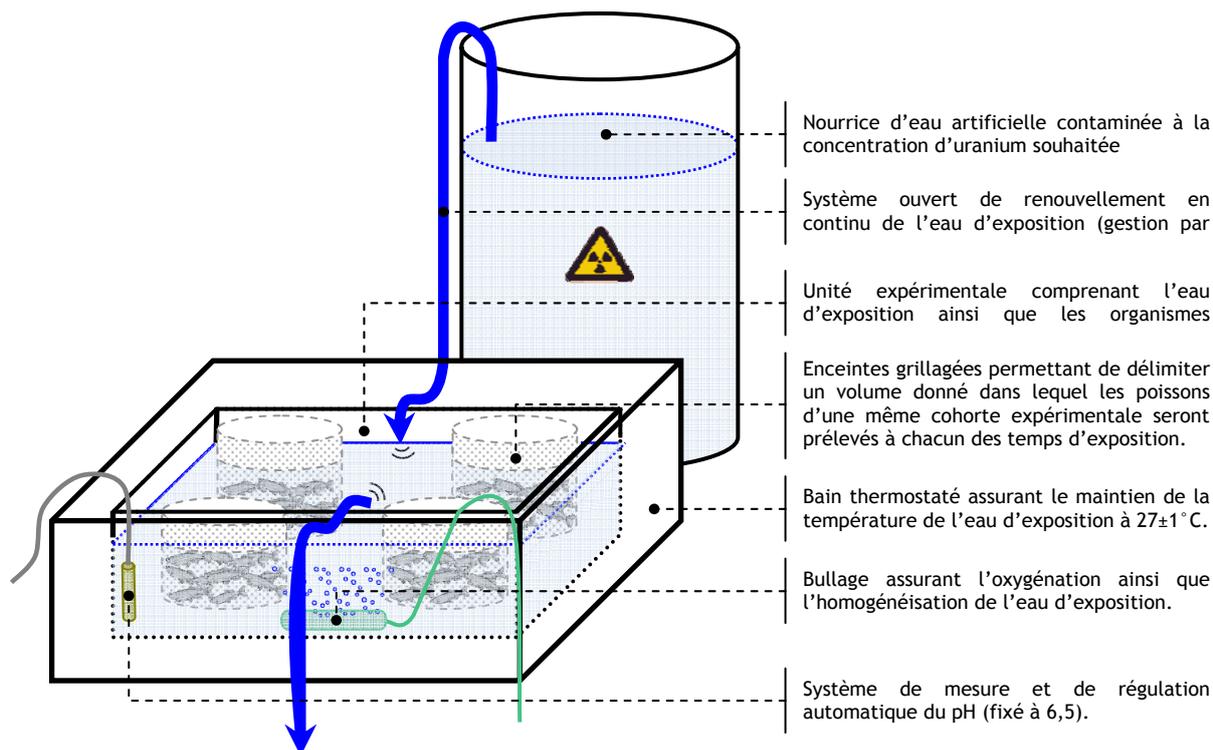


Figure 14. Dispositif utilisé lors d'expérimentations impliquant un nombre important d'organismes (200 à 300 individus par unité expérimentale telle que celle-ci)

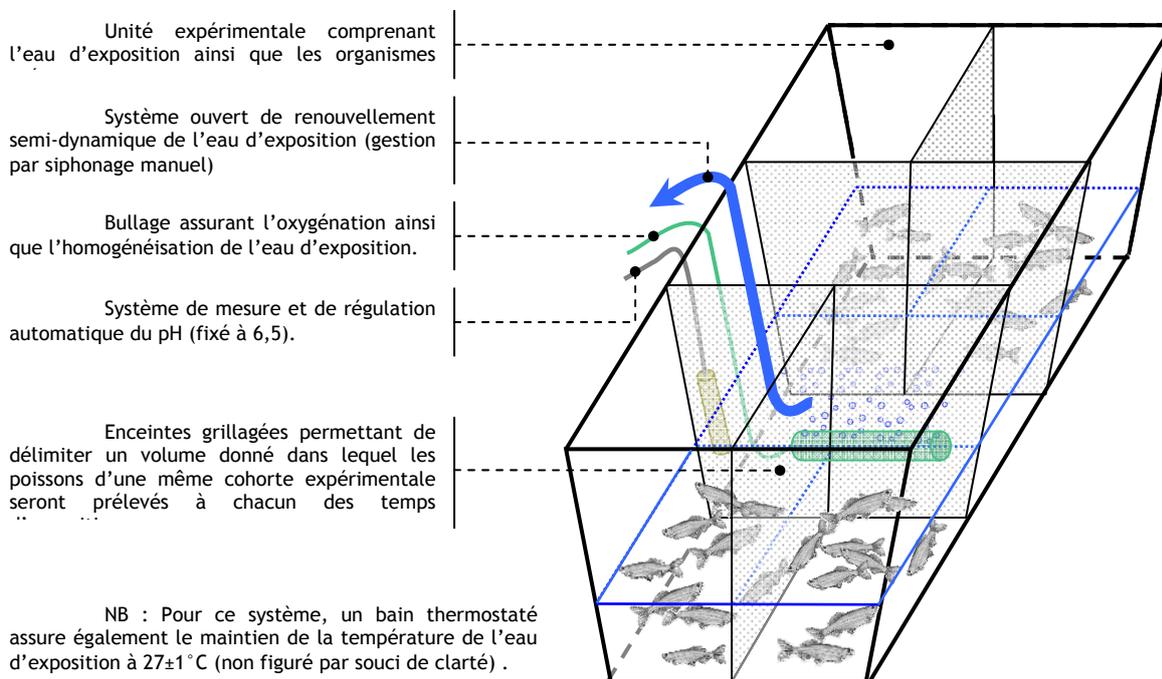


Figure 15. Dispositif utilisé lors d'expérimentations impliquant un nombre restreint d'organismes (une cinquantaine d'individus par unité expérimentale telle que celle-ci).

l'ensemble de la population d'une même unité à chacun des temps de prélèvements. Les poissons sont ainsi divisés en cohortes expérimentales, chacune de ces cohortes étant associée à un temps de prélèvement donné.

La gestion de l'eau contaminée quant à elle varie suivant le type de dispositif utilisé. Elle peut faire l'objet soit d'un renouvellement en continu en système ouvert (auquel cas une nourrice de plusieurs centaines de litres sert de "source" à ce système régulé par des pompes péristaltiques), soit l'eau est renouvelée une fois par jour manuellement (par siphonage). Dans le premier cas, le taux de renouvellement de l'eau est de l'ordre de 25 % par jour, tandis que dans le second, ce taux atteint les 50 % par jour.

Le maintien du pH de l'eau dans laquelle évoluent les organismes s'avère nécessaire du fait, notamment, de leurs rejets azotés (urines et fèces) qui augmentent le pH de l'eau. Afin d'assurer une régulation optimale du pH, sa mesure est effectuée en continu tout au long de l'expérimentation par le biais de sondes adaptées. De plus, un système de régulation automatique relié au pH-mètre permet une rectification directe du pH par ajouts d'HCl (1 M) quand la valeur mesurée dans les bacs devient supérieure à celle souhaitée (6,5).

Le maintien de la température de l'eau est quant à elle assurée par des bains thermostatés dans lesquels sont placées les unités expérimentales. Ces bains sont régulés par des résistances chauffantes pour atteindre une température de 27 ± 1 °C. Un système de recirculation de l'eau de ces bains assure l'homogénéisation de leur eau (et donc de la température) au travers de l'ensemble du système.

Enfin, des pompes à air reliées à des bulleurs présents dans chaque unité expérimentale assurent une bonne oxygénation ainsi qu'une homogénéisation de l'eau d'exposition.

1.4 - Protocoles de contamination et gestion des eaux contaminées

Concernant les protocoles de contamination suivis dans le cadre de ce travail de recherche, le choix s'est porté sur une contamination à t_0 de l'eau des unités expérimentales dans lesquelles les organismes avaient préalablement été acclimatés durant plusieurs semaines (2 minimum). Ce choix a été fait au détriment d'une autre option possible consistant en une acclimatation des organismes en dehors des unités expérimentales, permettant de réaliser la contamination de ces

unités avant le t_0 et ainsi d'amener le système à un état d'équilibre avant l'introduction des poissons. En effet, il faut quelques jours à l'uranium avant de stabiliser sa concentration dans l'eau. Ceci est dû au fait que les éléments du systèmes (parois des bacs, enceintes grillagées, bulleurs, etc.) vont progressivement adsorber l'uranium à leur surface, abaissant ainsi sa disponibilité dans l'eau. Néanmoins, le stress occasionné par un changement de milieu des organismes à t_0 étant jugé trop important, il a été décidé de réaliser leur acclimatation dans le système expérimental.

La contamination initiale de chaque unité expérimentale a donc consisté, à t_0 , en un ajout d'une solution mère d'uranium sous forme de nitrate d'uranyle. Parallèlement, les systèmes alimentés en continu par le biais d'une nourrice ont également fait l'objet d'ajouts au sein de ces réserves.

Le maintien du niveau de contamination dans les unités expérimentales a ensuite été majoritairement assuré par les renouvellements d'eau (soit ceux réalisés à partir des nourrices contaminées soit ceux réalisés manuellement à l'aide d'eaux contaminées préalablement à leur ajout dans les unités). Néanmoins, comme évoqué précédemment, ce maintien a nécessité le recours à de nombreux ajouts supplémentaires de façon quotidienne (3 ou 4 généralement).

Les eaux usées ont quant à elles été rejetées dans des cuves de stockage en vue de leur retraitement.

2 - METHODES D'ANALYSE DE L'URANIUM

Cette section dédiée à la métrologie de l'uranium regroupe l'ensemble des techniques de mesure et des protocoles utilisés pour la quantification de l'uranium présent dans l'eau et les organismes contaminés lors des différentes expérimentations.

D'une manière générale, le choix de la méthode à mettre en œuvre a été fonction de la nature de l'échantillon (eaux contaminées ou échantillons biologiques) et du niveau de concentration en uranium.

2.1 - Techniques de mesure de l'uranium

Les techniques analytiques découlent des propriétés physico-chimiques de l'uranium. Elles peuvent être décomposées en deux catégories en fonction des propriétés appliquées pour la

quantification : les mesures mettant en œuvre les propriétés nucléaires des isotopes de l'uranium et celles découlant de son analyse élémentaire.

Les critères de sélection de la technique utilisable pour l'analyse de l'uranium à l'état de traces dans les eaux contaminées ou les échantillons biologiques dépendent de la sensibilité, de la sélectivité et de la performance (limites de détection et pouvoirs de résolution) de l'outil analytique.

2.1.1 - Technique nucléaire : Comptage par scintillation liquide alpha

Les techniques nucléaires sont basées sur les caractéristiques nucléaires des isotopes de l'uranium et de l'interaction de leurs émissions avec la matière. Les isotopes de l'uranium possèdent notamment des rayonnements α et β . Les résultats sont exprimés en unité d'activité de l'isotope considéré. L'activité d'un radionucléide est définie comme le nombre de désintégrationsⁱ par unité de temps. L'unité d'activité, dans le système international, est le becquerelⁱ (Bq) correspondant à une désintégration par seconde.

Les compteurs à scintillation utilisent la propriété de certaines substances d'émettre de la lumière lorsqu'elles sont soumises à l'action des radiations ionisantes. En scintillation liquide, les émetteurs α et β sont mélangés directement à des composés fluorescents organiques, ce qui diminue les pertes de comptage dues à l'auto-absorption dans la source. Les particules α et β sont absorbées par le cocktail scintillant par ionisation et excitation des atomes du milieu. La désexcitation s'effectue par émission de photons lumineux.

2.1.2 - Techniques élémentaires

Les techniques élémentaires donnent des résultats en masse et en nombre de masse, ou en nombre d'atomes d'uranium présents dans l'échantillon. Dans le cadre de cette thèse, deux techniques élémentaires de mesure de l'uranium ont été utilisées. Il s'agit de deux techniques spectrométriques : la spectrométrie d'émission atomique et la spectrométrie de masse.

2.1.2.1 - Spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES)

Le principe de la spectrométrie d'émission repose sur le fait que les atomes ou les molécules qui sont excités par un apport externe d'énergie émettent des radiations

électromagnétiques caractéristiques. Cette excitation se traduit par un déplacement des électrons des sous-couches externes d'un état énergétique En à un état d'énergie supérieure Ep . Ces électrons sautent alors vers un niveau supérieur instable, plus éloigné du noyau, puis tendent ensuite à revenir à leur niveau initial par une transition électronique. Durant cette transition, les électrons émettent un photon dont la longueur d'onde et la fréquence du rayonnement dépendent des états d'énergie En et Ep . Ainsi, à chaque transition électronique correspond l'émission d'un rayonnement de fréquence déterminée sous la forme d'une raie lumineuse. De ce fait, chaque élément chimique génère un spectre de raies spécifique (fonction du peuplement électronique, des niveaux d'énergie, des transitions d'énergie possibles ainsi que de leur probabilité), que l'on pourrait assimiler à son "empreinte digitale". Concernant l'uranium, les raies spécifiques à sa détection sont celles associées aux longueurs d'onde de 409, 417 et 424 nm.

Dans le cas de la spectrométrie d'émission atomique, la stimulation des atomes est réalisée par une source d'énergie à haute température. Des sources thermiques comme les flammes, les fours, les décharges électriques et les plasmas sont alors utilisées pour convertir les molécules de l'analyte en atomes libres et fournir l'énergie suffisante pour propulser ces atomes à de hauts niveaux d'énergie. Dans notre cas, un plasma d'argon généré par un couplage inductif a été utilisé comme source d'atomisation/d'excitation.

2.1.2.2 - Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS)

De même que précédemment, les éléments constitutifs de l'échantillon doivent être désolvatés et nébulisés, les molécules dissociées et les atomes ionisés avant leur migration vers le spectromètre de masse. L'ICP-MS utilise pour cela un plasma à couplage inductif, alors couplé à un spectromètre de masse permettant la séparation des éléments en fonction du rapport masse sur charge (m/Z). Le spectromètre de masse utilisé est un quadripôle, c'est-à-dire qu'il est constitué de deux paires de barreaux cylindriques amenées à des potentiels électriques opposés. Avec ce type de spectromètre de masse, seuls les ions de rapport masse sur charge donné auront un parcours stable et seront mesurés, les autres entrant en collision avec un des barreaux du quadripôle. La mesure des ions ainsi sélectionnés est réalisée par l'intermédiaire d'un multiplicateur d'électrons et s'exprime alors en nombre d'atomes pour chaque unité de masse atomique.

L'avantage de cette seconde technique réside dans une meilleure efficacité de détection ainsi que dans la possibilité de mesures isotopiques.

2.2 - Spécifications des appareils employés

Les analyses en scintillation liquide ont été réalisées par Marcel Morello sur un compteur de type Quantulus 1220 (Wallac Oy, Turku, Finland) dont la limite de détection des particules alpha est de 30 mBq.

Les analyses par spectrométrie d'émission atomique ont été réalisées par Virginie Camillieri et Ludivine Boggiato sur un appareil de type Optima 4300DV (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) dont la limite de détection de l'uranium est de 5µg/L pour des eaux contaminées et de l'ordre de 10 µg/L pour des matrices complexes de type échantillons biologiques.

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par le laboratoire d'analyses radiochimiques et chimiques (LARC) du commissariat à l'énergie atomique (CEA), sous la direction d'Olivier Provitina. L'appareil utilisé était de type Elan-6000, (Perkin Elmer) dont la limite de détection des isotopes de l'uranium est de 20 ng/L.

2.3 - Protocoles de préparation des échantillons en vue de ces analyses

2.3.1 - Mise en solution des échantillons biologiques

L'ensemble des techniques précédemment décrites nécessitent que l'échantillon à analyser soit sous forme liquide. De ce fait, la mesure de l'uranium dans les prélèvements d'eau contaminée ne nécessite aucun traitement préalable si ce n'est leur acidification au moyen d'acide nitrique (ajout de 2 % d'acide nitrique concentré à 65 % dans chacun des échantillons). L'analyse des échantillons biologiques exige quant à elle une étape préalable supplémentaire : la mise en solution des matrices solides

Les échantillons biologiques sont généralement minéralisés par digestion acide, les acides forts et l'eau oxygénée assurant, dans des mélanges et en proportions variables, la minéralisation et la mise en solution.

L'attaque acide employée sur nos échantillons a été réalisée à l'aide d'acide nitrique. L'acide nitrique représente en effet l'oxydant de base, utilisé dans pratiquement tous les procédés de décomposition de la matière organique. Il réagit aisément avec les composés aliphatiques et aromatiques, donnant naissance à des réactions d'oxydation, d'estérification et de nitrification. Adaptées à l'analyse de routine, les attaques fortes sont faciles à appliquer mais leur action est souvent incomplète (en raison de la non-dissolution des résidus silicatés). Ceci n'affectant pas le résultat des analyses menées en aval, ce protocole a donc été jugé comme étant entièrement satisfaisant dans le cas de notre étude.

A la suite de l'attaque acide, une seconde étape de minéralisation doit être réalisée, faisant intervenir alors du peroxyde d'hydrogène. Dans notre protocole, préalablement à l'ajout de peroxyde d'hydrogène, l'échantillon est évaporé à sec. L'addition de peroxyde d'hydrogène assure alors la digestion des derniers résidus.

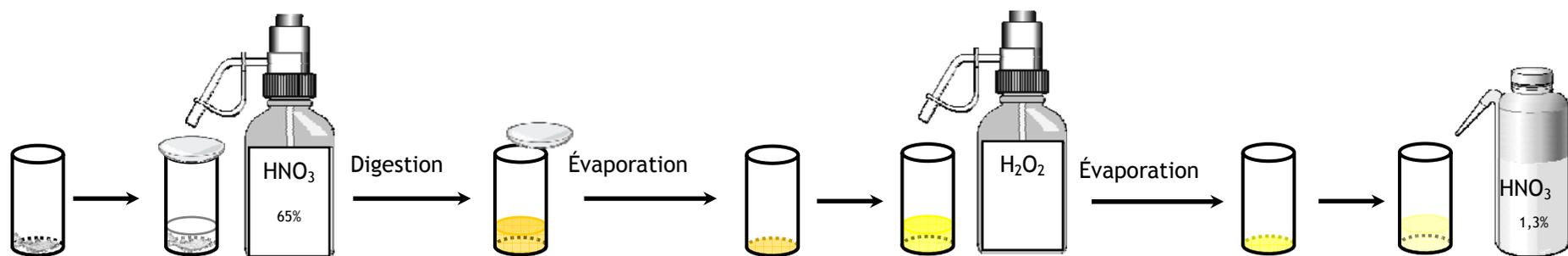
Le détail du protocole est présenté en [figure 16](#).

2.3.2 - Acidification des analytes

Suivant la technique analytique réalisée en aval de la préparation des échantillons (prélèvements d'eau ou minéralisats d'échantillons biologiques), le volume de l'analyte ainsi que la molarité de son acidification seront différents.

Ainsi, pour les analyses par comptage en scintillation liquide, 1mL d'analyte suffit. Les prélèvements d'eau d'exposition (de pH égal à 6,5) ne nécessitent aucune acidification préalable. Les minéralisats, quant à eux, sont repris dans de l'eau acidifiée à 1,3 % d'acide nitrique (0,3 M). Les analytes ainsi obtenus sont alors placés dans des flacons en verre et 19 mL d'un cocktail de scintillation ((Instagel, Packard Instruments, Rungis, France) sont finalement ajoutés.

Pour les analyses par spectrométrie d'émission atomique, les prélèvements d'eau d'exposition ainsi que les minéralisats biologiques ont dû faire l'objet d'une acidification à hauteur de 1,3 % d'acide nitrique (0,3 M). Le volume final d'analyte nécessaire à cette technique étant de 5 mL, 100 μ L d'acide nitrique concentré (65 %) ont donc été ajoutés à 4,9 mL d'eau d'exposition ou à 4,9 mL d'eau distillée pour la remise en solution des minéralisats biologiques.



Echantillon de départ : L'échantillon biologique (organisme entier ou tissu isolé), préalablement pesé, est introduit dans un tube de polypropylène (DigiTUBE; SCP Science, Champlain, NY, USA).

Etape 1 : 3mL d'une solution d'acide nitrique concentrée (HNO_3 65 %) sont ajoutés. Les tubes à minéralisation sont alors recouverts d'un verre de montre de polypropylène puis placés dans un minéralisateur (DigiBLOC 3000 digestion system; SCP Science). Un premier cycle de chauffe est alors initié (95 °C pendant 90 min).

Etape 2 : Les verres de montre sont ôtés permet ainsi l'évaporation à sec des échantillons lors d'un nouveau cycle de chauffe (105 °C pendant 60 min).

Etape 3 : 2mL de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 60 %) sont ensuite ajoutés et un dernier cycle de chauffe (95 °C pendant 60 min) assure une nouvelle évaporation à sec.

Etape 4 : Ajout d'eau distillée acidifiée (le volume de l'ajout ainsi que la molarité de l'acide nitrique dépendent de l'analyse réalisée en aval).

Figure 16. Procédure de minéralisation des échantillons biologiques en vue de leur analyse par scintillation liquide, ICP-AES ou ICP-MS.

Enfin, pour les analyses par spectrométrie de masse (qui n'ont concerné que des échantillons biologiques), les minéralisats ont été repris dans 5 mL d'eau distillée acidifiée à 4,3 % d'acide nitrique (1 M).

3 - MESURES DE BIOACCUMULATION, ESTIMATION DES DEBITS DE DOSE

A partir des données obtenues par les différentes techniques analytiques précédemment présentées, différents paramètres relatifs à l'internalisation de l'uranium dans les organismes ont pu être calculés et estimés.

3.1 - Bioaccumulation

La bioaccumulation de l'uranium, définie par [François Ramade \(1998\)](#) comme étant *“le phénomène par lequel une substance présente dans un biotope pénètre dans un organisme (...)”*, a été déterminée par application du calcul de la concentration tissulaire :

$$\text{concentration tissulaire } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{masse d'uranium internalisée } (\mu\text{g})}{\text{masse de tissu } (g)} .$$

3.2 - Bioconcentration

Un autre paramètre relatif à l'internalisation de l'uranium, la bioconcentration, a également été déterminé. La bioconcentration est définie comme étant *“le phénomène par lequel des êtres vivants absorbent des substances présentes dans leur biotope et les accumulent dans leur organisme à des concentrations supérieures à celles auxquelles elles se rencontrent dans le milieu naturel”* ([Ramade, 1998](#)). Elle est calculée, à l'équilibre, comme suit :

$$\text{facteur de bioconcentration (BCF)} = \frac{\text{concentration tissulaire } (\mu\text{g/g})}{\text{concentration de l'uranium dans l'eau } (\mu\text{g/g})} .$$

3.3 - Concentration tissulaire relative

Concernant les mesures de détection de l'uranium à l'échelle tissulaire, les résultats ont été présentés sous la forme de concentrations relatives de l'uranium dans un tissu donné vis-à-vis de l'organisme entier. Leur calcul est défini par l'équation :

$$\text{concentration relative} = \frac{\text{concentration à l'échelle du tissu } (\mu\text{g/g})}{\text{concentration à l'échelle de l'organisme } (\mu\text{g/g})} .$$

En d'autres termes, il s'agit du rapport entre la concentration de l'uranium dans un tissu ou organe donné et sa concentration à l'échelle de l'organisme entier.

Ce paramètre permet la détection d'une hétérogénéité dans la distribution de l'uranium au sein de l'organisme entier. Cette normalisation des facteurs d'accumulation associés à chacun des tissus par rapport au facteur de bioaccumulation de l'organisme pris dans son entier permet ainsi de mettre en évidence les tissus ou organes "cibles" pouvant être considérés comme étant des sites spécifiques de l'accumulation de l'uranium dans l'organisme (concentration relative > à 1) et ceux qui contribuent de manière plus limitée à la charge totale d'uranium dans le corps (concentration relative < à 1).

3.4 - Conversions en débits de doses radiologiques

L'accumulation d'uranium au sein d'un organisme va induire une irradiation interne des tissus qui le composent. La grandeur utilisée pour quantifier le rayonnement reçu et le relier à ces effets est appelée la dose, l'estimation de cette dose étant appelée dosimétrie.

3.4.1 - Quelques notions de dosimétrie

Les rayonnements émis par les substances radioactives interagissent avec la matière en y cédant de l'énergie. La quantité d'énergie cédée à une unité de masse est appelée la dose absorbée¹. Elle s'exprime en gray¹ (Gy) qui correspond à une énergie de 1 joule (J) cédée dans 1 kilogramme de matière (1 Gy = 1 J/kg).

Cette dose peut être mesurée directement à l'aide de dosimètres ou peut être estimée mathématiquement par des codes de calcul. Dans le cadre de cette thèse, la mesure directe n'a pu être réalisée que ponctuellement pour estimer des doses externes et/ou le bruit de fond. La modélisation a quant à elle été mise en œuvre pour toutes les autres estimations dosimétriques, et a été réalisée par le biais d'un programme informatique : le logiciel EDEN (pour Elementary Dose Evaluation for Natural Environment), développé par l'IRSN et présenté dans le paragraphe suivant.

3.4.2 - Le logiciel EDEN, un outil de conversion radiologique

Comme précédemment évoqué, les niveaux d'accumulation d'uranium dans les organismes exposés ont été convertis en doses radiologiques par le biais du logiciel EDEN 2.0 (Beaugelin-Seiller et al., 2004 et 2006).

Ce programme constitue une méthode informatique rapide et simple d'utilisation pour le calcul de la dose radiologique^① reçue par un organisme vivant exposé à un radioélément. Cette dose est estimée par le biais de facteurs de conversion de dose, exprimés par unité de temps et par unité de concentration du radioélément au sein du compartiment qui le contient (soit le milieu environnant s'il s'agit d'une irradiation externe, soit l'organisme même s'il s'agit d'une irradiation interne). On parle alors de DPUCs (pour "*dose rate per unit of concentration*" soit "débit de dose par unité de concentration") exprimés en Gy/unité de temps par Bq/unité de volume ou de masse.

Les principes de calcul de ces facteurs de conversion supposent trois composantes de modélisation : la forme de l'organisme modèle, sa composition élémentaire, ainsi que la composition de la source radioactive (combinaison de plusieurs radionucléides).

Dans le cadre de notre étude, les poissons ont été considérés comme étant des ellipsoïdes (de 3,6 cm de long, 0,8 cm de haut et 0,4 cm de large) composés, en termes de masse, par 10,2 % d'hydrogène, 9,5 % de carbone, 77 % d'oxygène et 2,3 % d'azote. Les sources radioactives ont quant à elles été définies par le biais du logiciel Nuclide 2000, développé par l'ITE (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany). Ce logiciel est un puissant outil de calcul permettant d'inventorier l'ensemble des descendants d'un radionucléide apparus dans un intervalle de temps donné. Il a donc permis d'établir la liste des radio-isotopes de l'uranium employés lors des différentes expérimentations (^{234}U , ^{235}U et ^{238}U constitutifs de l'uranium appauvri et ^{233}U) ainsi que de leurs descendants respectifs sélectionnés pour la composition des différentes sources de contamination en fonction de leur pertinence vis-à-vis de la période d'exposition considérée (généralement 20 j). Cette liste ainsi que les DPUCs correspondant à chacun de ces radio-isotopes sont présentés dans le [tableau VII](#).

Tableau VII. Liste des radio-isotopes de l'uranium employés lors des différentes expérimentations (^{234}U , ^{235}U et ^{238}U pour l'uranium appauvri et ^{233}U) et de leurs descendants respectifs sélectionnés pour la composition des différentes sources radioactives en fonction de leur pertinence vis-à-vis des durées d'expositions considérées (20 j). Cette liste a été établie par le logiciel Nuclides 2000 développé par l'ITE (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) et présente les DPUCs correspondantes (*dose rate per unit of concentration*, exprimées en Gy/j par Bq/g) calculées par le logiciel EDEN (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment) développé par l'IRSN.

Décroissance radioactive de l'uranium appauvri						Décroissance de l' ^{233}U	
Isotopes	DPUCs	Isotopes	DPUCs	Isotopes	DPUCs	Isotopes	DPUCs
^{234}U	$6,56 \cdot 10^{-5}$	^{235}U	$6,12 \cdot 10^{-5}$	^{238}U	$5,78 \cdot 10^{-5}$	^{233}U	$6,63 \cdot 10^{-5}$
^{230}Th	$6,43 \cdot 10^{-5}$	^{231}Th	$1,53 \cdot 10^{-6}$	^{234}Th	$6,40 \cdot 10^{-7}$	^{229}Th	$6,87 \cdot 10^{-5}$
^{226}Ra	$6,56 \cdot 10^{-5}$	^{231}Pa	$6,92 \cdot 10^{-5}$	$^{234\text{m}}\text{Pa}$	$4,96 \cdot 10^{-6}$	^{225}Ra	$1,25 \cdot 10^{-6}$
^{222}Rn	$7,53 \cdot 10^{-5}$	^{227}Ac	$1,12 \cdot 10^{-6}$	^{234}U	$6,56 \cdot 10^{-5}$	^{225}Ac	$7,94 \cdot 10^{-5}$
				^{234}Pa	$3,03 \cdot 10^{-6}$	^{221}Fr	$8,71 \cdot 10^{-5}$
						^{209}Pb	$2,37 \cdot 10^{-6}$
						^{213}Bi	$5,60 \cdot 10^{-6}$
						^{209}Tl	$4,91 \cdot 10^{-6}$

Les DPUCs ainsi obtenus sont ensuite utilisés pour la conversion des facteurs de bioaccumulation (exprimés en $\mu\text{g d'U/g}$ de tissu) en débits de doses absorbées ($\mu\text{Gy/j}$). Pour cela, le facteur de bioaccumulation d'un isotope i ($\mu\text{g d}'i/\text{g}$ de tissu) est tout d'abord multiplié par l'activité spécifique de cet isotope ($\text{Bq}/\mu\text{g d}'i$). On obtient alors la quantité de becquerels associés à i par gramme de tissu (Bq/g de tissu). Ce nouveau paramètre est alors multiplié par le DPUC de i ($\mu\text{Gy/j}$ par Bq/g) pour obtenir le débit de dose délivré par i ($\mu\text{Gy/j}$). Le débit de la dose totale absorbée ($\mu\text{Gy/j}$) est finalement obtenu en effectuant la somme des débits de dose associés à chacun des isotopes listés.

4 - PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS TISSULAIRES EN VUE DES ANALYSES BIOLOGIQUES

4.1 - Prélèvement des différents tissus et organes

Après avoir été prélevé du système d'exposition, le poisson est directement placé en décubitus dorsal (face ventrale vers le haut) sur une plaque de liège assez épaisse. Afin de le maintenir dans cette position, une première aiguille est plantée dans la lèvre inférieure de l'animal puis enfoncée dans le liège. On pratique alors une incision assez profonde à la base des opercules, de part et d'autre du corps, de façon à dégager la cavité cardiaque. Il s'en suit alors une hémorragie locale. Cet afflux de sang permet alors de pratiquer un prélèvement sanguin d'une dizaine de microlitres à l'aide d'une micropipette dont le cône aura été préalablement hépariné (héparine à 5000 U/mL). Le sang est alors dilué d'un facteur 100 dans une solution de cryopréservation dont la composition est la suivante : sucrose 250 mM (85,5 g/L), citrate trisodique 40 mM (11,76 g/L), DMSO 5 % (50 mL/L), et dont le pH est ajusté à pH 7,6 au moyen d'une solution d'acide citrique concentrée (1M). La suspension ainsi obtenue est ensuite aliquotée en 4 fractions qui sont alors plongées dans de l'azote liquide afin d'assurer une ultracongélation rapide. Les échantillons sanguins sont alors placés à -80 °C jusqu'à analyse.

Une fois la prise de sang réalisée, on effectue les mesures morphométriques de l'animal (poids et longueur totale). On pratique ensuite une seconde incision au niveau de la papille urogénitale de part et d'autre de l'abdomen, de façon à dégager un espace permettant l'insertion de la pointe des ciseaux. On coupe alors la peau et les muscles en remontant l'abdomen jusqu'à rejoindre la première incision, à la base de la tête, en prenant soin de ne pas léser les organes sous-jacents. Puis, à l'aide de deux aiguilles, on écarte les deux lambeaux de peau ainsi formés, dégageant ainsi la partie haute de l'abdomen. Enfin, on fait de même dans la partie basse de l'abdomen en écartant les lambeaux de peau situés à proximité de la papille urogénitale. Le poisson ainsi positionné est présenté en **figure 17**.

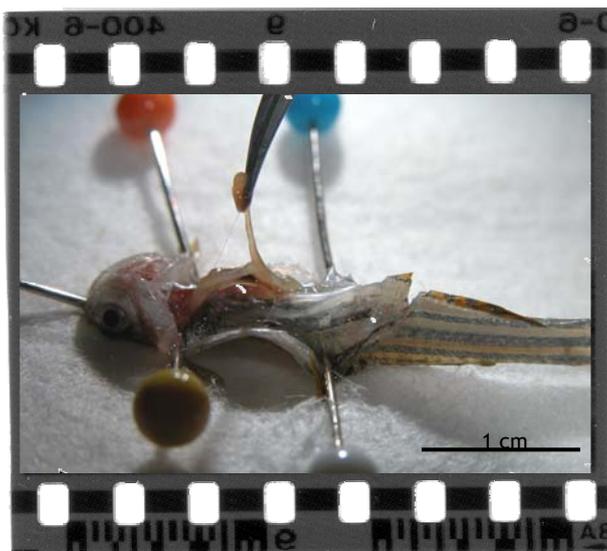


Figure 17. Photo illustrant le positionnement de l'animal sur la planche à dissection.

Pour prélever le foie, il faut se repérer par rapport au tube digestif, l'organe hépatique étant accolé à ce tube. Sa couleur varie d'un rose très pâle à un rouge plus prononcé, mais peut également tirer vers le jaune-orangé (les foies de couleur verdâtres sont à considérer comme potentiellement symptomatiques d'une pathologie). Une fois repéré, il faut le prélever délicatement, en plusieurs fois si nécessaire puisque cet organe présente une faible cohésion.

Une fois le tissu hépatique prélevé, la récupération des viscères au sens large (tube digestif, rate, pancréas, reins, cœur, etc.) est alors possible, de même que la récupération des gonades, situées de part et d'autres de la colonne vertébrale, souvent accolées à la vessie natatoire.

Le dégagement des branchies nécessite tout d'abord de déchirer les opercules ainsi que la peau qui se situe entre les chambres branchiales. Il suffit ensuite de tirer tout doucement sur les arcs branchiaux pour que ces derniers se détachent.

Pour atteindre le tissu cérébral, il suffit ensuite de perforer la partie du crâne mise à jour une fois les appareils branchiaux prélevés, le cerveau apparaissant alors comme une masse blanche très clairement identifiable.

La dissociation du squelette, du tissu musculaire et de la peau est ensuite assez aisée. Tout d'abord, il faut dégager du tissu musculaire l'ensemble de la colonne vertébrale ainsi que les côtes. L'isolement du squelette est assez fastidieux mais réalisable avec un tant soit peu de minutie. La

récupération du tissu musculaire suppose ensuite un léger raclage de la peau à l'aide de pinces fines.

4.2 - Préparation des échantillons pour les différentes analyses biologiques

Selon le type d'analyse auquel ils sont destinés, les prélèvements biologiques subissent différents protocoles de préparation.

4.2.1 - Préparation pour des dosages biochimiques

Les dosages enzymatiques (relatifs aux suivis de biomarqueurs de stress oxydant et de neurotoxicité) nécessitent que les tissus biologiques (de foie et de cerveau) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire. L'ensemble de ces procédures se déroulent dans un tampon adapté dont la composition est la suivante : tampon phosphate 100 mM (8,44 mL), glycérol 20 % (1,56 mL) et phénylméthane sulfonyl fluorure (PMSF) 0,2 mM (2 µL).

Une fois l'organe prélevé, il doit donc être placé dans un microtube dans lequel un volume déterminé de ce tampon aura préalablement été déposé (environ 50µL pour 10mg de tissu, ce rapport étant moindre pour des masses de tissus plus importantes). Etant donnée l'insuffisance du matériel biologique disponible sur un seul individu, les organes de 4 individus différents doivent être regroupés au sein d'un même échantillon.

Le broyage des tissus doit être réalisé directement dans le microtube où il se trouve, et ce afin d'éviter une perte trop importante de matériel lors de transvasements successifs. La vitesse de rotation de l'homogénéisateur doit être assez faible pour ne pas réchauffer l'échantillon mais suffisante pour minimiser le temps de broyage et ainsi éviter une détérioration de l'échantillon. Une fois les tissus correctement homogénéisés dans le tampon, on procède à leur centrifugation (15 min ; 10 000 g ; 4 °C) en vue de l'obtention de la fraction dite "S9".

La fraction S9¹ est en effet utile pour l'étude du métabolisme cellulaire puisqu'elle contient les enzymes microsomaux et cytosoliques.

Une fois cette fraction obtenue, elle est aliquotée (généralement en deux aliquots) et stockée à - 80 °C jusqu'à quelques semaines avant analyse.

4.2.2 - Préparation pour des mesures de génotoxicité

Les techniques analytiques de mesure de génotoxicité requérant des échantillons sous la forme de suspensions cellulaires, deux cas de figures sont apparus, différenciant les cellules sanguines (naturellement isolées) des cellules hépatiques et gonadiques (nécessitant une étape préalable d'isolement cellulaire).

4.2.2.1 - Cas du tissu sanguin

Les cellules constitutives du sang étant naturellement sous la forme de cellules isolées en suspension, les analyses de génotoxicité sur érythrocytes ont pu être effectuées directement à partir des aliquots réalisés lors du prélèvement sanguin.

4.2.2.2 - Cas des tissus hépatique et gonadique

Les cellules constitutives des tissus hépatique et gonadique (testiculaire) n'étant pas naturellement isolées, il a donc fallu mettre en place une étape d'isolement cellulaire de manière à obtenir les suspensions cellulaires nécessaires à la réalisation des analyses de génotoxicité. Le développement de cette technique de dissociation tissulaire a été réalisé dans le cadre du stage de DEA de [Maeva Giraud](#) (2006) et du travail de thèse de Yannick Gania (du Laboratoire des Sciences de l'Environnement).

Après prélèvement du foie ou des testicules, les organes sont immergés dans 2 mL de tampon phosphate (PBS 10 mM) contenant 0,02 % d'EDTA maintenu à 25 °C. Ce premier tampon permet de complexer les ions Ca^{2+} qui assurent la cohésion des tissus, facilitant ainsi la digestion enzymatique.

Le tampon est ensuite prélevé pour être remplacé par 1 mL d'une solution de collagénase maintenue à 25 °C. Cette solution comprenant 1 mg/mL de collagénase type IV, 10 mM d'HEPES et 5 mM de $CaCl_2$ (cofacteur essentiel au bon fonctionnement de l'enzyme) est préparée dans du PBS (10 mM), filtrée à 0,2 μ m et peut être stockée à -20 °C avant son utilisation. Le tissu est alors sommairement désagrégé dans cette solution enzymatique par 2 ou 3 cycles successifs d'aspiration-

refoulement à l'aide d'une micropipette, avant d'être incubé durant 30 min sous agitation douce (120 rpm) à 25 °C.

A l'issue de l'incubation, les résidus tissulaires non digérés sont aspirés et refoulés à quelques reprises à l'aide d'une micropipette afin d'effectuer une dissociation mécanique de ces résidus. La suspension ainsi obtenue est alors déposée sur un filtre en nylon de 60 µm de vide de maille placé au dessus d'un flacon en verre à large encolure. Le flacon contenant initialement le tissu et dans lequel s'est déroulé l'incubation est alors rincé à deux reprises à l'aide de 500 µL d'une solution de PBS (10 mM) maintenue à 4 °C et contenant de la BSA (10 %) permettant de stopper l'action de la collagénase. Ces volumes de rinçage sont alors filtrés à leur tour.

La suspension cellulaire ainsi filtrée est alors transvasée dans un tube à centrifugation. Une fois encore, une étape de rinçage du flacon contenant la suspension cellulaire est réalisée à l'aide de 500 µL de la solution de PBS (10 mM) maintenue à 4 °C et contenant de la BSA (10 %). Le volume final contenu alors dans le tube de centrifugation est de l'ordre de 2 à 2,5 mL.

La suspension cellulaire est alors centrifugée à 110 *g* pendant 10 min à 8 °C. Le surnageant ainsi formé est ensuite éliminé.

A partir de cette étape du protocole d'isolement, le traitement des échantillons hépatiques diffère de celui des échantillons testiculaires. En effet, du fait d'une importante contamination des suspensions hépatiques par la présence d'érythrocytes, une lyse spécifique des globules rouges est réalisée par une incubation de 10 min de la suspension hépatocytaire à température ambiante dans 500 µL d'un tampon préparé dans de l'eau ultra-pure contenant 144 mM de NH₄Cl et 17 mM de Tris et amené à un pH de 7,2 au moyen d'une solution d'HCl à 1 mM (Betti et al., 1993). Cette lyse est ensuite stoppée par l'ajout de 1,5 mL de milieu de culture (Leibovitz's L15 enrichi en glutamine) contenant de l'HEPES (10 mM). Le culot cellulaire provenant des gonades est également repris dans ce milieu de culture (2 mL). La suite du traitement des échantillons hépatiques et testiculaire est alors la même.

On procède à une nouvelle centrifugation de chaque suspension cellulaire à 110 *g* pendant 10 min à 8 °C. Le surnageant est ôté et le culot est repris dans 500 µL (gonades) ou 300 µL (hépatocytes) du milieu L15-HEPES maintenu à 4 °C.

Un comptage sur cellule de Malassez est ensuite réalisé à partir d'un mélange volume à volume de la suspension cellulaire obtenue et de bleu trypan à 0,4 %. Ceci permet alors de déterminer la densité et la viabilité cellulaire de la suspension par le test d'exclusion au bleu trypan. De façon générale, les suspensions obtenues à partir du tissu hépatique ne nécessitent pas de dilutions préalables à leur analyse par l'essai des comètes, tandis que les suspensions issues de l'isolement du tissu testiculaire requièrent une dilution d'un facteur proche de 20.

4.2.3 - Préparation pour des observations par microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission requiert la préparation de coupes histologiques ultrafines (d'épaisseur inférieure à 140 nm) et impose de conserver au mieux les structures correspondant à l'état vivant (c'est à dire de respecter les répartitions moléculaires au sein des structures biologiques). Les échantillons doivent donc être prélevés juste après la mort de l'animal. Leur taille doit être très réduite de façon à ce que les diverses solutions dans lesquelles ils vont être immergés pénètrent bien l'intégralité du volume de chaque échantillon. Au cours de ce travail de recherche, parmi les tissus concernés par ce type de préparation (testicules, muscle, branchies et cerveau), seuls les testicules et le cerveau ont pu être prélevés dans leur intégralité. Les prélèvements musculaires et branchiaux ont en effet dû faire l'objet de prélèvements sous la forme de petits cubes d'environ 1 mm³.

Les échantillons tissulaires ainsi prélevés sont alors immédiatement immergés dans un tampon assurant une fixation chimique de la matière vivante. Cette fixation a pour but de bloquer les systèmes enzymatiques et de rendre les molécules insolubles dans l'eau mais aussi dans les solvants organiques utilisés lors de la déshydratation. Pour cela, on utilise un mélange osmotiquement et ioniquement équilibré de fixateurs de pénétration et d'action rapide (solution à 1,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate maintenu à 4 °C). Les échantillons tissulaires y sont alors laissés au minimum 24 h à 4 °C.

Suite à cette fixation chimique, les échantillons font l'objet d'une étape dite de post-fixation. Il s'agit d'un marquage à l'osmium permettant d'obtenir un meilleur contraste lors des observations sous le faisceau électronique. Pour ce faire, les échantillons tissulaires sont extraits du

tampon de fixation et rincés à deux reprises dans du tampon cacodylate. Ils sont ensuite plongés durant 1 heure à l'obscurité dans une solution à 1 % d'acide osmique dans du tampon cacodylate (ainsi préparées, les structures noircissent). Les échantillons sont enfin rincés à trois reprises dans du tampon cacodylate.

Les tissus doivent ensuite être déshydratés par des bains successifs d'alcool éthylique avant d'être inclus dans des résines non hydrosolubles. Cette déshydratation doit être suffisamment rapide pour préserver l'intégrité des tissus. Pour ce faire, les tissus sont mis successivement en contact avec de l'éthanol à 50 % (2 x 5 min), à 70 % (2 x 5 min), à 95 % (2 x 5 min), à 100 % (2 x 30 min) et enfin avec de l'oxyde de propylène (2 x 30 min).

Une fois déshydratés, les tissus peuvent être inclus dans des supports de résine. Les milieux d'inclusion sont des mélanges de résines fluides qui durcissent après polymérisation. Ces résines ne doivent pas changer de volume en polymérisant afin d'éviter les phénomènes de retrait. Elles doivent donner à l'échantillon une dureté homogène pour réaliser des coupes d'épaisseur régulière, ne pas dégazer lors de la mise sous vide et être stable sous le faisceau d'électrons. La technique d'inclusion comporte deux étapes : une imprégnation préalable du tissu par le milieu d'inclusion qui consiste en un remplacement progressif de l'oxyde de propylène par la résine (Epon 812) et une polymérisation (réalisée en étuve à 60 °C).

Les échantillons ainsi inclus peuvent alors faire l'objet de coupes ultrafines réalisées au moyen d'un ultramicrotome (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) équipé d'un couteau de diamant. L'épaisseur optimale de ces coupes se situe entre 60 et 100 nm. Elles sont ensuite déposées sur des grilles de cuivre, de nickel, d'or ou de platine d'un diamètre de 3,5 mm.

Les coupes peuvent subir si nécessaire une coloration à l'acétate d'uranyle à 7 % dans de l'alcool éthylique et/ou au plomb, ce qui augmente le contraste entre les différentes structures cellulaires avant observation des structures au MET.

5 - BIOMARQUEURS HEPATIQUES DE STRESS OXYDANT

Comme précédemment décrit dans le paragraphe 4.2.1, les analyses de biomarqueurs de stress oxydant sont réalisées sur la fraction S9 du foie des organismes. Le volume total disponible pour chacune des fractions ainsi obtenues est d'environ 150 µL. Le développement et la mise au

point de ces dosages en microplaque ont été réalisés par Olivier Palluel de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques de l'INERIS.

5.1 - Dosage de la charge protéique

Ce dosage permet de normaliser les résultats obtenus à l'issue des dosages enzymatiques en fonction d'une quantité totale de protéines présente dans les échantillons.

5.1.1 - Principe du dosage

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par [Bradford \(1976\)](#). Il s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines (la forme anionique est en effet stabilisée par des interactions hydrophobiques et ioniques, ce colorant réagissant avec des restes de l'arginine et en moindre importance avec de l'histidine, la lysine, la tyrosine, la trypsine et la phénylalanine). Par conséquent, il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

5.1.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéine standard : la BSA (albumine de sérum bovin). Cette gamme comprend 5 points : 0, 50, 100, 200 et 400 mg/L. Elle est préparée dans un tampon phosphate à 100 mM pH 7,8 (désigné par convention dans ce document par le sigle Tp(P)) dont la préparation est réalisée à partir de deux solutions : une solution A de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 26,8 g/L et une solution B de KH_2PO_4 à 13,6 g/L (l'ajustement de la solution A à pH 7,8 se faisant à l'aide de la solution B).

Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Ainsi, pour les fractions S9 hépatiques, trois dilutions sont réalisées par défaut sur les échantillons : 1/10, 1/20 et 1/40.

On dépose alors 5 μ L de blanc (Tp(P)), de standard, ou d'échantillon dilué dans chacun des puits de la microplaque. Ces dépôts sont à réaliser en triplicat. Deux cent cinquante microlitres de réactif de Bradford sont ensuite ajoutés avant de procéder à une agitation de quelques secondes de la microplaque ainsi préparée.

S'en suit alors une incubation de 20 à 30 min à température ambiante (la coloration restant stable environ 1 h). A l'issue de cette incubation, la microplaque est brièvement agitée puis introduite dans le lecteur (SpectraMax® Plus³⁸⁴, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.). L'absorbance de chacun des puits est alors lue à 595 nm.

Le traitement des résultats est réalisé par le biais du logiciel SoftMax Pro 4.8 (Molecular Devices), qui détermine l'équation de la droite "absorbance = f (concentration protéique)" à partir des résultats obtenus sur la gamme de BSA. La concentration protéique de chacun des échantillons est alors déduite en tenant compte du facteur de dilution initial.

5.2 - Dosage de la quantité de glutathion total (GShtot)

5.2.1 - Principe du dosage

Le dosage des différentes formes du glutathion suit le protocole décrit par [Vandeputte et al. \(1994\)](#). Cette technique est basée sur la réaction entre le groupement thiol (-SH) du glutathion et le DTNB (dithiobisnitrobenzoate ou acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)). En effet, le groupement SH réduit le DTNB en TNB (thionitrobenzoate ou acide 5-thio(2-nitrobenzoïque)). Le TNB, coloré en jaune, possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (412-415 nm) qui permet un dosage du glutathion présent initialement dans le milieu réactionnel.

5.2.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de glutathion sous sa forme réduite (GSH). Cette gamme, préparée dans du Tp(P) additionné d'EDTA (10 mM) et de BSA (5 g/L), comprend 5 points : 0, 10, 50, 100, 150 μ M de GSH.

Le principe du dosage reposant sur une interaction de groupements thiols avec le DTNB, une étape de précipitation des protéines présentes dans les échantillons est donc préalablement

nécessaire afin de ne doser que les groupements thiols du glutathion. Ce traitement est également appliqué sur les standards. Quarante microlitres de chacun des standards ou des échantillons sont ainsi mis en contact avec 10 μL d'acide trichloracétique (TCA) à 25 % (5 % finaux) pendant 10 min sur glace. Une centrifugation de 15 min à 2 000 g à 4 °C permet ensuite de récupérer le surnageant qui constituera alors l'échantillon à doser.

Une dilution de ces échantillons d'un facteur 4 est ensuite nécessaire. Pour cela, 7,5 μL de Tp(P) - EDTA (10 mM) sont ajoutés à 2,5 μL . L'ensemble est alors déposé en duplicat dans chacun des puits de la microplaque.

La réalisation du dosage nécessite ensuite la préparation d'un réactif (désigné MIX) dont la composition est la suivante : 2,55 mL d'une solution stock de NADPH (2mM dans Tp(P) - EDTA 10 mM), 15 mL d'une solution de DTNB (10 mM dans Tp(P) - EDTA 10 mM) et 10,95 mL de Tp(P) - EDTA 10 mM.

Aux 10 μL de blanc, de standard ou d'échantillon initialement présents dans chaque puits de microplaque sont alors ajoutés 100 μL de MIX. Le mélange réactionnel est alors incubé quelques minutes dans le lecteur microplaque, puis 20 μL d'une solution de glutathion réductase (8,5 U/mL dans Tp(P) - EDTA 10 mM) sont alors rapidement ajoutés. Une rapide agitation précède ensuite la lecture en mode cinétique de la microplaque (acquisition faite sur 5 min à 405 nm).

Le traitement des résultats est ensuite réalisé par le logiciel SoftMax Pro 4.8 (Molecular Devices), qui détermine la quantité de glutathion total présent dans chacun des échantillons. Cette quantité est ensuite normalisée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon et ainsi exprimée en $\mu\text{mole/g}$ de protéines totales.

5.3 - Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

5.3.1 - Principe du dosage

La technique de dosage retenue dans le cadre de ce travail est basée sur celle décrite par [Paglia et Valentine en 1967](#). L'activité de la GPx est dosée grâce au couplage d'une réaction de régénération du GSH dans laquelle le cofacteur NADPH intervient comme donneur d'hydrogène. En rapportant la vitesse de disparition du NADPH à 340 nm à la concentration de standards de GPx

présents dans le mélange réactionnel, il est alors possible de doser l'activité GPx présente dans des échantillons biologiques.

5.3.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de glutathion peroxydase. Cette gamme, préparée dans du Tp(P) additionné de BSA (5 g/L), comprend 6 points : 0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 et 2 U/mL de GPx.

Une normalisation de la concentration protéique des échantillons à 0,6 g/L est ensuite nécessaire. Cette normalisation s'effectue par dilution dans du Tp(P) à partir des résultats obtenus par le test de Bradford.

La réalisation du dosage nécessite également la préparation d'un réactif (MIX) dont la composition est la suivante : 500 μ L d'une solution de GSH (30 mM dans Tp(P)), 500 μ L d'une solution de NADPH (3,6 mM dans Tp(P)), 500 μ L d'une solution de glutathion réductase (30 U/mL dans Tp(P)) et 7 mL de Tp(P).

Dans chacun des puits d'une microplaque on dépose 15 μ L de blanc, de standard ou d'échantillon dilué (ces dépôts se font en triplicat), auxquels on ajoute 85 μ L de MIX. Le mélange réactionnel ainsi formé est incubé pendant une trentaine de secondes dans le lecteur, puis 50 μ L d'hydroperoxyde de cumène (552 μ M) sont rapidement distribués dans chacun des puits. L'absorbance à 340 nm est alors lue pendant 5 min après une brève agitation de la plaque.

Le traitement des résultats est ensuite réalisé par le logiciel SoftMax Pro 4.8 (Molecular Devices), qui détermine la quantité de GPx présente dans chacun des échantillons. Cette quantité est ensuite exprimée en U/mg de protéines totales.

5.4 - Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

5.4.1 - Principe du dosage

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la superoxyde dismutase (Paoletti et al., 1986), la diminution du taux d'oxydation du NADH étant fonction de la concentration en enzyme.

Ainsi, en l'absence de SOD, on assiste à une auto-oxydation du β -mercaptoéthanol en présence d'EDTA/ MnCl_2 qui va générer des anions superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) dans le milieu réactionnel et ainsi provoquer l'oxydation du NADH pour donner du NAD^+ (et donc une diminution de l'absorbance à 340 nm).

En présence de SOD, il y a compétition des réactions de génération (β -ME + EDTA/ MnCl_2) et de dismutation (SOD) des anions superoxyde. Ceci tend à diminuer la quantité d'anions superoxyde dans le milieu, provoquant ainsi l'inhibition de l'oxydation du NADH (donc une diminution moins importante de l'absorbance). On estime alors que 50 % d'inhibition correspond à une unité d'enzyme.

5.4.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de SOD. Cette gamme, préparée dans du Tp(P), comprend 6 points : 0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 et 2 U/mL de SOD.

Une normalisation de la concentration protéique des échantillons à 0,15 g/L est nécessaire. Cette normalisation s'effectue par dilution dans du Tp(P) à partir des résultats obtenus par le test de Bradford.

La réalisation du dosage nécessite également la préparation d'un réactif (MIX) dont la composition est la suivante : 800 μL d'une solution de β -NADH (7,5 mM), 500 μL d'un mélange volume à volume d'EDTA (200 mM) et de MnCl_2 (100 mM) et 16 mL de Tp(P).

Dans chacun des puits d'une microplaque on dépose 20 μL de standard ou d'échantillon dilué (ces dépôts se font en duplicat), auxquels on ajoute alors 173 μL de MIX. Vingt microlitres de β -mercaptoéthanol (10 mM) sont ensuite rapidement ajoutés dans chacun des puits. Après 20 min d'incubation à température ambiante, on mesure l'absorbance de chacun des puits à 340 nm pendant 5 min.

Le traitement des résultats est ensuite effectué manuellement. Dans un premier temps, il s'agit de déterminer le pourcentage d'oxydation du NADH pour chacun des points de la gamme de SOD en fonction du V_{max} auquel il est associé. Pour cela, on considère que le standard à 0 U/mL correspond à 100% d'oxydation. A partir de ces résultats, on trace la droite « Pourcentage d'oxydation = f(log(activité SOD)) » et on en détermine l'équation. En utilisant cette équation, on

cherche alors le $\log(\text{activité SOD})$ pour lequel le pourcentage d'oxydation est de 50 % (qui correspond à 1 U/mL de SOD). En déduire l'activité de SOD associée. Le résultat obtenu permet alors de corriger cette valeur qui correspond en fait à 1 U/mL de SOD. Pour les échantillons, on calcule le pourcentage d'oxydation du NADH de chacun des échantillons en fonction du V_{\max} auquel il est associé (règle de 3 à partir du 100% de la gamme). On injecte ce pourcentage dans l'équation de la droite d'étalonnage pour obtenir le $\log(\text{activité SOD})$ que l'on transforme ensuite pour déterminer l'activité SOD correspondante. Une règle de 3 avec la relation donnant 1 U/mL de SOD donne l'activité de la SOD de l'échantillon. Cette activité est ensuite exprimée en U/mg de protéines totales.

5.5 - Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

5.5.1 - Principe du dosage

La catalase est dosée dans la fraction S9 hépatique par la méthode spectrophotométrique décrite par [Babo et Vasseur en 1992](#) (d'après un article original de [Beers et Size de 1952](#)). Il s'agit de mesurer la chute d'absorbance liée à la disparition du peroxyde d'hydrogène, le substrat de l'enzyme. Les résultats sont exprimés en μmoles de H_2O_2 consommées par minute, ce qui correspond à 1 U de catalase.

5.5.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de CAT. Cette gamme, préparée dans du Tp(P), comprend 6 points : 0 - 0,0125 - 0,025 - 0,05 et 0,1 U/mL de CAT.

Une normalisation de la concentration protéique des échantillons à 0,05 g/L est nécessaire. Cette normalisation s'effectue par dilution dans du Tp(P) à partir des résultats obtenus par le test de Bradford.

Dans chacun des puits d'une microplaque on dépose donc 100 μL de standard ou d'échantillon dilué (ces dépôts se font en duplicat), auxquels on ajoute 100 μL d'une solution d' H_2O_2 (28 mM dans Tp(P)). La lecture de l'absorbance est alors immédiatement démarrée. Cette lecture se fait à 240 nm (UV) pendant 5 min.

Le traitement des résultats obtenus est réalisé par le biais du logiciel SoftMax Pro. L'activité catalase est ensuite exprimée en U/mg de protéines totales.

6 - BIOMARQUEUR DE NEUROTOXICITE

Comme précédemment décrit dans le paragraphe 4.2.1, le dosage du biomarqueur de neurotoxicité est réalisé sur la fraction S9 du cerveau des organismes. Le volume total disponible pour chacune des fractions ainsi obtenues est d'environ 150 μ L. Le développement et l'optimisation de ce dosage ont été réalisés dans le cadre du présent travail de recherche, avec l'aide technique de Brigitte Ksas.

6.1 - Dosage de la charge protéique

Ce dosage permet, comme précédemment, de normaliser les résultats obtenus à l'issue du dosage enzymatique en fonction d'une quantité totale de protéines présente dans les échantillons.

6.1.1 - Principe du dosage

Cf. paragraphe 5.1.1

6.1.2 - Protocole

Le protocole suivi est le même que celui employé pour le dosage des S9 hépatiques (*cf.* paragraphe 5.1.2). La seule différence réside dans les dilutions préalables des échantillons de façon à ce que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Ainsi, pour les fractions S9 cérébrales, trois dilutions sont réalisées par défaut : 1/5, 1/10 et 1/20 (les S9 cérébraux étant généralement moins concentrés que les S9 hépatiques).

6.2 - Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

6.2.1 - Principe du dosage

L'acétylcholinestérase catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Elle est spécifique des esters de l'acide acétique et si, physiologiquement, son substrat est l'acétylcholine, elle catalyse également l'hydrolyse de la butyrylcholine, de la butyrylthiocholine ou de l'acétylthiocholine (ATCh). Dans ce dernier cas, les produits de la réaction d'hydrolyse sont l'acide acétique et la thiocholine. La méthode spectrophotométrique [d'Ellman \(1961\)](#) utilise cette propriété de l'AChE en faisant interagir les groupements thiols ainsi rendus disponibles dans le milieu avec le DTNB pour donner du TNB (coloré en jaune).

6.2.2 - Protocole

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon d'AChE standard. Cette gamme, préparée dans du Tp(P) comprend 5 points : 0 - 0,625 - 1,25 - 2,5 et 4 U/mL d'AChE.

Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Ainsi, pour les fractions S9 cérébrales, deux dilutions sont réalisées par défaut sur les échantillons : 1/2 et 1/4.

La réalisation du dosage nécessite également la préparation d'un réactif (MIX) dont la composition est la suivante : 1 mL d'une solution stock de DTNB (10 mM dans Tp(P)), 27 mL de Tp(P).

On dépose alors en 10 μ L de blanc, de standard, ou d'échantillon dilué ou non dans chacun des puits de la microplaque. Ces dépôts sont à réaliser en triplicat. Deux cent quatre vingt microlitres de MIX sont ensuite ajoutés avant de procéder à une agitation de quelques secondes de la microplaque ainsi préparée puis à une incubation de 10 minutes à température ambiante.

A l'issue de cette incubation, 10 μ L d'une solution d'acétylthiocholine (30 mM dans Tp(P)) sont ensuite déposés dans chacun des puits. La microplaque est ensuite brièvement agitée puis introduite dans le lecteur. L'absorbance de chacun des puits est alors lue à 405 nm durant 4 min.

Le traitement des résultats est réalisé par le biais du logiciel SoftMax Pro 4.8 qui détermine l'activité acétylcholinestérase de chacun des échantillons en tenant compte du facteur de dilution initial. Cette activité est ensuite exprimée en U/g de protéines totales.

7 - BIOMARQUEURS DE GENOTOXICITE

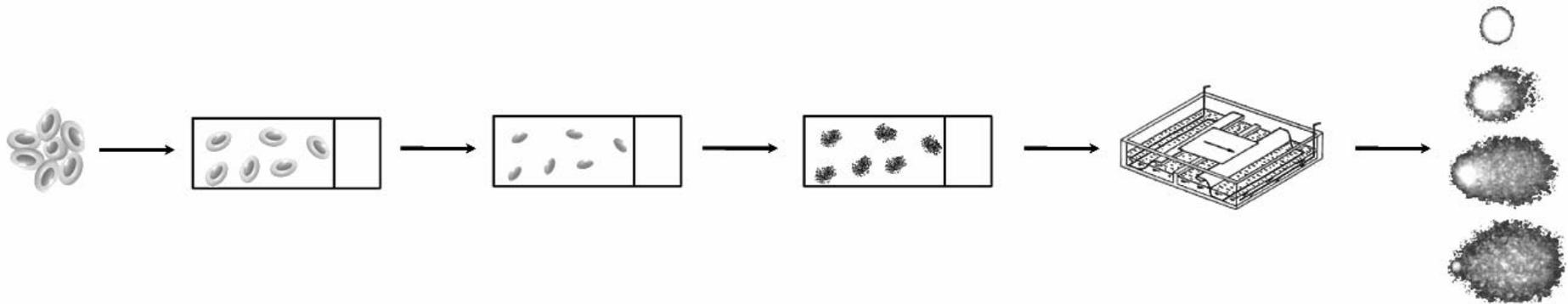
L'apparition de cassures simple et double brins, de réparations incomplètes ainsi que la formation de sites abasiques au sein des molécules d'ADN ont été choisies dans ce travail de thèse comme marqueur de toxicité génétique. Cette mesure de l'altération de l'intégrité de l'ADN nucléaire a été effectuée par deux techniques analytiques bien distinctes : la version alcaline de l'essai des comètes et une technique de cytométrie en flux mise au point dans le cadre de mon stage de recherche de DEA ([Barillet, 2003](#)).

Comme précédemment décrit dans le paragraphe 4.2.2, ces tests ont été réalisés à partir de différents échantillons biologiques : prélèvements sanguins (4.2.2.1) mais aussi cellules hépatiques et spermatiques isolées (4.2.2.2).

7.1 - L'essai des comètes en conditions alcalines

7.1.1 - Principe de l'essai

Le test des comètes (ou "*single cell gel electrophoresis assay*") est une technique d'électrophorèse sur gel d'agarose mise au point par [Singh et al. \(1988\)](#) permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées ([figure 18](#)). L'analyse se fait sur des cellules incluses dans un gel d'agarose, auxquelles on applique un traitement aboutissant à une digestion de l'intégrité du matériel extranucléaire (membrane nucléaire comprise) sous l'action de détergents et de sels à forte concentration. L'ADN se trouve alors réduit à une structure "pseudo-nucléaire" résiduelle : le nucléoïde ([McKelvey-Martin et al., 1993](#)). Suite à cette lyse, l'ADN est déroulé par rupture des liaisons hydrogènes à $\text{pH} > 13$. L'ADN ainsi préparé est ensuite placé dans un champ électrophorétique permettant la migration différentielle des fragments (les fragments, chargés négativement, cheminant donc vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à leur longueur). Les molécules d'ADN intactes vont quant à elles peu migrer sous l'effet du champ électrique (du fait de leur haut poids moléculaire), et vont donc décrire une sphère compacte.



Echantillon de départ : Suspension cellulaire (érythrocytes, hépatocytes ou cellules spermatiques)

Etape 1 : Inclusion des cellules au sein de différentes couches de gels d'agarose successivement déposés et laissés polymérisés sur une lame de microscopie.

Etape 2 : Lyse des cellules (1 h à l'obscurité).

Etape 3 : Déroulement des molécules d'ADN (40 min toujours à l'obscurité).

Etape 4 : Electrophorèse (20 V (soit 0,7 V/cm); 300 mA, 24 min) à l'obscurité.

Etape 5 : Neutralisation puis marquage de l'ADN par du bromure d'éthidium.

Figure 18. Protocole général de l'essai des comètes en conditions alcalines.

Un ADN endommagé va, quant à lui, présenter des fragments de taille hétérogène et ainsi voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère (du fait d'une vitesse de migration plus importante), formant ainsi un "halo" d'ADN s'étirant en direction de l'anode. Les figures obtenues sont alors tout à fait comparables à des comètes.

Il existe différentes versions de l'essai, avec des protocoles décrivant des conditions de déroulement et d'électrophorèse alcalines ou neutres, suivant le type de dommage que l'on cherche à mettre en évidence (Olive, 2002). En conditions alcalines, les ruptures de chaîne simple et double brins ainsi que les sites alcali-labiles (attestant de la modification chimique de bases azotées) peuvent être révélés. Ceci est expliqué par le fait que, comme précisé précédemment, on observe un désappariement des bases de l'ADN en milieu alcalin par rupture des liaisons hydrogènes. Les brins vont alors migrer indépendamment, permettant ainsi de faire apparaître les lésions mono- ou bicaténares. En revanche, la version neutre de l'essai n'entraîne pas cette dissociation des deux brins qui vont alors migrer conjointement. Seules les cassures double brins, évènements généralement beaucoup plus rares que les cassures simple brin, seront alors mises en évidence.

Quel que soit le protocole utilisé, alcalin ou non, le marquage de l'ADN après migration se fait généralement au moyen d'un fluorochrome de type intercalant de base tel que le bromure d'éthidium ou l'iodure de propidium (Rojas et al., 1999). Le bromure d'éthidium (EtBr), souvent utilisé, présente une structure aromatique plane qui lui permet de s'intercaler entre les paires de bases. La formation du complexe ADN-EtBr s'accompagne d'une relaxation de la double hélice, et d'une émission de lumière (fluorescence) dans le rouge-orange lorsque celui-ci est excité. Les versions alcalines de l'essai, conduisant à une migration monocaténaire des molécules d'ADN nécessitent donc une étape de neutralisation après électrophorèse, permettant un réappariement partiel des brins et ainsi d'assurer l'intercalation du fluorochrome (Tice et al., 2000).

Différentes méthodes de quantification des dommages visualisés dans cet essai ont été développées. Tout d'abord, un système d'estimation visuelle des dommages a été utilisé, s'appuyant sur une discrimination en différentes classes suivant l'apparence des comètes (et donc suivant le niveau d'endommagement). Un score étant attribué à chaque classe, une estimation relative du dommage peut ensuite être réalisée. Des mesures relatives à la longueur de la queue de

la comète par rapport au rayon de la tête peuvent également fournir des données intéressantes pour rendre compte du niveau de dommage. Du fait de l'intérêt grandissant pour cette technique, divers logiciels informatiques associés à des systèmes vidéo couplés aux microscopes à épifluorescence, ont permis l'émergence de nouveaux outils, améliorant la résolution de l'essai (figure 19). Il est ainsi possible de s'intéresser tout particulièrement à la translation de la fluorescence de la tête de la comète vers sa queue. Le "tail moment", produit du pourcentage d'ADN dans la queue ("tail DNA") et de sa longueur ("tail length"), est par exemple un paramètre très intéressant pour la quantification du niveau de dommage (McKelvey-Martin et al., 1993).

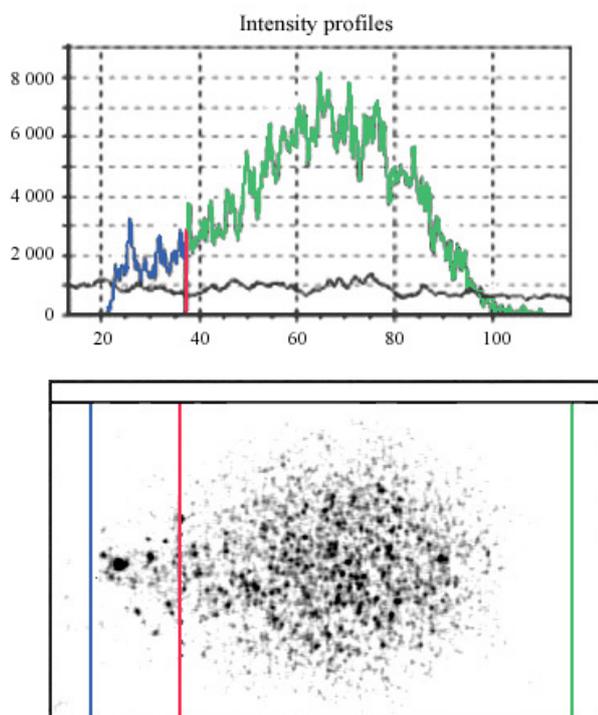


Figure 19. Analyse d'une comète par un système informatique (Komet 4.0) couplé à une caméra digitale installée sur un microscope à épifluorescence. *Cadre du bas* : La comète est positionnée dans le cadre de lecture (représenté en noir), le logiciel définit alors trois repères (en bleu, rouge et vert) délimitant les différentes parties de la comète (tête et queue). *Cadre du haut* : Profil d'intensité de fluorescence généré à partir de la figure précédente. En abscisse : longueur (en μm) de la comète et de ses différentes parties. En ordonnée : intensité de

fluorescence du signal, tracé bleu = tête de la comète, tracé vert = queue.

7.1.2 - Protocole

Cet essai a été réalisé sur trois types cellulaires : des érythrocytes d'une part, et les cellules spermatiques et hépatiques obtenues à l'issue d'un isolement cellulaire d'autre part (cf. paragraphe 4.2.2.2). Dans le cas des cellules sanguines, l'essai a été pratiqué à partir de prélèvements congelés ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant plusieurs semaines). Dans le cas des cellules obtenues après isolement cellulaire, aucune congélation n'a pu être possible du fait de leur fragilisation par le protocole de dissociation tissulaire. Leur analyse par l'essai des comètes a donc dû être réalisée

extemporanément après isolement. Quel que soit le modèle cellulaire concerné, la densité cellulaire des suspensions a été normalisée de façon à approcher les 10^6 cellules/mL. Ainsi, les suspensions érythrocytaires congelées ont dû subir une dilution d'un facteur 10 dans du PBS après décongélation lente sur bain de glace. Les suspensions hépatiques et testiculaires ont, quant à elles, été normalisées à l'issue du protocole d'isolement (*cf.* paragraphe 4.2.2.2). Le protocole auquel les cellules ont alors été soumises est le suivant.

Quatre vingt dix microlitres d'un mélange à parts égales de suspension cellulaire et d'agarose à bas point de fusion (solution à 1 % préparée dans du PBS) sont déposés sur une lame microscopique (pré-enduite d'une solution à 0,8 % d'agarose à point de fusion normal). Une lamelle est ensuite posée sur la préparation afin de l'étaler de manière homogène sur la surface de la lame. Le tout est alors placé sur un plateau métallique flottant sur un bain de glace afin d'accélérer la polymérisation du gel. Après avoir retiré la lamelle, 90 μ L d'agarose à bas point de fusion (solution à 0,5 % dans du PBS) sont redéposés, afin d'assurer une protection du mélange cellules-agarose. Une nouvelle lamelle est ajoutée avant de réitérer le protocole de polymérisation du gel d'agarose. Une fois la lamelle retirée, la lame est prête.

Les lames sont ensuite placées dans une cuve et recouvertes d'une solution de lyse préparée extemporanément à partir d'une solution mère (NaCl 2,5 M, EDTA disodique 100 mM, Tris 10 mM, ajustée à pH 10 avec du NaOH) à laquelle on ajoute un détergent, le Triton X100 (1 % final), et du DMSO (10 % finaux). La lyse est réalisée pendant 1h et à l'obscurité, tout comme la suite du protocole (l'ADN ainsi mis à nu étant hautement photosensible).

Après la lyse, les lames sont transférées dans la cuve à électrophorèse et sont immergées durant 40 min dans un tampon de déroulement (NaOH 0,3 M, EDTA 1 mM). A l'issue du déroulement, le générateur basse tension (20 V) est activé, délivrant ainsi le courant nécessaire à l'établissement du champ électrophorétique (0,7 à 1 V/cm, 300 mA). La durée de cette électrophorèse est fixée à 24 min.

Afin d'obtenir une structure bicaténaire des fragments d'ADN au sein du gel après migration, un tampon de neutralisation (Tris 0,4 M ajusté à pH 7,5 avec de l'HCl concentré) est versé délicatement sur les lames, à deux reprises, à 5 min d'intervalle.

Le dépôt de 50 μL d'une solution de bromure d'éthidium (20 ng/mL) permet ensuite le marquage des lames en vue de leur analyse sous un microscope à épifluorescence (utilisant une lampe à vapeur de mercure).

Une caméra CDD couplée à un système informatique doté d'un logiciel d'acquisition (Komet 4.0, Kinetic Imaging Ltd) permet ensuite de procéder à l'acquisition des résultats ("*tail length*", "*tail DNA*" et "*tail moment*" notamment).

7.2 - Estimation des dommages oxydatifs

7.2.1 - Principe de la mesure

Comme évoqué dans le chapitre relatif à la présentation ainsi qu'à la justification des biomarqueurs choisis pour ce travail, une version modifiée de l'essai des comètes a été utilisée de manière à quantifier la part des dommages oxydatifs survenus au niveau de l'ADN. Cette méthode analytique repose sur le détournement d'une propriété de certaines enzymes impliquées dans les mécanismes de réparation dont dispose les cellules pour faire face à l'endommagement de son ADN. Afin d'explicitier cette méthode, il semble donc important de rappeler quels sont les mécanismes de réparation dont dispose la cellule pour contrecarrer la survenue d'altérations au sein de son ADN.

Le système de réparation des bases oxydées, alkylées, fragmentées et des sites abasiques repose sur un mécanisme dit de "réparation par excision de bases" (REB), faisant intervenir de nombreuses enzymes. La réparation s'effectue en quatre étapes. La première correspond à l'élimination de la base modifiée par coupure de la liaison N-glycosidique grâce à des enzymes spécifiques (les ADN N-glycosylases), ce qui conduit à la formation d'un site abasique. Une fois le site abasique formé, il y a coupure de la liaison phosphodiester en 3' du site abasique, et éventuellement en 5' par l'action d'une AP endonucléase. Les dernières étapes de la réparation impliquent une ADN polymérase et une ligase.

Les glycosylases peuvent être classées en plusieurs catégories selon le type d'altération qu'elles reconnaissent. Parmi celles-ci, on compte notamment la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg, spécifique de la reconnaissance des purines modifiées) et l'endonucléase III (endo III, spécifique des pyrimidines modifiées).

C'est en se basant sur ces capacités de détection de bases modifiées dont sont dotés certaines enzymes qu'une version modifiée de l'essai des comètes a été développée. En effet, au cours de l'essai des comètes, une incubation de l'ADN avec ces enzymes permet d'induire la formation de cassures (par coupure de la liaison N-glycosidique) au niveau des brins porteurs de bases altérées. Ces cassures néoformées viennent alors de surajouter aux dommages déjà présents. L'analyse différentielle des lames ayant subies l'incubation et de celles ne l'ayant pas subie permet ensuite d'évaluer la présence de dommages oxydatifs qui ne sont habituellement pas quantifiables dans la version "normale" de l'essai des comètes.

7.2.2 - Protocole

Le protocole de l'essai des comètes est, pour ses premières étapes, identique à celui précédemment décrit à la seule différence du fait que chaque échantillon est préparé en triplicat (trois lames étant alors préparées par échantillon). A l'issue de l'étape de lyse, les lames sont rincées à deux reprises à l'aide d'une solution tampon (HEPES 40 mM, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM et BSA 0,2 mg/mL ajustée à pH 8 avec du KOH concentré). A la suite de cette étape, chacune des lames d'un même échantillon sont traitées différemment. Sur la première des trois lames, 75 µL du tampon précédemment évoqué sont déposés. Aucune enzyme n'est alors mise au contact du matériel génétique présent sur la lame qui fera donc office de lame "contrôle". Sur la deuxième lame, 75 µL de tampon additionné de l'enzyme Fpg (1,5 µg/mL) sont déposés. Sur la dernière, le même volume de tampon additionné de l'enzyme endo III (1 µg/mL) est déposé. Une fois ces trois solutions ajoutées, une lamelle est déposée sur chacune des lames. Ces dernières sont alors placées dans une enceinte hermétiquement protégée de la lumière, dont le taux d'humidité est gardé constant et placée dans un incubateur maintenu à 37 °C. L'incubation dure alors 30 min à l'issue de laquelle les lamelles sont ôtées et les lames sont transférées dans la cuve d'électrophorèse avant d'être immergées dans le tampon de déroulement. L'essai des comètes est alors repris comme présenté dans le paragraphe 7.1.2.

L'analyse des résultats obtenus consiste ensuite en l'examen différentiel des lames traitées ou non par les glycosylases. La présence de dommages oxydatifs au niveau de bases pyrimidiques est ainsi révélée par un niveau d'endommagement plus important dans les cellules exposées à l'endo III par rapport à celles exposées au tampon seul. De même, les dommages oxydatifs présentés par les

bases puriques sont mis en évidence lors d'une augmentation du niveau de fragmentation de l'ADN présent dans les cellules exposées à la Fpg par rapport à celles exposées au tampon seul.

7.3 - La cytométrie en flux

7.3.1 - Principe de la technique

La cytométrie en flux est une technique analytique permettant la caractérisation individuelle de particules en suspension (cellules, particules subcellulaires telles que les chromosomes, bactéries, etc.). Cette caractérisation se fait à partir de paramètres optiques, diffusion et fluorescence, résultant de l'interaction de ces particules avec une lumière monochromatique.

Les composantes mesurées en cytométrie en flux sont de deux natures: lumière diffusée et fluorescence. La première rend compte de l'aspect des cellules (taille, structure..). La seconde révèle exclusivement la présence de fluorochromes inclus dans les protocoles nécessitant le marquage de structures d'intérêt (l'ADN par exemple).

La lumière diffusée informe sur la morphologie des cellules par le biais de deux paramètres optiques : la lumière diffractée et la lumière réfléchie. La première, collectée dans l'axe du faisceau source, appelée FSC (*forward scatter channel*), présente en effet la particularité d'être proportionnelle à la taille de la cellule. La seconde, quant à elle, est recueillie à 90° du faisceau source, appelée SSC (*side scatter channel*) et reflète les caractéristiques structurales des cellules.

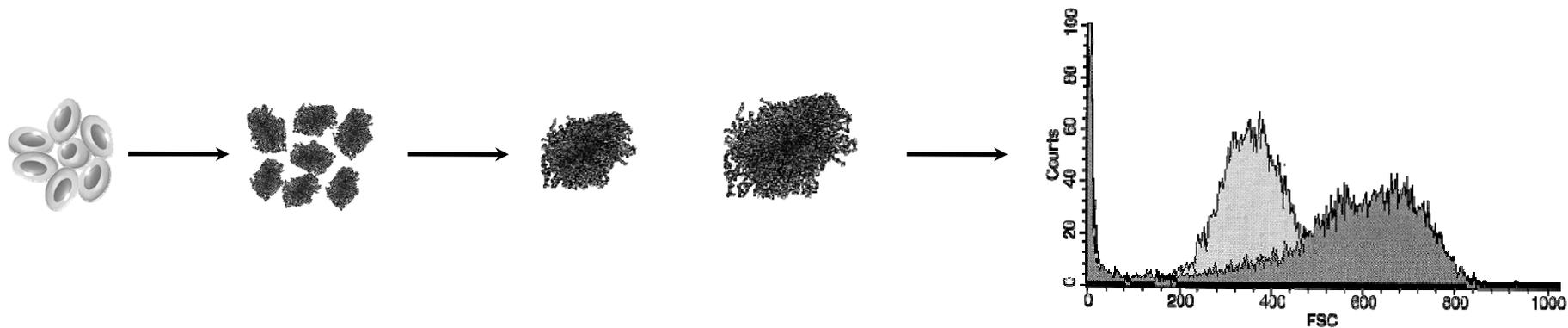
La fluorescence (FLH) est un phénomène correspondant à l'émission de photons sous l'action d'une source lumineuse excitatrice appropriée. Cette propriété va être exploitée en cytométrie par l'utilisation de fluorochromes, pour le marquage de structures spécifiques.

La collecte de ces différents paramètres va être rendue possible par la combinaison de principes de fluidique et d'optique. La partie fluidique assure le passage individualisé des cellules ainsi que leur alignement. Ainsi, deux flux laminaires coaxiaux se forment par différence de pression entre deux fluides : le liquide de gaine (qui tient alors le rôle de "capillaire liquide" de part sa surpression relative) et la suspension cellulaire (sous forme d'une veine liquide circulant dans le "capillaire"). Fluidique et optique se combinent au niveau de la chambre d'analyse où les

cellules vont rencontrer le faisceau lumineux. La partie optique se compose d'une source excitatrice, un laser, d'un système permettant la collecte de la lumière déviée par diffusion (canaux FSC et SSC) ou réémission par fluorescence (canal FLH). L'analyse et la représentation graphique des différents paramètres mesurés sont ensuite assurées informatiquement.

L'estimation de l'état de fragmentation du matériel génétique par le biais de la cytométrie repose sur l'évaluation de la taille de nucléoïdes (figure 20). Un nucléoïde est une structure pseudo nucléaire résiduelle obtenue après élimination de l'environnement de l'ADN nucléaire assurant sa protection : le matériel extranucléaire, la membrane nucléaire et les histones. Un nucléoïde se résume donc à l'ADN nucléaire "nu".

Le fait de travailler sur des nucléoïdes isolés rapproche de beaucoup cette analyse en cytométrie en flux de l'essai des comètes. Ainsi, ce que l'on peut interpréter en terme de potentiel de migration dans l'essai des comètes va ici être traduit sous la forme d'une variation de taille du nucléoïde. En effet, plusieurs publications rapportent le fait que l'ADN, soustrait aux contraintes physiques imposées par la matrice nucléaire, adopte une conformation relâchée du fait de l'abaissement de la tension de surenroulement notamment due à sa complexation avec les histones. De plus, la présence de ruptures au sein des molécules d'ADN va permettre un relâchement du nucléoïde d'autant plus important que la fréquence de ces cassures sera élevée. Ainsi, une augmentation de la taille relative des nucléoïdes sera analysée comme étant la conséquence directe d'un état de fragmentation significatif du matériel génétique de l'échantillon considéré.



Echantillon de départ : Suspension cellulaire (érythrocytes)

Etape 1 : Lyse des cellules (15 min à l'obscurité) permettant l'obtention de nucléoïdes en suspension ainsi que leur relaxation (proportionnelle au niveau de fragmentation de l'ADN). Cette étape assure également le marquage de l'ADN.

Etape 2 : Suivi du diamètre des nucléoïdes par analyse cytométrique.

Figure 20. Principe de l'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux.

7.3.2 - Protocole

L'analyse en cytométrie en flux a été réalisée au sein de l'UMR 754 (ENVL - INRA), avec l'aide de François Guiguen, du laboratoire "Rétrovirus et pathologie comparée" de Lyon. Ainsi, pour des raisons logistiques, elle n'a pu concerner que le modèle cellulaire dont la congélation était possible : le modèle érythrocytaire.

Le protocole expérimental reposant sur ce principe d'analyse est celui décrit par Barillet (2003). Ainsi, la préparation des nucléoïdes consiste en une lyse des cellules au moyen d'une solution caractérisée par une forte salinité (NaCl 1 M), un pH voisin d'une valeur compatible avec le maintien de l'intégrité des structures étudiées (Tris 10 mM ajusté à pH 8 par ajout de NaOH), la présence d'un détergent (Triton X-100 0,2 %) ainsi que d'EDTA (10 mM), chélateur des cations divalents susceptibles d'interagir en tant que cofacteurs avec des enzymes de dégradation de l'ADN. De plus, afin de discriminer les nucléoïdes parmi l'ensemble des événements détectés par le cytomètre (qui, pour la plus grande part, relèvent d'un bruit de fond attribuable à des débris), la solution de lyse contient également un fluorochrome : l'iodure de propidium (40 mg/L). Deux cents microlitres de cette solution de lyse sont ajoutés à 100 µL de chacun des échantillons sanguins. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont alors conservées à l'obscurité pendant 15 min dans un bain de glace avant d'être injectées dans le cytomètre.

L'analyse des échantillons ainsi préparés nécessite tout d'abord un paramétrage du système de façon à ce que les nucléoïdes soient clairement identifiables. Pour ce faire, un premier échantillon est injecté dans le cytomètre afin de procéder à différents réglages. En premier lieu, un seuil d'acquisition ("*acquisition threshold*") est fixé afin d'éliminer les signaux attribuables à des débris cellulaires. Ce seuil, fixé à 45 (unité arbitraire), est imposé au canal de fluorescence FLH-2. Ensuite, deux aires graphiques sont mises en place sur l'écran de contrôle. La première aire représente, sous forme un nuage de points, les données issues du canal FSC en fonction de celles issues du canal SSC. Elle permet ainsi d'obtenir une image globale des événements détectés en fonction de leur relation "taille-granulométrie". La seconde aire graphique mise en place représente quant à elle la relation "taille-fluorescence" par le biais d'un dot plot FSC-FLH2. A l'aide de ces deux représentations, une fenêtre d'acquisition (sensée ne renfermer que les événements

dont on soit sûr qu'il s'agisse de nucléoïdes) est délimitée. L'analyse ne prend alors compte que des évènements compris dans cette fenêtre (**figure 21**).

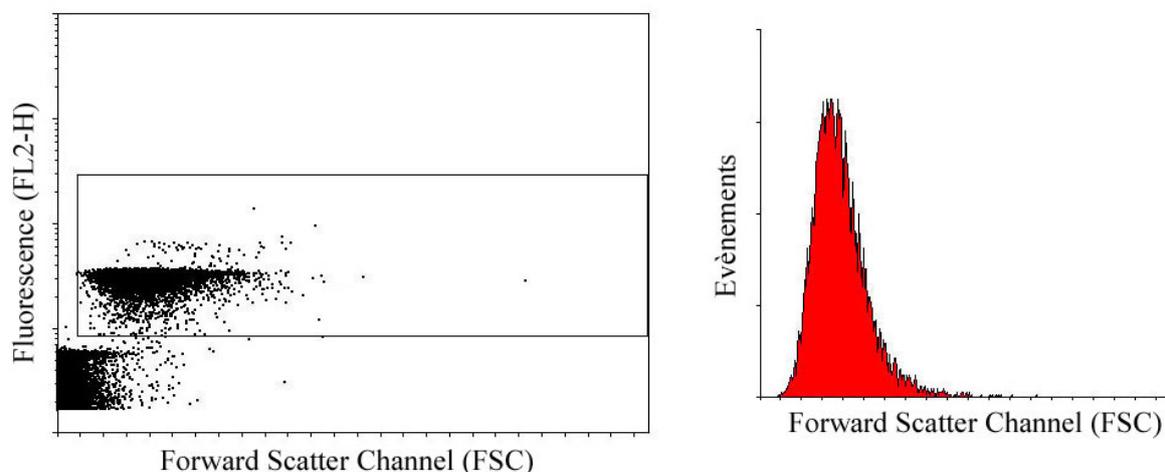


Figure 21. Aires graphiques permettant la visualisation des évènements détectés lors du passage d'une suspension cellulaire en cytométrie de flux. *A gauche* : Aire graphique représentant la relation "taille-fluorescence" par le biais d'un dot plot FSC (linéaire) - FL2H (logarithmique). Deux ensembles se dégagent. Le premier est constitué d'évènements de petite taille (de faible FSC) et faiblement fluorescents (de faible FL2-H). Il s'agit de débris présents dans la suspension. Le second est constitué d'évènements de taille plus importante et plus fortement marqués. Ce second ensemble représente donc les nucléoïdes. Une fenêtre d'acquisition (rectangle noir) est donc délimitée de manière à n'analyser que les évènements compris dans cette aire. *A droite* : Fenêtre d'acquisition des résultats. L'histogramme représente le nombre d'évènements en fonction de leur taille. Le principe de l'analyse repose donc sur un décalage du pic vers des valeurs de FSC croissantes (et donc vers des tailles de nucléoïdes croissantes) pour des cellules ayant subi un endommagement de leur matériel génétique.

Pour chacun des échantillons, dix milles évènements sont lus dans la fenêtre d'acquisition préalablement définie. L'interprétation des résultats est ensuite faite sur la base d'un histogramme représentant la distribution des effectifs en fonction des informations issues du canal FSC (taille des nucléoïdes). Un décalage de cet histogramme correspondant à des tailles d'évènements plus importantes révèle ainsi l'apparition de cassures.

8 - OBSERVATIONS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

La préparation des échantillons tissulaires en vue de leur analyse par microscopie électronique à transmission est décrite dans le paragraphe 4.2.3.

8.1 - Principe de la technique

La microscopie électronique est une technique qui permet de visualiser des structures grâce à des appareils dont la source de rayonnement émet des électrons. L'utilisation de ces électrons (à l'instar des photons dans un microscope optique) permet de passer d'une résolution (distance minimale séparant deux points individualisables) d'environ 0,2 μm avec un microscope conventionnel à une résolution proche de 0,2 nm.

Ainsi, le faisceau d'électrons (dont l'énergie est de l'ordre d'une centaine de keV), va traverser l'échantillon et provoquer des excitations variées. Les principaux signaux générés sont alors les suivants : électrons primaires transmis ou diffusés élastiquement (sans perte d'énergie) ou inélastiquement (avec perte d'énergie), électrons rétrodiffusés, électrons secondaires, et lors des processus de désexcitation, électrons Auger, photons X et photons visibles.

Au contact de la préparation, les électrons incidents (provenant de la source) sont soit arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif éliminant les électrons déviés, la formation de l'image se fait à partir des électrons arrêtés et des électrons transmis. Les électrons arrêtés se traduisent en effet à l'observation par des zones sombres. Les électrons transmis correspondent quant à eux à des zones claires.

8.2 - Réalisation des observations

L'appareil utilisé lors de ce travail est de type Tecnai 12 G² Biotwin (FEI, Eindhoven, Pays-Bas) ayant une tension d'accélération maximale de 120 kV, et un grossissement possible de 390 à 300 000 fois.

L'ensemble du travail d'observation et d'acquisition d'images a été réalisée par Magali Floriani, ingénieur de recherche.

9 - REPRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS

A l'issue des analyses biochimiques (évolution des marqueurs de stress oxydant, de génotoxicité et de neurotoxicité), les résultats ont été exprimés de façon relative au témoin du même jour par le biais d'un pourcentage de différence. Ce pourcentage est obtenu par le calcul suivant :

$$\text{pourcentage de différence par rapport au témoin} = \frac{m_e t_i - m_c t_i}{m_c t_i} \times 100 .$$

Dans cette équation, les termes "m_e" et "m_c" font référence aux valeurs moyennes des variables biologiques considérées chez les individus exposés (désignés par la lettre e) et les individus contrôle (désignés par la lettre c) respectivement. Les indices *t* font quant à eux référence à la durée d'exposition considérée (ici il s'agit du même temps de prélèvement pour toutes les moyennes, le temps *i*). Ce pourcentage n'est donc calculé que pour les conditions expérimentales autres que la condition témoin (la valeur moyenne du témoin étant donc égale à 0).

Néanmoins, quand l'évolution des paramètres biologiques du groupe témoin ne permet pas une telle représentation des résultats (variations trop importantes du témoin en fonction du temps), un autre type de représentation est adopté. Les résultats sont alors toujours exprimés en pourcentage de différence, mais cette fois-ci par rapport à la valeur du paramètre au *t*₀ de l'expérimentation (évolution au cours du temps). Ce pourcentage est alors obtenu par le calcul suivant :

$$\text{pourcentage de différence par rapport au } t_0 = \frac{m_x t_i - m_x t_0}{m_x t_0} \times 100 .$$

Dans ces nouvelles équation, le terme "m_x" fait référence à la variable biologique considérée qu'il s'agisse d'une valeur obtenue chez des organismes témoins ou exposés. Cette fois-ci c'est donc le facteur temps qui change au sein du calcul, *t*_i faisant référence à un temps donné de l'expérimentation, différent du *t*₀. Ce pourcentage est donc calculé pour l'ensemble des conditions expérimentales investiguées, témoins compris.

10 - TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS

Les analyses statistiques ont été menées avec l'aide de Claire Della-Vedova et réalisés avec les logiciels R 2.3.1 (freeware développé par la R foundation for statistical computing) et Statistica 6 (StatSoft Inc., Tulsa, O.K. USA). Les tests de significativité de l'influence des différents traitements (durée d'exposition, composition et concentration de l'uranium) ont été réalisées par le biais d'analyses de variances classiques.

Une première étape de traitement des données a consisté en une ANOVA mono ou multifactorielle selon le jeu de données initial. A la suite de cette analyse, les hypothèses de normalité des résidus et d'homoscédasticité (homogénéité des résidus) de cette ANOVA ont été évaluées visuellement à l'aide de graphiques de type QQ plot pour la normalité et de graphiques reportant les résidus standardisés en fonction des valeurs ajustées pour l'homoscédasticité.

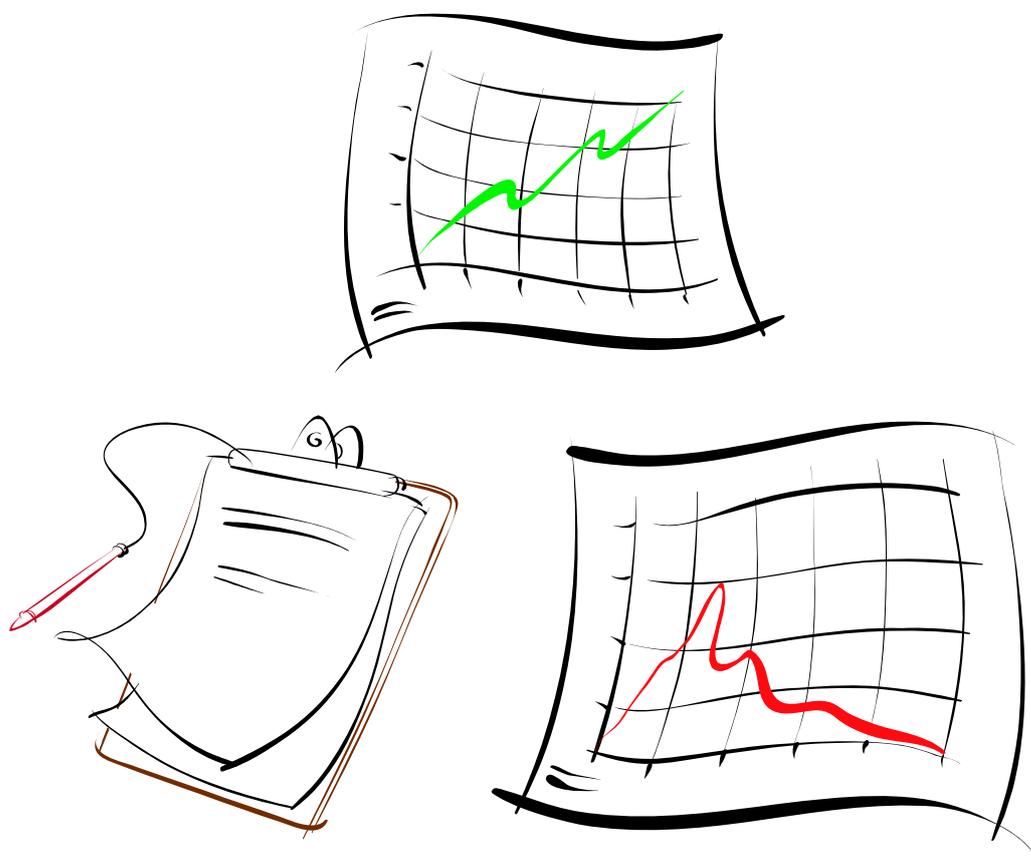
Dans le cas où les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité étaient vérifiées, les résultats de l'ANOVA ont été validés et, lorsque ceux-ci se sont avérés significatifs pour un risque α fixé à 5 % ($p \leq 0,05$), des tests *post-hoc* de comparaison de moyennes multiples ont été effectués selon la méthode de Tukey HSD. Lorsque des comparaisons multiples ne visant qu'à différencier les groupes exposés à leur témoin respectif ont été nécessaires, ces comparaisons ont été réalisées par le test T de Dunnett.

Dans le cas contraire, des transformations de type Box-Cox ont été tentées sur le jeu de données. Le nouveau jeu de données a ensuite fait l'objet d'une nouvelle ANOVA et de nouveaux tests de normalité et d'homoscédasticité des résidus. Dans le cas où ces tests ont été concluants, l'ANOVA a été validée et des comparaisons multiples ont pu être réalisées selon les méthodes de Tukey HSD ou de Dunnett lorsque le seuil de significativité des résultats de cette ANOVA ont été atteints.

Si, malgré la transformation des données, les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité sont restées non vérifiées, la suite du traitement statistique de ces données a été mené par le biais d'analyses non paramétriques. Des comparaisons de moyennes de plusieurs échantillons indépendants (analyses de variance de Kruskal-Wallis) ont alors été pratiquées. Lorsque ces tests se sont avérés significatifs pour un risque α fixé à 5 % ($p \leq 0,05$), des tests *post-hoc* de

comparaison de moyennes deux à deux (tests U de Mann-Whitney) ont été réalisés afin de mettre en évidence quelles étaient les conditions d'exposition entraînant des effets significatifs par rapport aux témoins ou aux autres conditions d'exposition. Afin de ne pas générer une dérive du risque α au cours de ces différentes comparaisons de Mann-Whitney, un ajustement des degrés de significativité (valeurs de p) significatives a été apporté par une correction de Bonferroni-Holm. De la même manière qu'avec le test T de Dunnett pour les jeux de données compatibles avec une analyse paramétrique, lorsque des comparaisons multiples ne visant qu'à différencier les groupes exposés à leur témoin respectif ont été nécessaires, ces comparaisons ont été réalisées par le test de Steel.

RESULTATS



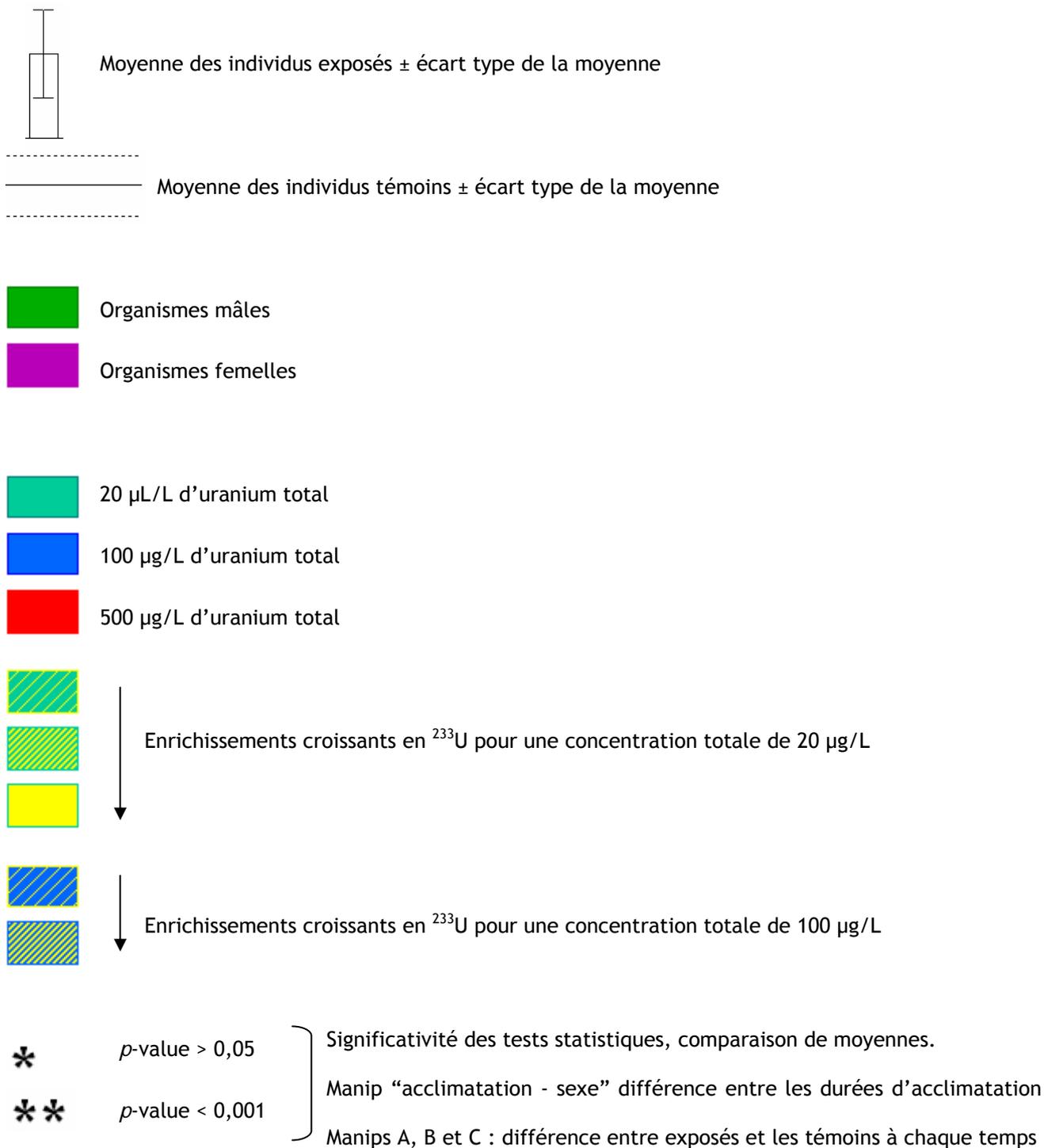


Figure 22. Conventions graphiques respectées dans ce manuscrit

RESULTATS

Dans ce chapitre, l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des différentes expérimentations menées est exposé. Afin d'en faciliter la lecture, un ensemble de conventions graphiques a été respecté tout au long de ce document. Ces conventions sont décrites dans la **figure 22**.

L'objectif fixé pour ce chapitre étant de présenter l'ensemble des résultats obtenus, il semble capital pour le lecteur de disposer de l'ensemble des informations nécessaires à une compréhension rapide et claire. Pour cela, la présentation des résultats est réalisée au travers de différents documents.

Une fiche signalétique propre à chacune des expérimentations menées est d'abord proposée de manière à synthétiser leurs objectifs, les conditions testées, les analyses réalisées ainsi que les réplicats utilisés et les remarques éventuelles. Font alors suite les représentations graphiques relatives aux résultats obtenus par le biais des différentes analyses réalisées. Pour chacune de ces figures, des tableaux de synthèse des données brutes ainsi que des tests statistiques réalisés et de leurs résultats sont donnés en annexe de manière à disposer de l'ensemble des informations disponibles permettant un décryptage complet des données.

1 - INFLUENCE DE LA DUREE D'ACCLIMATATION ET DU SEXE

La fiche signalétique de cette expérimentation est présentée par le **tableau VIII**.

Tableau VIII. Fiche signalétique relative à l'étude de l'influence de la durée d'acclimatation et du sexe des individus

Objectif	Etude de l'influence de la durée d'acclimatation et du sexe des organismes sur les biomarqueurs de stress oxydant		
Conditions expérimentales testées	Durée d'acclimatation	3 conditions	2, 3 et 4 semaines
	Sexe des organismes	2 conditions	Mâles et femelles
Analyses réalisées	Paramètres de stress oxydant	Organe : foie	SOD, CAT, GShtot, GPX
Réplicats par condition (<i>n</i>)	<i>n</i> = 10 (4 individus par réplicat)	240 organismes au total	
Remarques	Résultats utilisés lors d'un protocole d'intercomparaison dans le cadre du transfert de techniques entre l'INERIS et le LRE.		

Les graphiques décrivant l'évolution des activités de la superoxyde dismutase, de la catalase, de la glutathion peroxydase, ainsi que l'évolution de la quantité de glutathion total au cours de l'acclimatation sont présentés dans les **figures 23 à 26**. Les données brutes ainsi que le traitement statistique réalisé à partir de ces dernières sont exposés en **annexe B**.

Concernant l'évolution de l'activité de la superoxyde dismutase (figure 23), l'examen statistique des données a permis de révéler un effet de la durée de l'acclimatation (ANOVA p -value < 0,05). Ainsi, une différence significative existe entre l'activité de la superoxyde dismutase observée après 3 semaines d'acclimatation par rapport à celle enregistrée après seulement 2 semaines (Tukey HSD p -value < 0,05). Cette augmentation de l'activité SOD n'est cependant pas maintenue après 4 semaines. Pour ce qui est de l'influence du sexe des individus, aucune différence statistique n'a pu être dégagée sur ce paramètre.

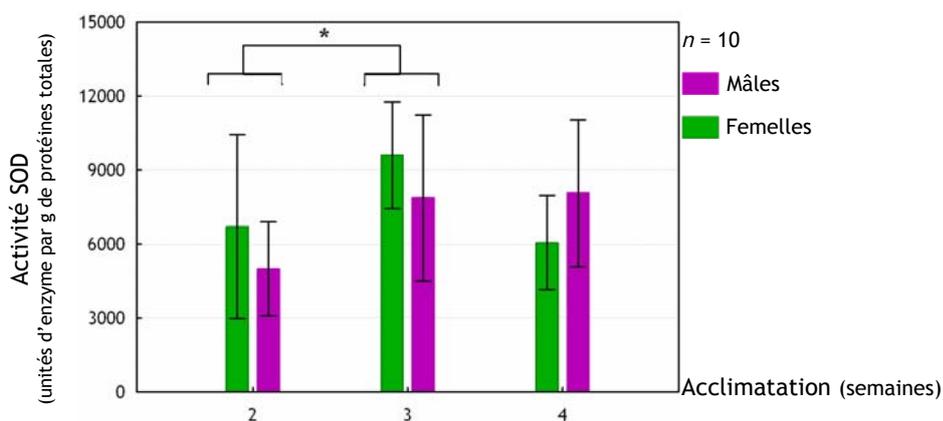


Figure 23. Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'acclimatation

L'activité de la catalase (figure 24) ne présente quant à elle aucune variabilité au cours du temps. Cependant, un effet du sexe des individus existe (ANOVA p -value < 0,05).

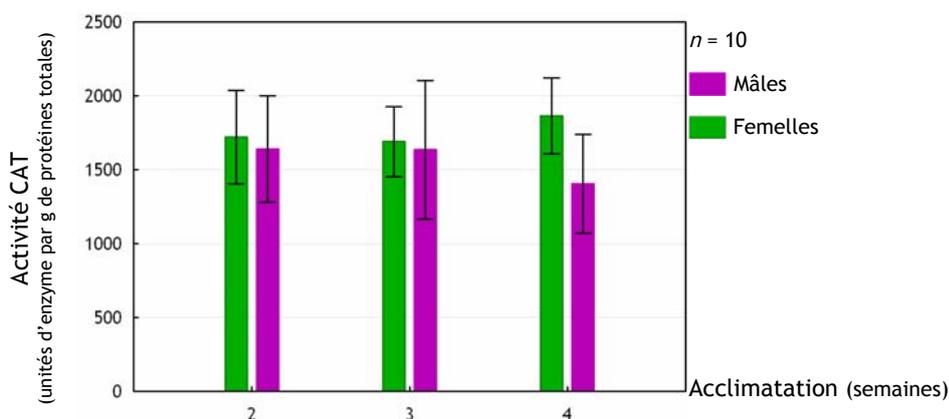


Figure 24. Evolution de l'activité catalase au cours de l'acclimatation

L'activité de la glutathion peroxydase (figure 25) est, comme pour l'activité de la superoxyde dismutase, influencée par la durée de l'acclimatation (ANOVA p -value < 0,001). Cette activité est en effet significativement plus élevée après 3 et 4 semaines d'acclimatation qu'après seulement 2 semaines (Tukey HSD p -values < 0,05).

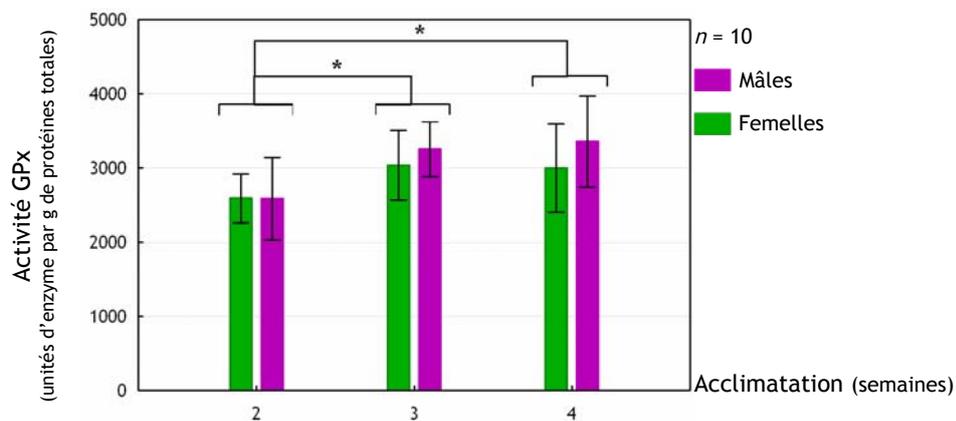


Figure 25. Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'acclimatation

Du point de vue de la quantité de glutathion total (figure 26), aucun des tests de comparaison de moyennes pratiqués n'a permis de dégager l'influence de la durée d'acclimatation ou du sexe des individus.

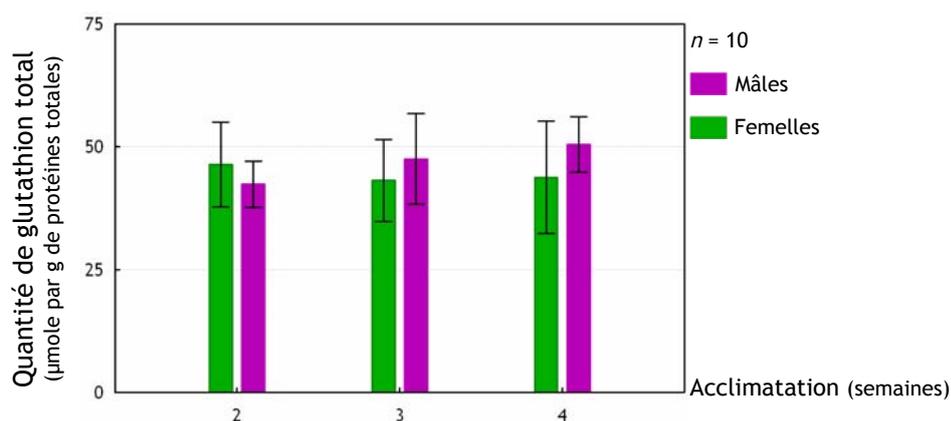


Figure 26. Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'acclimatation

2 - EVALUATION DE LA CHIMIOTOXICITE DE L'URANIUM

La fiche signalétique de cette expérimentation est présentée par le **tableau IX**.

Tableau IX. Fiche signalétique relative à l'évaluation de la chimiotoxicité de l'uranium.

Objectif	Etude des effets induits par des concentrations croissantes en uranium appauvri sur les paramètres du stress oxydant, de neurotoxicité, de génotoxicité et de bioaccumulation		
Conditions expérimentales testées	Pression chimique	4 conditions	0 - 20 - 100 - 500 µg/L
	Durée d'exposition	7 conditions	0* - 0,5 - 1,5 - 3 - 5 - 10 et 20** j
Analyses réalisées	Paramètres de stress oxydant	Organe : foie	SOD, CAT, GShtot, GPX
	Paramètre de neurotoxicité	Organe : cerveau	AChE
	Paramètre de génotoxicité	Tissu : sang	Intégrité de l'ADN
	Bioaccumulation	Organisme entier	
Réplicats par condition (n)	n = 5 (4 individus par réplicat) pour les mesures de stress oxydant et de neurotoxicité	420 organismes	600 organismes au total
	n = 10 (1 individu par réplicat) pour les mesures de génotoxicité et de bioaccumulation	180 organismes	
Remarques	<p>* : Pour cette expérimentation, l'acclimatation des organismes a été réalisée hors du système d'exposition, dans une enceinte unique. A t = 0, les mesures de stress oxydant, de neurotoxicité et de génotoxicité n'ont concerné qu'un seul groupe d'individus, les autres ont ensuite été répartis dans les bacs d'exposition.</p> <p>** : Le temps "20 j" n'a concerné que les mesures de génotoxicité et de bioaccumulation (choix motivé par une étude préalable (Buet et al., 2005))</p>		

Le suivi de la contamination tout au long de cette expérimentation est quant à elle présentée en **annexe C1** de ce document.

2.1 - Bioaccumulation

Le suivi de la bioaccumulation dans les organismes exposés à l'uranium est présenté en **figure 27**. Le traitement statistique réalisé ainsi que les jeux de données correspondants sont présentés en **annexe C2**.

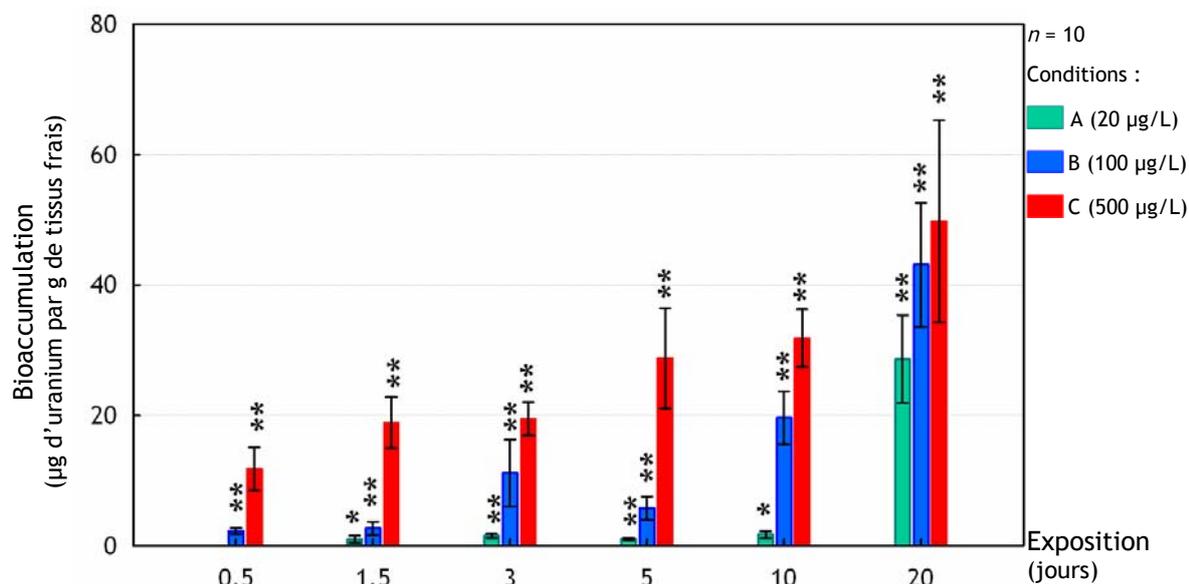


Figure 27. Suivi de la bioaccumulation de l'uranium au cours de l'exposition.

Au vu de cette représentation graphique, nous pouvons constater que l'uranium est internalisé très rapidement par les poissons puisqu'on le détecte dès 12 h d'exposition dans les organismes exposés à 100 et 500 µg/L. A ce stade de l'étude, l'uranium n'a été détecté par ICP-AES que dans un seul des 10 poissons exposés à 20 µg/L (concentration constatée : 192 ng U/g de tissu).

A l'exception de ce cas particulier posé après 0,5 j d'exposition, des quantités significatives d'uranium ont été retrouvées chez l'ensemble des individus exposés. De plus, cette bioaccumulation de l'uranium semble être directement liée au niveau d'exposition (défini à la fois par la concentration et la durée d'exposition).

Pour ce qui est de l'effet de la durée d'exposition sur le niveau d'accumulation, il semblerait que, pour des durées croissantes d'exposition, l'internalisation augmente. Néanmoins, cette augmentation n'est pas linéaire et l'on constate que les cinétiques d'accumulation semblent s'infléchir progressivement au fur et à mesure que le temps passe. Ce ralentissement suggère donc l'existence d'un plateau d'accumulation maximale qui serait atteint à plus ou moins long terme selon les niveaux d'expositions.

Cette idée de l'existence d'un plateau d'accumulation se voit confortée lorsque l'on s'intéresse à l'étude de l'accumulation en fonction de la concentration en uranium. En effet, jusqu'à 10 j, toutes les conditions induisent des niveaux de bioaccumulation significativement différents entre eux (*cf.* annexe C2). Or, au-delà de cette durée, les niveaux d'accumulation ne sont plus significativement différents, les poissons exposés aux plus fortes concentrations se faisant progressivement "rattraper" par ceux exposés aux concentrations les plus faibles du fait de l'infléchissement de la cinétique d'accumulation du groupe exposé à 500 µg/L.

A ces niveaux d'accumulation peuvent être associés des facteurs de bioconcentration, normalisant l'accumulation en fonction de l'exposition (tableau X). Leur étude révèle des niveaux élevés d'accumulation en fonction de l'exposition. En effet, dès 0,5 j on note des facteurs de concentration de l'ordre de 23 chez les poissons exposés à 100 et 500 µg/L (signifiant que l'uranium présent dans les tissus des organismes y est 23 fois plus concentré que dans l'eau d'exposition). Ceci atteste donc de la très forte biodisponibilité de l'uranium pour les poissons ainsi que de la rapidité des cinétiques d'accumulation. Ces facteurs de bioconcentration augmentent ensuite tout au long de l'expérimentation de façon inversement corrélée à la concentration d'exposition. Ainsi, à 20 j on note des facteurs de bioconcentration de l'ordre de 1400, 430 et 100 chez les organismes exposés à 20, 100 et 500 µg/L d'uranium respectivement.

Tableau X. Facteurs de bioconcentration. Calcul effectué sur la base des données de bioaccumulation (en poids de tissus frais) et des concentrations en uranium des eaux d'exposition mesurées durant l'expérimentation (annexe C1). moyenne ± écart-type (* : un seul individu).

Durée (j)	Facteurs de bioconcentration		
	Exposition à 20 µg/L	Exposition à 100 µg/L	Exposition à 500 µg/L
0,5	7,4*	14,8 ± 9,4	23,8 ± 21,2
1,5	56,1 ± 68,9	20,3 ± 24,6	40,4 ± 26,5
3	66,1 ± 43,7	96,2 ± 139,9	42,0 ± 17,5
5	42,0 ± 21,9	52,1 ± 51,4	61,5 ± 51,9
10	67,9 ± 60,8	177,8 ± 116,7	63,7 ± 28,0
20	1033,3 ± 768,8	359,5 ± 250,9	92,8 ± 91,2

L'examen parallèle du graphique représentant l'accumulation de l'uranium en fonction du temps et du tableau regroupant les facteurs de bioconcentrations correspondants, révèle un infléchissement de l'accumulation entre 3 et 5 j. Ceci est attribuable au fait qu'un suivi de la concentration en uranium des bacs d'exposition n'a pas pu être assuré en temps réel sur cette période. Le maintien de la pression de contamination a donc dû être réalisé "en aveugle" et une dérive de la contamination vers des valeurs légèrement inférieures à la valeur nominale a été constatée après coup. Les poissons ont donc été exposés à une pression de contamination moins importante, expliquant donc la singularité des données obtenues à 5 j.

2.2 - Etude du stress oxydant

Les données brutes et leur traitement statistique sont exposés en [annexe C3](#).

2.2.1 - L'activité de la superoxyde dismutase

L'activité superoxyde dismutase ([figure 28](#)) ne varie pas suite à une exposition à de l'uranium appauvri, quelle que soit la concentration de ce dernier ou le temps d'exposition considéré. En effet, les seules différences significatives détectées statistiquement opposent, après 0,5 j d'exposition, la condition C (500 µg/L) aux conditions A et B (20 et 100 µg/L - Tukey HSD p -values = $6,1 \cdot 10^{-2}$ et $5,7 \cdot 10^{-2}$ respectivement)). Les activités mesurées pour ces trois conditions n'étant pas significativement différentes de celle du témoin, aucun effet n'est induit par l'uranium.

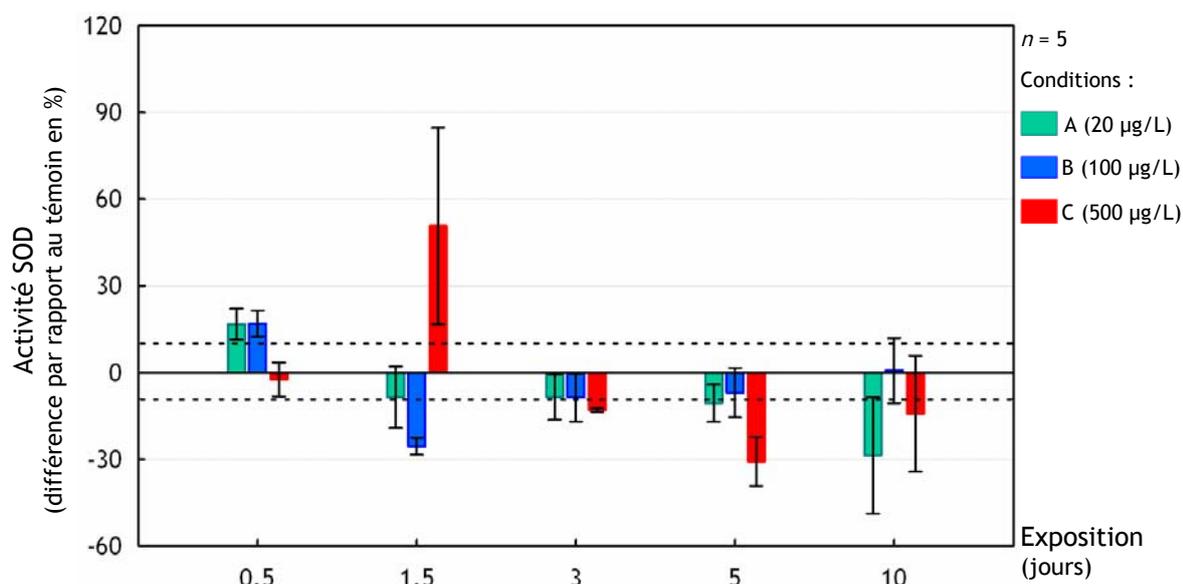


Figure 28. Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'exposition

2.2.2 - L'activité de la catalase

L'évolution de l'activité de la catalase au cours de l'expérimentation (figure 29) montre quant à elle l'existence d'un effet de la concentration en uranium appauvri. En effet, pour trois des cinq temps d'exposition investigués, un effet inhibiteur significatif de la concentration en uranium sur l'activité catalase a été montré statistiquement (ANOVA p -values < 0,05 pour 0,5, 3 et 5 j d'exposition). De plus, pour les deux autres durées d'exposition testées (1,5 et 10 j), cette tendance à l'inhibition semble être conservée, notamment pour les expositions aux plus fortes concentrations. Néanmoins, ces tendances ne peuvent être qualifiées comme statistiquement significatives même s'il n'est pas inutile de noter les p -values très proches de 10 %.

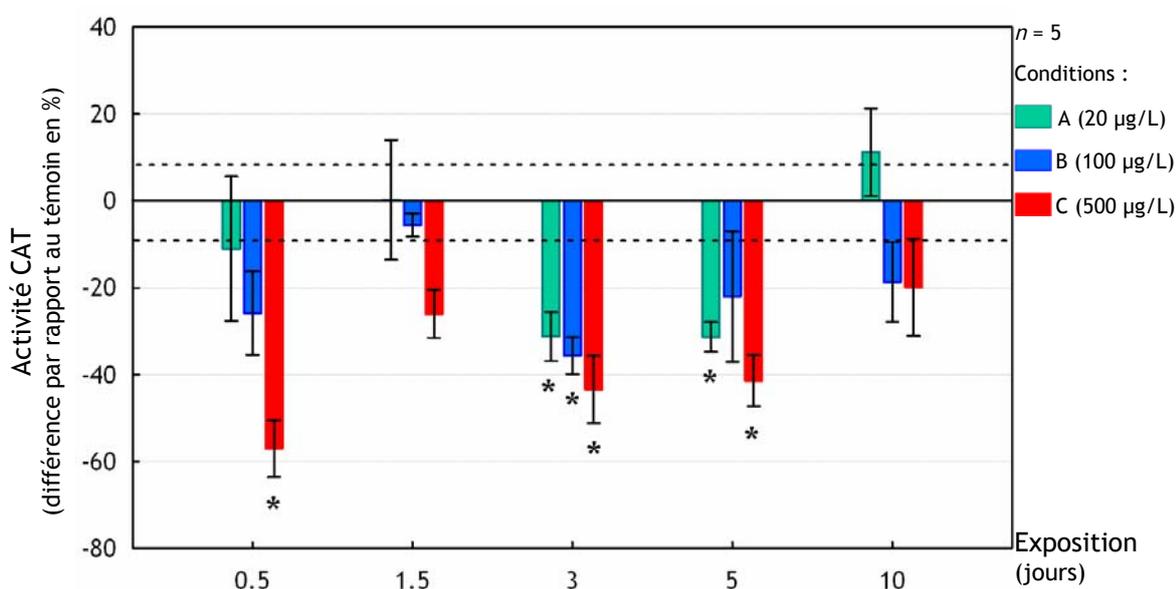


Figure 29. Evolution de l'activité catalase au cours de l'exposition

Si l'on s'intéresse plus dans le détail à ce qui se passe au niveau des différents temps d'exposition, on peut voir que pour la durée d'exposition la plus courte (0,5 j), la condition C (500 µg/L) est la seule pour laquelle l'activité hépatique de la catalase est inhibée de manière significative. Cette inhibition atteint alors 57 % (Tukey HSD p -value < 0,05). Cette inhibition est également significative par rapport aux poissons exposés à 20 µg/L d'uranium mais pas par rapport à ceux exposés à 100 µg/L (même si ces derniers ne sont pas différents du témoin).

Après 1,5 j, on ne retrouve plus de différences statistiques entre les différents groupes, même si les poissons exposés à 500 µg/L d'uranium tendent toujours à présenter des niveaux d'activité de la catalase inférieurs à ceux des témoins.

Après 3 j d'exposition, une inhibition telle que celle décrite à 0,5 j pour les organismes exposés à 500 µg/L est à nouveau observée. Elle s'étend alors à l'ensemble des concentrations testées et atteint 31 % pour les individus exposés à 20 µg/L, 36 % pour les individus exposés à 100 µg/L et 43 % pour ceux exposés à 500 µg/L d'uranium (Tukey HSD p -values < 0,05 quel que soit le groupe considéré).

L'inhibition observée à 3 j semble conservée à 5 j, tout au moins pour les organismes exposés à 20 et 500 µg/L chez lesquels cette inhibition atteint respectivement 31 et 41 % (Tukey HSD p -values < 0,05). Une tendance à l'inhibition semble également persister chez les poissons exposés à 100 µg/L mais n'est plus statistiquement significative.

A 10 j, aucune différence n'est constatée entre les individus témoins et exposés.

2.2.3 - L'activité de la glutathion peroxydase

Le suivi de l'activité hépatique de la glutathion peroxydase est présenté en [figure 30](#). D'un point de vue statistique, un effet de l'exposition à l'uranium n'est détectable qu'après 10 j (ANOVA p -value < 0,05). La condition pour laquelle cet effet apparaît correspond à la plus faible concentration testée. Les poissons présentent alors une augmentation de 64 % de l'activité GPx par rapport au témoin (Tukey HSD p -value < 0,05).

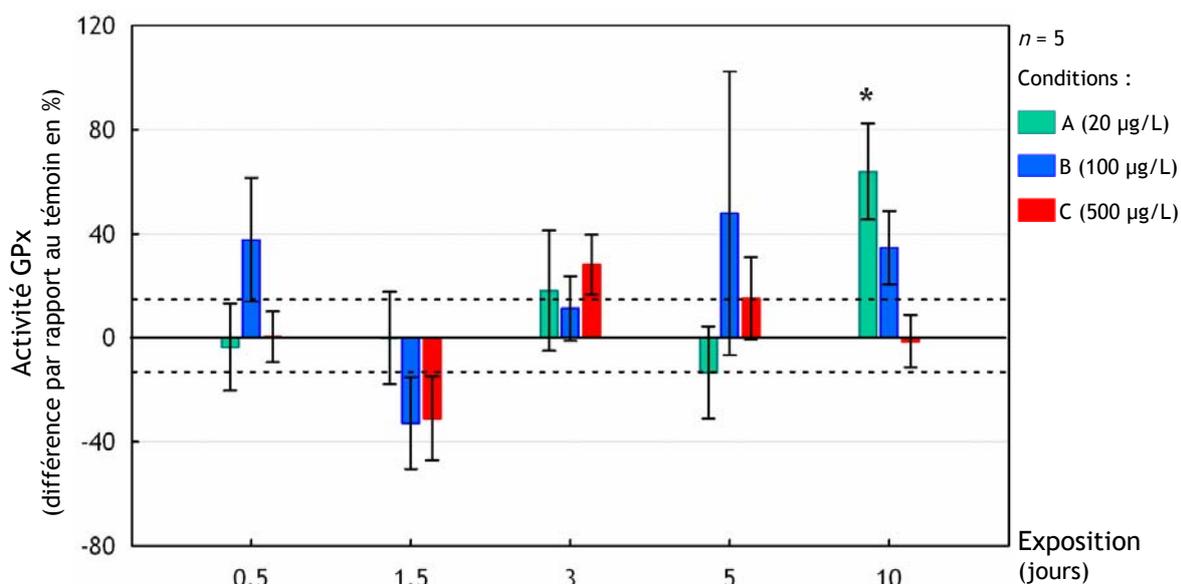


Figure 30. Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'exposition

2.2.4 - La quantité de glutathion total

Concernant la quantité totale de glutathion (figure 31), une seule condition d'exposition (100 µg/L - 3 j) induit des effets significatifs sur l'évolution de ce paramètre.

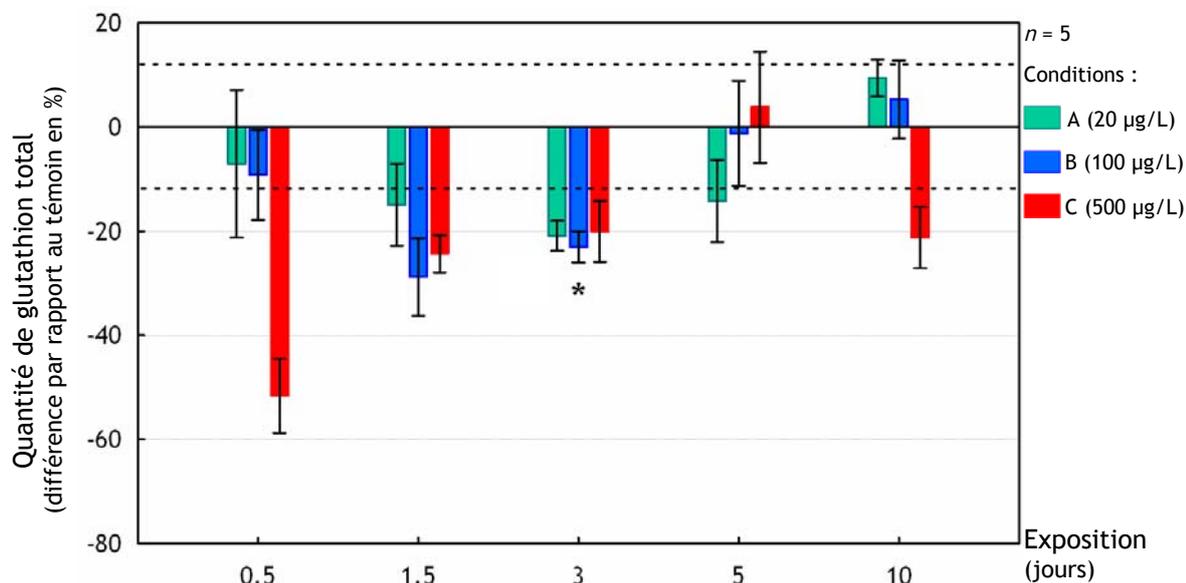


Figure 31. Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'exposition

Dès 0,5 j, un effet de l'uranium semble apparaître chez les organismes exposés à 500 µg/L d'uranium, une déplétion de plus de 51 % étant observée par rapport aux témoins. Néanmoins, l'examen statistique des données ne permet pas de dégager un réel effet de l'exposition à l'uranium. Il en est de même après 1,5, 5 et 10 j d'exposition.

A 3 j, l'ensemble des conditions d'exposition investiguées semble induire une déplétion de la quantité hépatique de glutathion total (ANOVA p -value < 0,05). Cette déplétion atteint 21, 23 et 20 % chez les poissons exposés à 20, 100 et 500 µg/L d'uranium respectivement mais n'apparaît comme significative que dans le cas des organismes exposés à 100 µg/L (Tukey HSD p -value < 0,05).

2.3 - Etude de la neurotoxicité

Le graphique décrivant l'évolution de l'activité de l'acétylcholinestérase au cours de l'exposition aux différentes concentrations d'uranium appauvri est présenté dans la figure 32. Le traitement statistique ainsi que les jeux de données correspondant sont exposés en annexe C4.

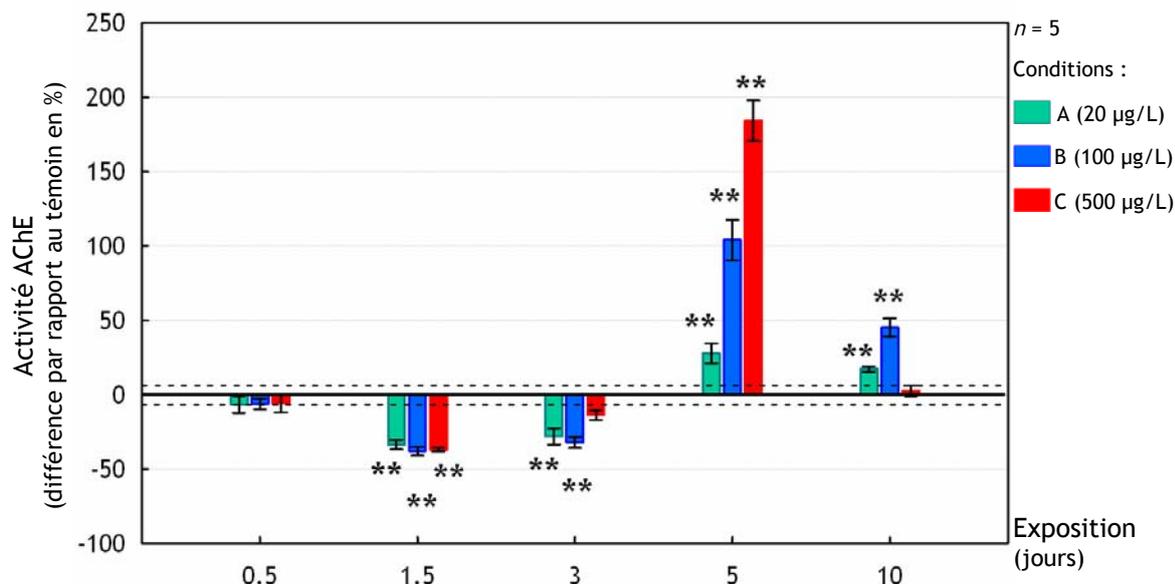


Figure 32. Evolution de l'activité de l'acétylcholinestérase au cours de l'exposition

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de 1,5 j et jusqu'à 10 j, il existe un effet significatif de l'exposition à l'uranium sur les poissons (ANOVA p -values < 0,001).

Si l'on s'intéresse de plus près à ce qui se passe au niveau de l'activité acétylcholinestérase, on peut dans un premier temps dégager une tendance générale des effets. Ainsi, pour des durées d'expositions relativement courtes (1,5 et 3 j), on note une inhibition de l'activité de cette enzyme. Faisant suite à cette inhibition, on observe une induction de l'activité enzymatique après 5 et 10 j. Néanmoins, entre 5 et 10j, un retour de l'activité vers un niveau basal semble s'amorcer, suggérant une disparition des effets pour des durées d'exposition plus longues.

Dans le détail, après 1,5 j d'exposition l'inhibition d'activité est significative (ANOVA p -value < 0,001) pour les trois conditions testées. Les poissons exposés à l'uranium présentent alors une inhibition de l'activité acétylcholinestérasique comprise entre 33 et 38 % par rapport au témoin (Tukey HSD p -values < 0,001).

Après 3 j, l'inhibition n'est plus observée chez les individus exposés à 500 µg/L d'uranium (les organismes ayant certainement amorcé leur réaction de compensation visant à augmenter l'activité acétylcholinestérase). L'inhibition ne concerne alors plus que les individus exposés à 20 et 100 µg/L (ANOVA et Tukey HSD p -values \leq 0,001).

Après 5 j, une activation significative de l'acétylcholinestérase est observée chez les poissons issus des trois conditions d'exposition (ANOVA p -value < 0,001). Les niveaux d'activation observés sont de 28, 104 et 184 % chez les poissons exposés à 20, 100 et 500 $\mu\text{g/L}$ respectivement. Ces niveaux permettent d'opposer significativement chacun de ces groupes au groupe témoin (Tukey HSD p -value < 0,05 pour 20 $\mu\text{g/L}$ et < 0,001 pour 100 et 500 $\mu\text{g/L}$) ainsi qu'aux autres groupes d'organismes exposés. Il y a en effet trois niveaux d'activation différents ; l'activation observée suite à une exposition de 20 $\mu\text{g/L}$ étant inférieure à celle observée à 100 $\mu\text{g/L}$ (Tukey HSD p -value < 0,05), elle-même inférieure à celle observée à 500 $\mu\text{g/L}$ (Tukey HSD p -value < 0,001).

A 10 j, l'activation reste significative chez les individus exposés à 20 et 100 $\mu\text{g/L}$ d'uranium par rapport aux témoins (Tukey HSD p -values < 0,05 et 0,001 respectivement). Cette activation n'est alors plus que de 17 % pour les premiers et 45 % pour les seconds, ces deux niveaux apparaissant comme significativement différents entre eux (Tukey HSD p -value < 0,05). Les poissons exposés à la plus forte concentration ont quant à eux retrouvé un niveau d'activité basal, non significativement différent des témoins.

On peut donc retenir qu'à la suite d'une exposition à l'uranium, on observe tout d'abord une inhibition puis une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase. De plus, il est important de noter que l'inhibition observée n'est pas dépendante de la concentration d'exposition alors que, lors de la phase d'augmentation de l'activité, plus les organismes sont exposés à de fortes concentrations d'uranium et plus l'amplitude de la réponse est importante. De même, lors de cette seconde phase, il semblerait que plus la concentration d'uranium est importante et plus les cinétiques de réponse sont rapides. Ainsi, pour la condition d'exposition à 500 $\mu\text{g/L}$, l'activité de l'acétylcholinestérase est inhibée après 1,5 j, repasse par un niveau basal dès 3 j, est fortement augmentée après 5 j pour finalement retrouver un niveau basal après 10 j. Par comparaison, pour la condition d'exposition à 20 $\mu\text{g/L}$, l'activité de l'acétylcholinestérase est inhibée après 1,5 j, le reste après 3 j, semble repasser par un niveau basal entre 3 et 5 j pour être activée après 5 j (cette activation étant toujours présente après 10 j).

2.4 - Etude de la génotoxicité

Comme indiqué précédemment dans ce manuscrit, deux techniques d'évaluation de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire ont été utilisées pour ce travail. Les détails des données et du traitement statistique réalisé sont présentés en [annexe C5](#).

2.4.1 - Mesures de la génotoxicité par l'essai des comètes

Les résultats de l'analyse de l'ADN érythrocytaire sont présentés dans la [figure 33](#).

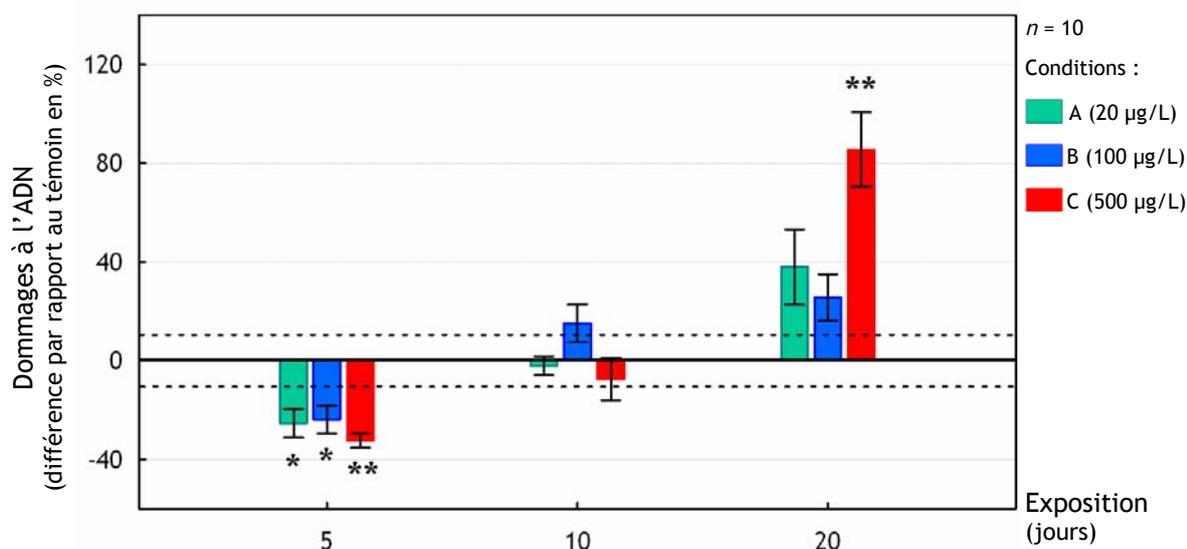


Figure 33. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par le biais de l'essai des comètes en version alcaline, paramètre retenu pour la quantification des dommages : "mean tail length", longueur moyenne de la queue des comètes)

Une précision semble nécessaire à apporter concernant les temps d'exposition analysés. En effet, bien que des prélèvements sanguins aient été réalisés dès 0,5 j et jusqu'à 20 j, et bien qu'à partir de ces prélèvements toutes les lames microscopiques aient été préparées en vue de leur analyse par un système de traitement d'images, la lecture n'a pas été réalisée sur l'ensemble des lames. Ainsi, en raison du nombre de lames à analyser par temps d'exposition testé et donc du temps nécessaire à la conduite de ces analyses, il a été décidé de procéder aux analyses d'image en débutant par les temps d'exposition les plus importants pour remonter l'ordre chronologique des prélèvements. De cette façon, l'analyse s'est limitée à ne lire de lames que jusqu'à ne plus observer d'effets génotoxiques. Ainsi, les analyses ont débuté par les lames préparées à partir des

cellules prélevées après 20 j d'exposition. Un effet ayant été révélé, le temps "10 j" a également été analysé. Aucun effet n'a alors été détecté. Cependant, pour s'assurer de ne pas passer à côté d'un éventuel effet plus précoce, le temps "5 j" a également été investigué. L'examen des lames ayant été réalisé par simple observation des figures de comète lors de l'analyse d'image, aucun effet n'a été décelé. Il a alors été décidé de ne pas conduire d'analyses sur des temps plus précoces, en accord avec d'autres résultats précédemment obtenus sur la truite (Buet et al., 2005).

Après 5 j d'exposition, l'examen statistique des données a néanmoins permis de noter un effet significatif de l'exposition à l'uranium (ANOVA p -value < 0,001). L'ensemble des conditions testées se sont ainsi avérées significativement différentes du témoin (Tukey HSD p -values < 0,05 pour 20 et 100 $\mu\text{g/L}$ et < 0,001 pour 500 $\mu\text{g/L}$), le niveau de dommages à l'ADN mesuré chez les organismes exposés à l'uranium étant inférieur au niveau de dommage "basal" des témoins.

Après 20 j d'exposition, un effet génotoxique apparaît (ANOVA p -value < 0,001). Cet effet est significatif chez les poissons exposés à 500 $\mu\text{g/L}$ (Tukey HSD p -value < 0,001). On note alors une augmentation du niveau de dommages de 86 % par rapport au témoin.

2.4.2 - Mesures de la génotoxicité par la cytométrie en flux

Les résultats obtenus en cytométrie en flux sont présentés dans la [figure 34](#).

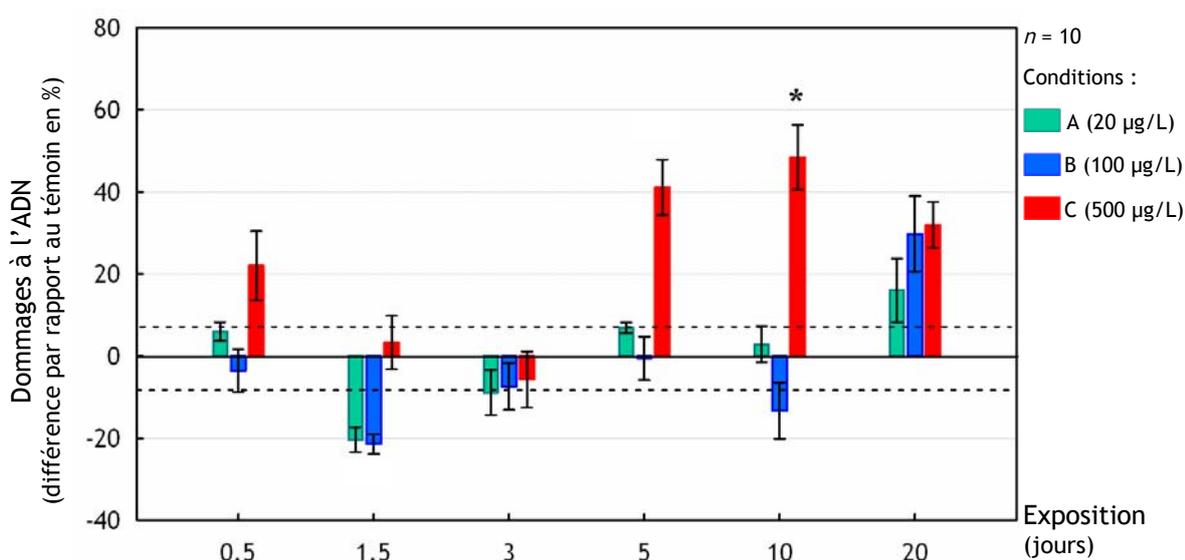


Figure 34. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (résultats obtenus par la cytométrie en flux, le paramètre retenu à l'issue du traitement des données obtenues étant le "FSC mean" soit le diamètre moyen des nucléoïdes)

Contrairement à l'essai des comètes, l'analyse en cytométrie en flux est très rapide (la préparation des échantillons en vue de leur passage dans le cytomètre ne dure que 15 min et leur analyse proprement dite étant généralement comprise entre 10 et 30 s). C'est pourquoi l'ensemble des échantillons collectés à cette fois-ci a été analysé sans contraintes.

Les premières variations importantes du diamètre moyen des nucléoïdes apparaissent après 5 j d'exposition. On note alors une augmentation de 41 % de ce paramètre chez les organismes exposés à 500 µg/L. Néanmoins, les tests statistiques ne permettent de différencier cette exposition que des autres conditions d'exposition à l'uranium (Wilcoxon corrigé par Bonferroni p -values < 0,05) et non du témoin.

A 10 j d'exposition la même tendance se dessine. Cette fois-ci le groupe d'organismes exposés à 500 µg/L se différencie statistiquement de tous les autres, y compris du témoin (ANOVA p -value < 0,001 - Tukey HSD p -values ≤ 0,001).

A 20 j, on note une tendance à l'augmentation du niveau d'endommagement pour l'ensemble des groupes d'organismes exposés à l'uranium. Néanmoins, cette tendance n'est pas confirmée statistiquement.

3 - EVALUATION DE LA PART RELATIVE DES TOXICITES CHIMIQUE ET RADIOLOGIQUE (1)

La fiche signalétique de cette expérimentation est présentée par le [tableau XI](#). Le suivi de la contamination est quant à elle présentée en [annexe D1](#) de ce document.

3.1 - Bioaccumulation

3.1.1 - A l'échelle de l'organisme entier

Les mesures de bioaccumulation de l'uranium sont présentées en [figure 35](#). Les données brutes ainsi que le traitement statistique réalisé sont exposés en [annexe D2](#).

Tableau XI. Fiche signalétique relative à l'évaluation des toxicités chimique et radiologique (1)

Objectif	Etude de la part relative des effets induits chimiquement et radiologiquement par l'uranium sur les paramètres de stress oxydant, de neurotoxicité, de génotoxicité, d'histopathologie et de bioaccumulation		
Conditions expérimentales testées	Pression chimique	2 conditions	0 - 100 µg/L
	Pression radiologique	2 conditions	0 - 2 375 Bq/L (pour 100 µg/L)
	Durée d'exposition	4 conditions	0* - 3 - 10 et 20 j
Analyses réalisées	Paramètres de stress oxydant	Organe : foie	SOD, CAT, GShtot, GPX
	Paramètre de neurotoxicité	Organe : cerveau	AChE
	Paramètre de génotoxicité	Tissu : sang	Intégrité de l'ADN
	Observations histologiques*	Organes divers	Gonades, branchies, muscle
	Bioaccumulation	Organisme entier Organes isolés	Foie, gonades, branchies, cerveau, muscle, squelette, peau, viscères
Réplicats par condition (n)	n = 10 (4 individus par réplicat) pour les mesures de stress oxydant et de neurotoxicité	480 organismes	550 organismes au total
	n = 10 (1 individu par réplicat) pour les mesures de génotoxicité		
	n = 3 (1 individu par réplicat) pour les obs. histologiques		
	n = 10 (1 individu par réplicat) pour les mesures de bioaccumulation totale n = 4 (1 individu par réplicat) pour les mesures de bioaccumulation tissulaire	68 organismes	
Remarques	<p>* : Pour cette expérimentation, l'acclimatation des organismes a été réalisée au sein du système d'exposition, les poissons ayant été répartis dans les trois bacs représentant chacune des conditions d'exposition à l'uranium. A t = 0, les mesures de stress oxydant, de neurotoxicité et de génotoxicité ont donc concerné trois groupes d'individus, un pour chacune des populations ainsi formées.</p> <p>** : Les mesures d'accumulation tissulaire n'ont été effectuées qu'à 20 j.</p>		

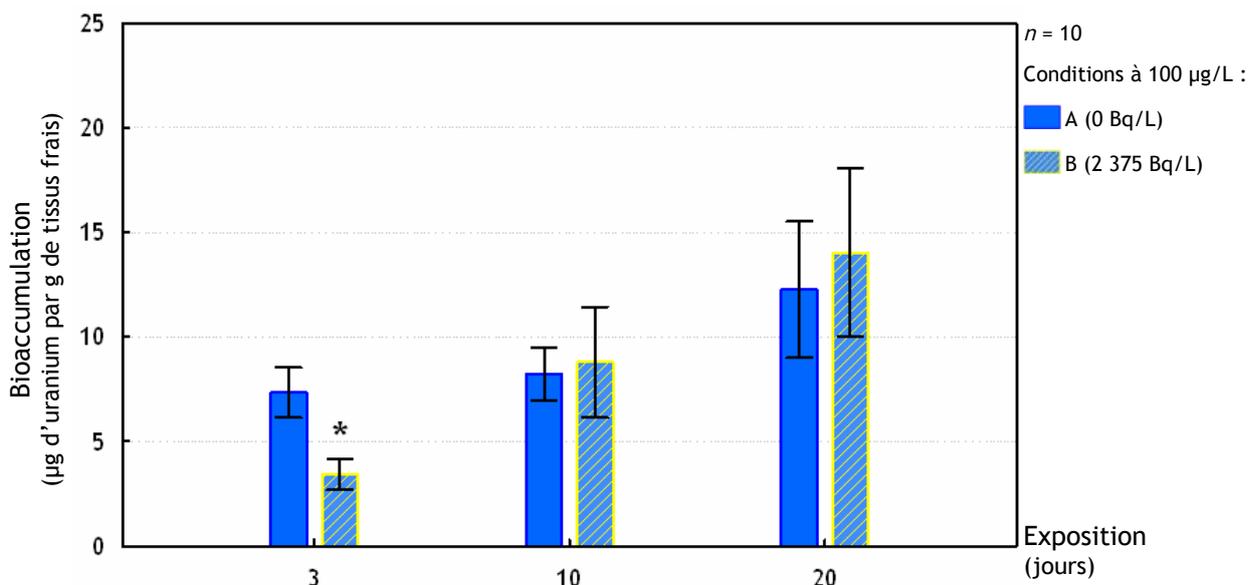


Figure 35. Suivi de la bioaccumulation de l'uranium au cours de l'exposition (l'astérisque désigne la différence significative d'accumulation entre les organismes exposés au mélange d'uranium appauvri et d'²³³U et ceux exposés à l'U appauvri seul).

Le suivi de la bioaccumulation de l'uranium à l'échelle de l'organisme entier en fonction de la composition isotopique de cet élément a permis de montrer que l'activité radiologique délivrée peut moduler les niveaux d'accumulation. En effet, après 3 j d'exposition, on note une différence significative d'accumulation selon la composition isotopique considérée. Ainsi, les poissons exposés au mélange d'uranium appauvri et d'²³³U ont internalisé des quantités d'uranium significativement inférieures aux quantités internalisées par les organismes exposés seulement à de l'uranium appauvri (Wilcoxon p -value < 0,05).

Néanmoins, pour des durées d'expositions plus importantes, les niveaux d'accumulation sont identiques quelle que soit la composition isotopique considérée.

A partir de ces données de bioaccumulation de l'uranium, des estimations de débits de dose radiologique interne délivrés aux organismes lors de cette expérimentation ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans le [tableau XII](#).

Tableau XII. Estimation des débits de dose interne délivrés aux organismes lors de l'exposition aux différentes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart type ($n = 10$).

Conditions expérimentales		Débits de dose interne		
		3 j	10 j	20 j
Témoins	0 $\mu\text{g/L}$ - 0 Bq/L	0	0	0
A	100 $\mu\text{g/L}$ - 1,5 Bq/L	7,1 \pm 3,6 $\mu\text{Gy/j}$	8,1 \pm 3,9 $\mu\text{Gy/j}$	22,3 \pm 18,8 $\mu\text{Gy/j}$
B	100 $\mu\text{g/L}$ - 2 375 Bq/L	5,1 \pm 3,5 mGy/j	13,1 \pm 12,4 mGy/j	20,8 \pm 18,9 mGy/j

3.1.2 - A l'échelle des tissus

Les mesures de concentration tissulaire de l'uranium en fonction de la composition isotopique à laquelle sont exposés les organismes sont présentées en [figure 36](#).

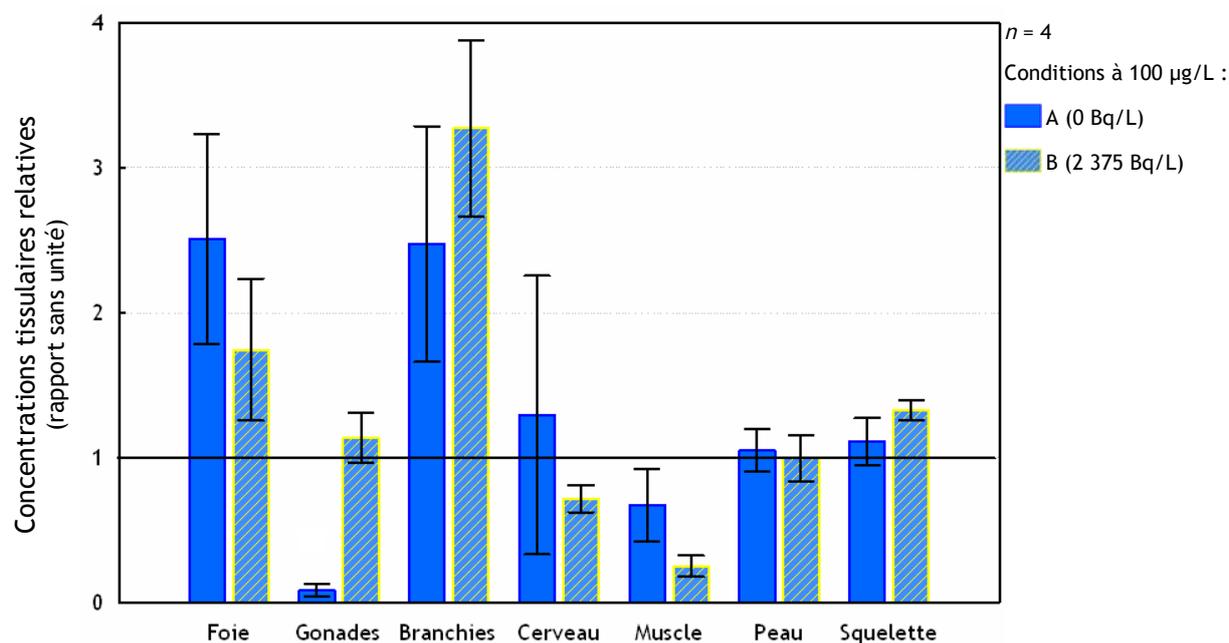


Figure 36. Concentrations relatives en uranium de différents tissus après 20 j d'exposition.

Etant donné le nombre limité de réplicats (seulement 4), ces résultats ne peuvent être considérés qu'à titre qualitatif. Nous nous limiterons donc à discuter des tendances dégagées sans analyse statistique du jeu de données.

L'observation des concentrations tissulaires en uranium montre que le foie et les branchies sont des sites d'accumulation préférentiels. De plus, l'étude de l'effet de la composition isotopique de l'uranium sur sa répartition tissulaire donne des résultats très intéressants. Ainsi, lorsque les organismes sont exposés à de l'uranium sous la forme d'un mélange d'uranium appauvri et ^{233}U , la répartition tissulaire de l'élément est légèrement modifiée. Ainsi, dans ce cas de figure et à la différence d'une exposition à de l'uranium appauvri seul, le squelette semble également constituer un site d'accumulation préférentiel de l'élément, en plus du foie et des branchies. De même, la composition isotopique de l'uranium influe sur l'accumulation dans les gonades. Ainsi, lorsque les organismes sont exposés à de l'uranium appauvri seul, on note une accumulation quasi nulle de l'élément dans les gonades tandis que cette accumulation est aussi importante que pour l'ensemble des organes lors d'une exposition au mélange uranium appauvri - ^{233}U .

3.2 - Etude du stress oxydant

Les graphiques décrivant l'évolution des marqueurs hépatiques de stress oxydant sont présentés dans les figures 37 à 40 (annexe D3 : données brutes et traitement statistique).

3.2.1 - L'activité de la superoxyde dismutase

Comme nous pouvons le voir sur la figure 37, l'activité hépatique de la superoxyde dismutase évolue au cours de l'expérimentation.

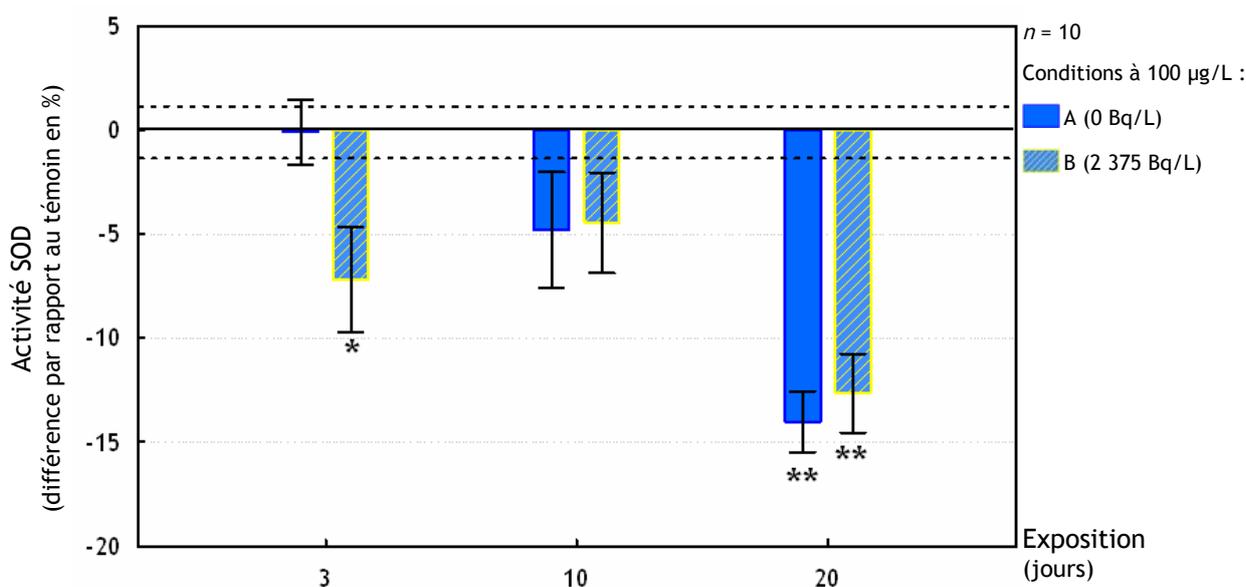


Figure 37. Evolution de l'activité superoxyde dismutase au cours de l'exposition

Ainsi, dès 3 j d'exposition au mélange isotopique d'uranium présentant la plus forte activité spécifique (mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U), on note une inhibition de l'activité superoxyde dismutase au niveau hépatique de 7,2 % par rapport au témoin. Cette inhibition différencie donc les organismes exposés au mélange $\text{U}_{\text{appauvri}} - ^{233}\text{U}$ des organismes témoins et de ceux exposés seulement à de l'uranium appauvri (Wilcoxon p -values < 0,05).

Après 10 j, on ne retrouve plus d'inhibition significative entre individus exposés et individus témoins (même si, graphiquement, une tendance à l'inhibition semble s'établir).

Après 20j, une nouvelle inhibition enzymatique est constatée chez les organismes exposés au mélange isotopique fortement actif d'un point de vue radiologique (Tukey HSD p -value < 0,001). Cette fois-ci, les individus exposés seulement à de l'uranium appauvri présentent également une inhibition de l'activité de cette enzyme (Tukey HSD p -value < 0,001), d'importance comparable à celle observée chez les premiers (14,0 et 12,6 % respectivement pour l'uranium seul et en mélange avec de l' ^{233}U).

3.2.2 - L'activité de la catalase

L'évolution de l'activité de la catalase au cours de l'exposition aux deux mélanges isotopiques testés (figure 38) indique également un effet inhibiteur de l'uranium sur cette enzyme du stress oxydant.

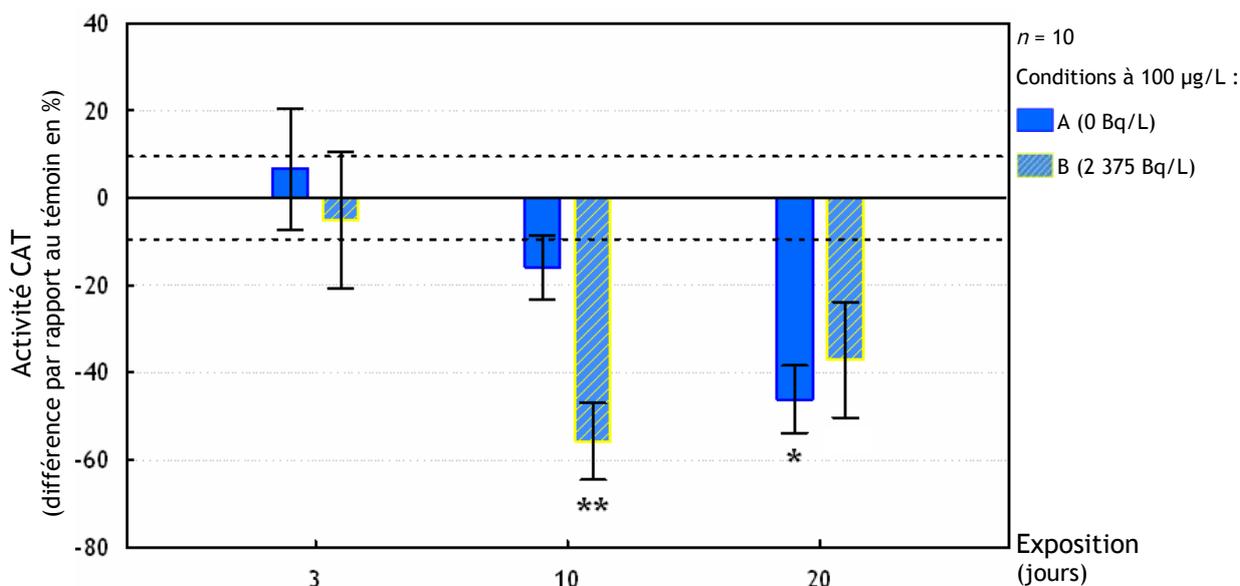


Figure 38. Evolution de l'activité catalase au cours de l'exposition

A la différence de l'activité de la superoxyde dismutase, l'activité de la catalase n'est pas perturbée après 3 j d'exposition quel que soit le mélange isotopique considéré.

Néanmoins, après 10 j, tout comme pour la superoxyde dismutase après 3 j, on note un effet inhibiteur significatif de l'exposition au mélange $U_{\text{appauvri}} - {}^{233}\text{U}$. Cette inhibition, de 55,8 %, différencie statistiquement ces individus des individus témoins et exposés à de l'uranium appauvri seul (Tukey HSD p -values < 0,001 et 0,05 respectivement).

Après 20 j, on retrouve également des similitudes avec le cas de la superoxyde dismutase, à savoir qu'un effet inhibiteur de l'uranium survient quelle que soit la composition isotopique considérée. Ainsi, l'exposition à l'uranium appauvri seul est à l'origine d'une inhibition de 46,1 % de l'activité de la catalase par rapport au témoin (Tukey HSD p -value < 0,05). L'exposition au mélange $U_{\text{appauvri}} - {}^{233}\text{U}$ induit quant à elle une inhibition de 37,1 % par rapport au témoin que nous pouvons considérée comme significative car très proche du seuil de 5 % (Tukey HSD p -value = $6,4 \cdot 10^{-2}$).

3.2.3 - L'activité de la glutathion peroxydase

Le suivi de l'activité de la glutathion peroxydase au cours de l'expérimentation est présenté dans la [figure 39](#).

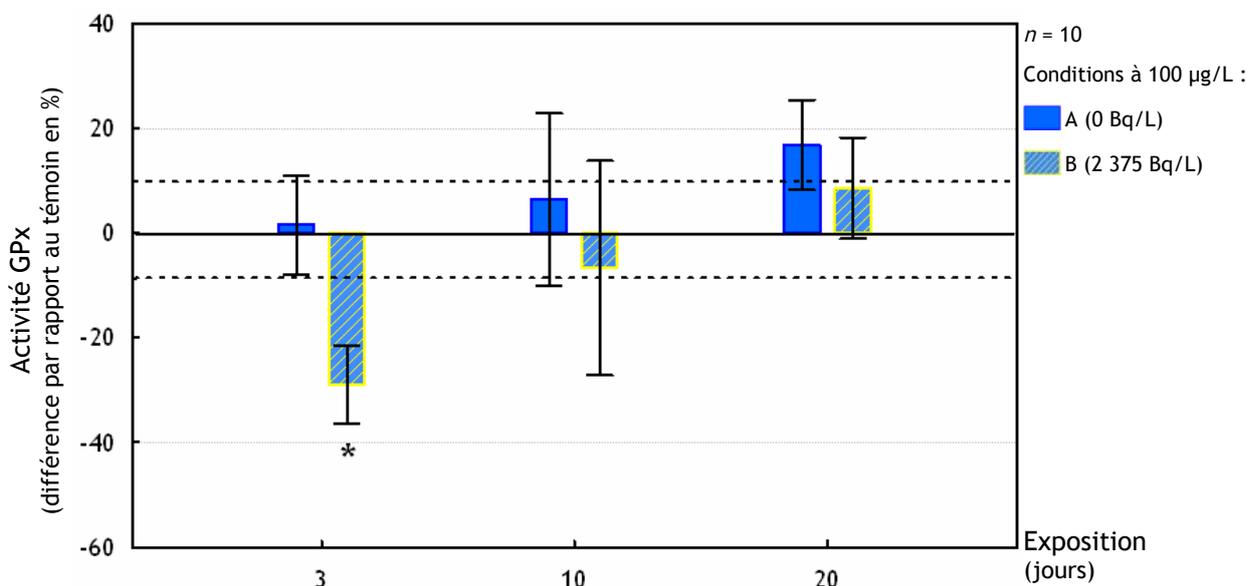


Figure 39. Evolution de l'activité glutathion peroxydase au cours de l'exposition

Un effet significatif de l'exposition au mélange $U_{\text{appauvri}} - {}^{233}\text{U}$ apparaît dès 3 j. Ainsi, on note une inhibition de 29,0 % de l'activité de cette enzyme chez les individus exposés à ce mélange.

Cette inhibition différencie significativement ces individus des organismes témoins et de ceux exposés seulement à de l'uranium appauvri (Tukey HSD p -values < 0,001 et 0,05 respectivement). Pour des temps d'exposition plus importants, on ne retrouve plus d'effet significatif de l'exposition à l'uranium quelle que soit son activité radiologique.

3.2.4 - La quantité de glutathion total

L'évolution de la quantité de glutathion total (figure 40) comporte de nombreuses similitudes avec celle de l'activité de la glutathion peroxydase. On retrouve en effet les mêmes tendances ainsi que les mêmes cinétiques d'effet.

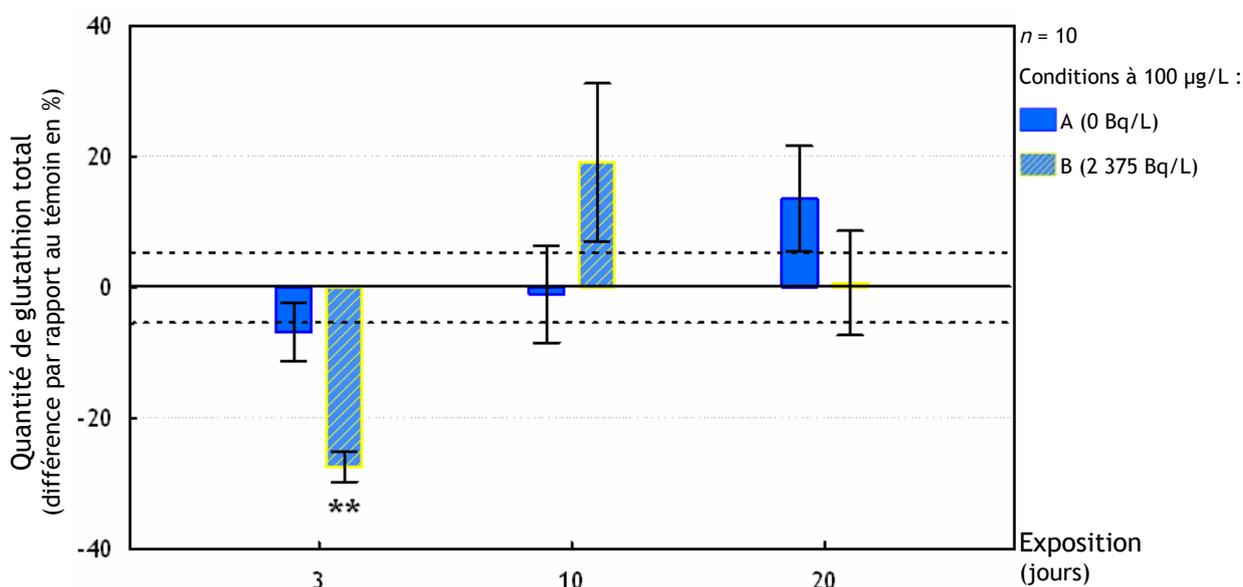


Figure 40. Evolution de la quantité de glutathion total au cours de l'exposition

Ainsi, dès 3 j, on note une forte déplétion de la quantité hépatique de glutathion (27,5 %) chez les organismes exposés au mélange $U_{\text{appauvri}} - {}^{233}\text{U}$. Cette déplétion différencie ces organismes des individus témoins et exposés seulement à de l'uranium appauvri (Tukey HSD p -values < 0,001 et 0,05 respectivement).

Pour des durées d'exposition plus importantes, on ne note plus aucune différence entre les trois groupes expérimentaux.

3.3 - Etude du neurotoxicité

Les mesures de l'activité de l'acétylcholinestérase au cours de l'expérimentation sont présentées en [figure 41](#). Les données brutes et leur examen statistique sont donnés en [annexe D4](#).

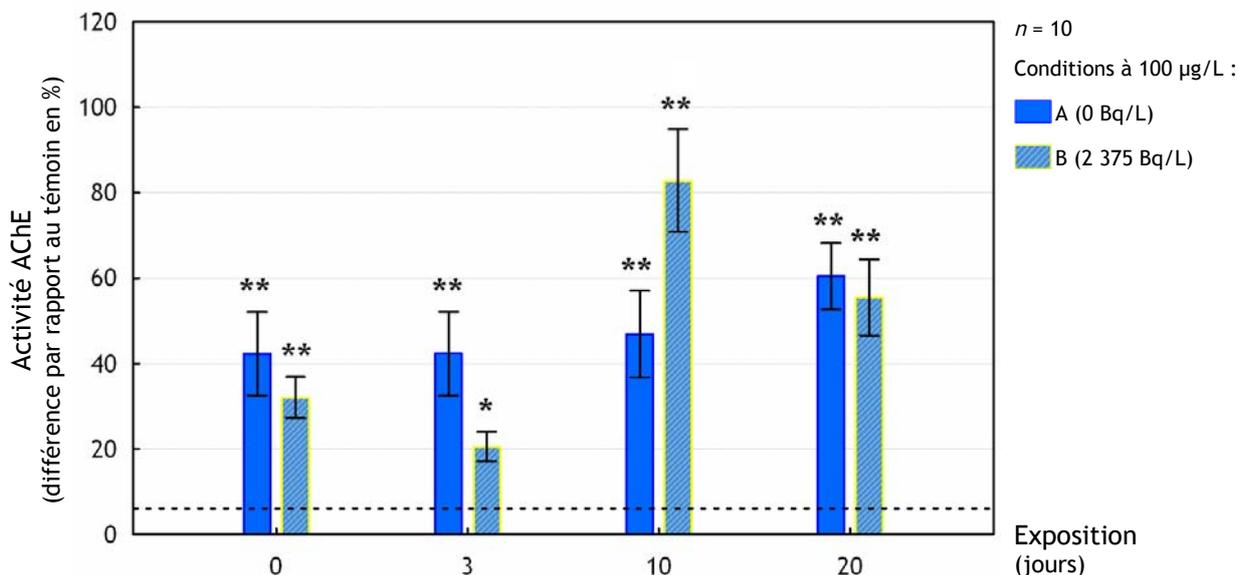


Figure 41. Evolution de l'activité de l'acétylcholinestérase au cours de l'exposition

Avant d'examiner les effets de l'exposition à l'uranium au cours de cette expérimentation, il est important de noter que les mesures effectuées au temps 0 de l'expérimentation (c'est-à-dire juste avant la contamination des milieux) ont révélé l'existence d'une différence initiale des niveaux d'activités de l'acétylcholinestérase entre les organismes destinés à être exposés à l'uranium et ceux destinés à servir de témoin. En effet, à t_0 , les organismes destinés à être exposés à l'uranium (qu'il soit seul ou en mélange avec de l' ^{233}U) présentent des niveaux d'activité significativement supérieurs à ceux des organismes destinés à servir de témoin (ANOVA p -value < 0,001, Tukey HSD p -values < 0,001). Cette différence initiale va donc être à l'origine de difficultés dans l'interprétation des résultats enregistrés pendant l'expérimentation.

L'origine de cette différence est difficile à comprendre. Néanmoins, il faut rappeler que, dans le cadre de nos études, l'acclimatation des organismes se fait au sein même des systèmes expérimentaux. Ceci suppose donc que les populations de poissons soient séparées bien avant le t_0 , au début de l'acclimatation (c'est-à-dire 2 semaines avant le t_0). Ce protocole expérimental est donc susceptible d'être à l'origine de l'apparition de différence entre les populations (même si des dispositions sont prises de façon à ce qu'en principe, les conditions d'acclimatation soient

exactement identiques). Jusqu'à présent, l'examen des populations à t_0 n'avait pas révélé de différences significatives entre les populations (notamment pour l'ensemble des marqueurs de stress oxydant).

Au regard des résultats obtenus, la différence de niveau d'activité de l'acétylcholinestérase existant entre les organismes exposés et témoins est restée constante pour l'ensemble de l'expérimentation. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse aux différences d'activités entre les différents temps d'exposition pour un même groupe d'individu (témoin, exposés à de l'uranium seul ou en mélange avec de l' ^{233}U), l'effet de l'uranium semble transparaître plus clairement (figure 42).

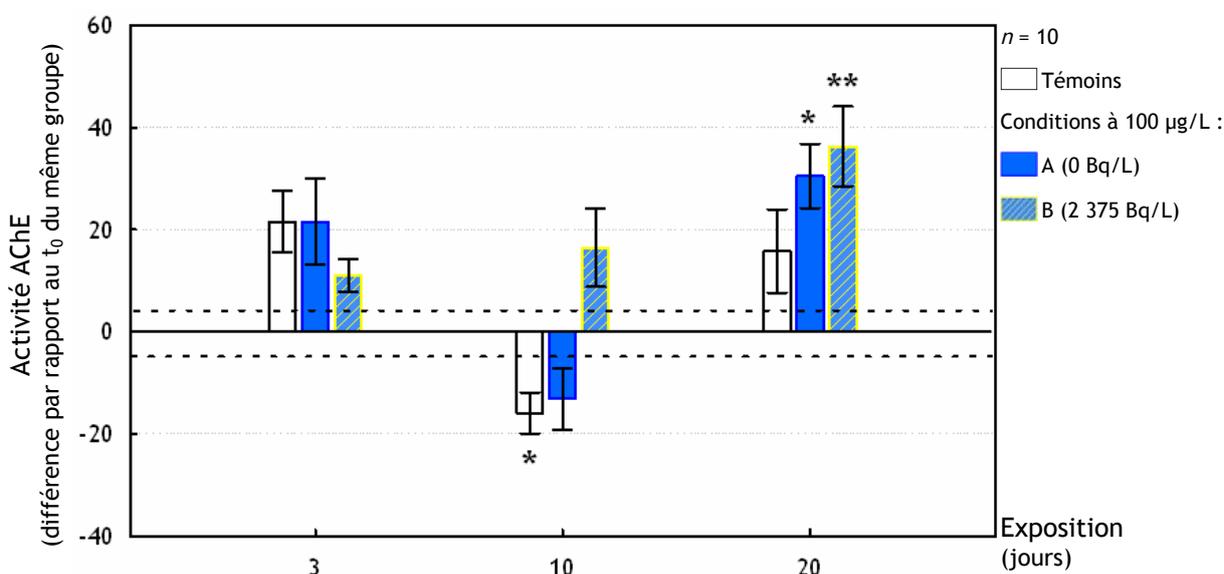


Figure 42. Evolution de l'activité de l'acétylcholinestérase au cours de l'exposition

En effet, si l'on suit l'évolution de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les témoins, on note une légère déplétion après 10 j (à hauteur de 15,9 %). Cette déplétion, même limitée, est significative et oppose les témoins à 10 j aux témoins à 0, 3 et 20 j (Wilcoxon p -values < 0,05 à 0 et 20 j et < 0,001 à 3 j). Par contre, lorsque l'on étudie chez les organismes exposés à l'uranium l'évolution de la différence entre l'activité de l'acétylcholinestérase à un temps donné et l'activité à t_0 , on constate qu'après 20 j, l'activité de cette enzyme est augmentée de 30,5 et 36,3 % chez les organismes exposés à de l'uranium seul ou en mélange avec de l' ^{233}U respectivement (Wilcoxon p -values < 0,05 et 0,001 si l'on compare l'activité à 20 j et celle à t_0). Ces niveaux élevés de l'activité de l'acétylcholinestérase après 20 j s'opposent donc à la relative stabilité des témoins. Nous

pouvons donc en déduire que l'exposition à l'uranium, quelle que soit son activité radiologique, serait capable de moduler l'activité de l'acétylcholinestérase.

3.4 - Etude de la génotoxicité

Suite à un problème survenu pendant le stockage des échantillons sanguins en vue de l'analyse de la génotoxicité, il s'est avéré impossible de procéder à cette dernière. Aucune information concernant le potentiel génotoxique de ces expositions à différentes compositions isotopiques de l'uranium n'a donc pu être obtenue.

3.5 - Observations histologiques

3.5.1 - Tissu gonadique

Les différentes observations des tissus gonadiques issus d'organismes exposés à l'uranium n'ont pas révélé d'altérations particulières au niveau de ce type tissulaire.

3.5.2 - Tissu branchial

Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'anatomie et du fonctionnement de l'appareil branchial, une représentation schématique de la physiologie respiratoire des poissons est proposée en [figure 43](#). Cette représentation est complétée par une observation histologique d'une lamelle vue en coupe transversale dans laquelle sont présentées les diverses structures rencontrées dans les lamelles branchiales ([figure 44](#)).

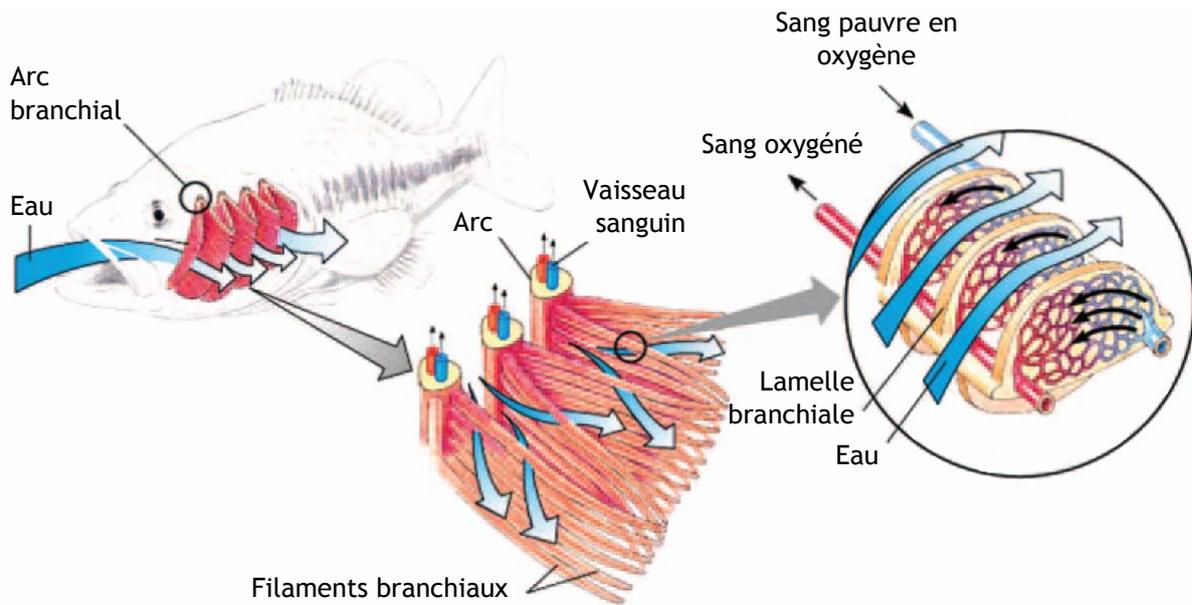


Figure 43. Physiologie respiratoire chez les poissons. L'appareil branchial est constitué de 4 arcs branchiaux. Chacun d'eux supporte deux rangées de filaments dotés de nombreuses lamelles branchiales. Lors de la respiration, le courant d'eau créé par un mouvement coordonné de la bouche et des opercules est dirigé perpendiculairement à l'axe de chaque filament branchial et, par conséquent, orienté parallèlement aux lamelles. Au niveau de ces lamelles, l'irrigation sanguine (constituée d'un ensemble de capillaires) assure un enrichissement en O_2 du sang y circulant. Le sang est ensuite redistribué dans le reste du corps de manière à fournir l'oxygène nécessaire au métabolisme (traduite d'après Evans et al., 2005).

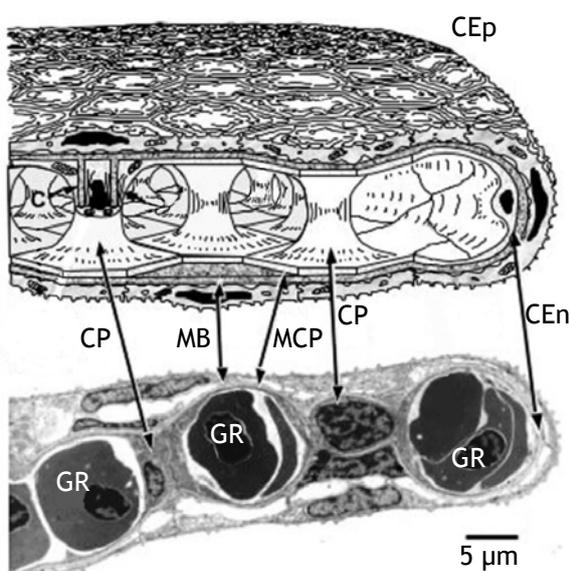


Figure 44. Schéma et observation au MET d'une section transversale d'une lamelle chez un téléostéen. Les cellules piliers (CP), associées à des fibres de collagènes (C), assurent le maintien de la structure. Elles délimitent, par leur membrane (MCP), l'espace dans lequel circulent les globules rouges (GR). La couche marginale est quant à elle formée par des cellules endothéliales (CEn) et épithéliales (CEp) séparées par une membrane basale (MB) (Evans et al., 2005).

L'appareil respiratoire des poissons correspond donc à une arborescence de structures anatomiques aux fonctions particulières.

L'observation microscopique de ces différentes structures a permis de révéler certaines altérations suite à l'exposition à l'uranium, notamment au niveau des lamelles branchiales. Ces endommagements tissulaires (observés à des grossissements de l'ordre de x20 ou x40 sous microscope photonique) sont de nature différente selon que l'on s'intéresse aux individus exposés à l'uranium appauvri seul ou en mélange avec de l' ^{233}U (figure 45). Ainsi, chez un organisme témoin (image du haut), les lamelles branchiales sont disposées de part et d'autre des filaments. L'empilement de cellules qui les constituent apparaît comme relativement homogène et l'épithélium lamellaire semble intact. Suite à l'exposition à 100 $\mu\text{g/L}$ d'uranium appauvri (photographie du milieu), on note l'apparition d'œdèmes au niveau des lamelles (détachement de l'épithélium et de la membrane basale). Le tissu branchial s'en trouve ainsi notablement modifié, les lamelles perdant leur caractère rectiligne et n'étant plus parallèles entre elles. De même, l'empilement des cellules constituant l'axe du filament branchial semblent avoir disparues et la localisation des cellules semble anarchique. Lorsque l'on s'intéresse aux individus exposés au mélange d'uranium appauvri et de ^{233}U , on note une desquamation de l'épithélium lamellaire (par rupture de celui-ci). Tout comme précédemment, l'allure générale du tissu est largement affectée, les lamelles perdant leur aspect rectiligne et leur parallélisme.



Figure 45. Observations au microscope photonique du tissu branchial des organismes après 20 j. De gauche à droite : témoin, U appauvri seul et mélange U appauvri - ^{233}U .

3.5.3 - Tissu musculaire

L'organisation musculaire des poissons est présentée dans les figures 46 et 47.

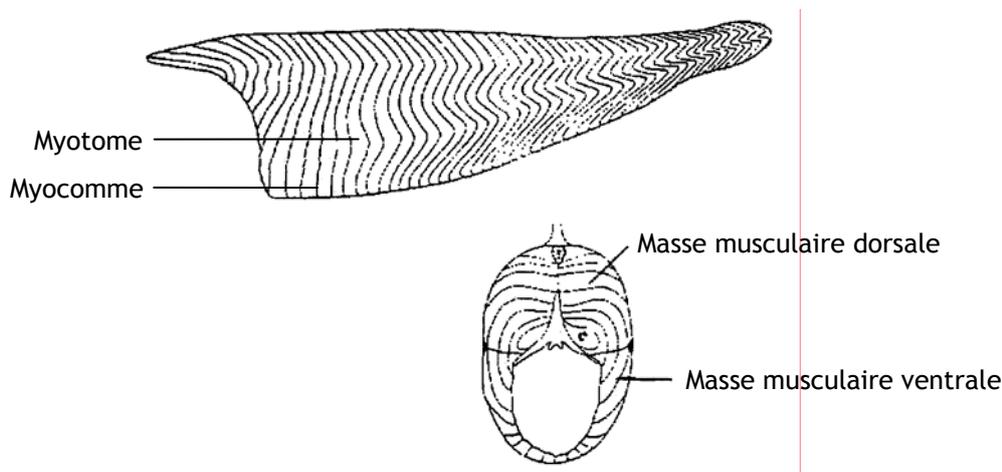


Figure 46. Organisation anatomique du muscle chez le poisson. Le poisson possède des cellules musculaires regroupées en faisceaux appelés myotomes. Elles sont disposées parallèlement les unes aux autres et reliées à des gaines de tissu conjonctif (myocommes). Les myocommes sont quant à eux ancrés au niveau du squelette et de la peau. La masse musculaire, répartie de chaque côté du poisson, constitue le filet dont la partie supérieure est appelée muscle dorsal et la partie inférieure, muscle ventral.

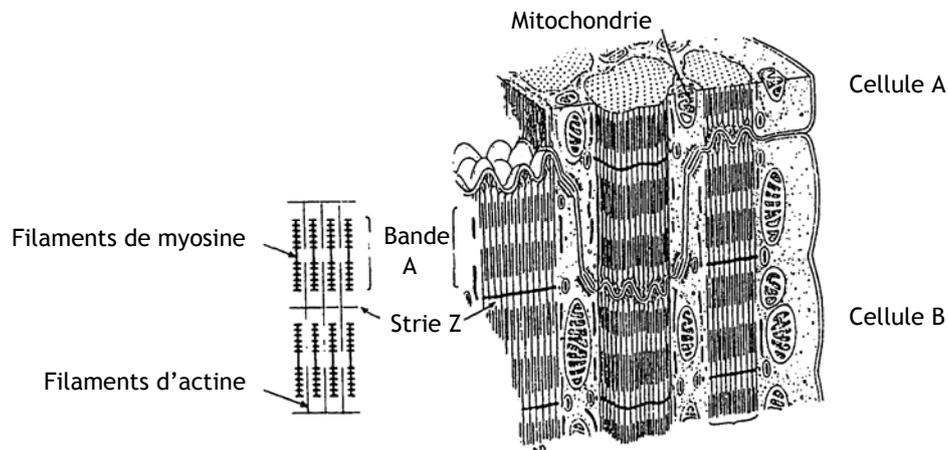


Figure 47. Coupe anatomique montrant les structures cellulaires impliquées dans la contraction musculaire. L'unité fonctionnelle (la cellule musculaire) consiste en un sarcoplasme contenant des noyaux, des grains de glycogène, des mitochondries, etc. ainsi que des myofibrilles. Ces myofibrilles contiennent des protéines contractiles : actine et myosine qui sont disposées dans un système caractéristique d'alternance de sorte qu'elles confèrent au tissu un aspect strié.

L'examen de ce tissu dans le cadre de notre présente étude a conduit à différentes constatations. Comme présenté dans la **figure 48**, nous pouvons voir qu'une exposition de 20 j à 100 µg/L d'uranium appauvri induit une désorganisation des structures tissulaires impliquées dans la contraction musculaire. On assiste en effet à une déstructuration des myofibrilles.

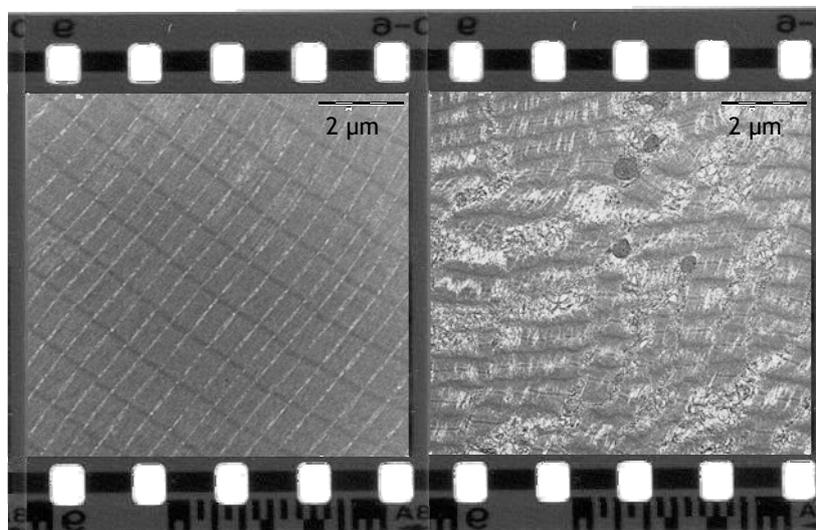


Figure 48. Observations réalisées au microscope électronique à transmission du tissu musculaire après 20 j d'exposition. *De gauche à droite* : témoin, exposé à 100 µg/L d'U appauvri.

A la différence de cette altération ultrastructurale du tissu musculaire, l'exposition au mélange d'uranium appauvri et d'²³³U sur la même période (20 j) induit des effets plus "macroscopiques" dans le sens où l'échelle à laquelle sont observés ces effets ne concerne plus les myofibrilles mais les faisceaux de cellules musculaires apparaissent désorganisés (*cf.* **figure 49**). On retrouve ainsi des mitochondries non plus en périphérie de ces faisceaux mais insérées au sein de ces derniers. Il en est de même pour les cristaux de calcium (qui apparaissent en noir sur les images) dont la localisation et l'abondance sont notablement modifiées.

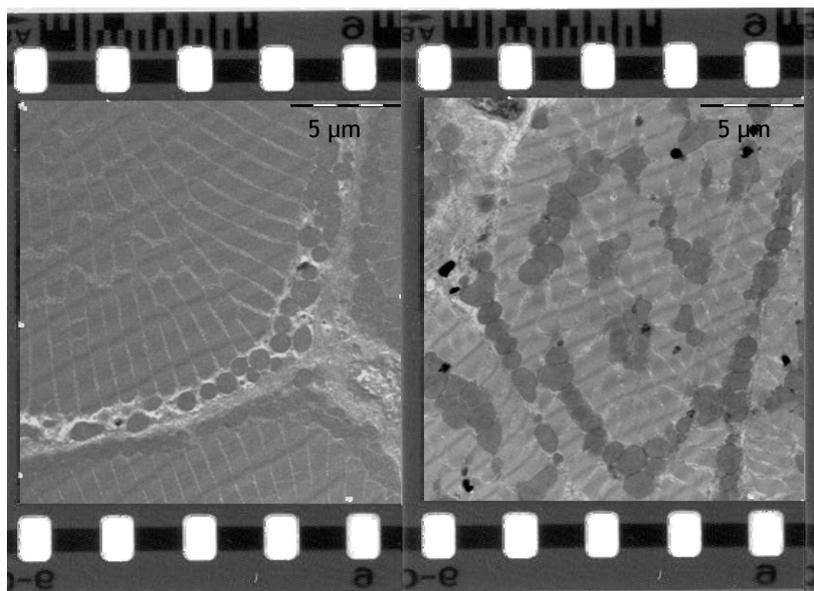


Figure 49. Observations réalisées au microscope électronique à transmission du tissu musculaire après 20 j d'exposition. De gauche à droite : témoin, exposé au mélange U appauvri - ^{233}U .

4 - EVALUATION DE LA PART RELATIVE DES TOXICITES CHIMIQUE ET RADIOLOGIQUE (2)

Du fait de la perte des échantillons sanguins destinés aux mesures de génotoxicité dans le cadre de l'expérimentation précédemment abordée, une seconde expérimentation portant sur l'étude de la part relative des toxicités chimique et radiologique de l'uranium a donc été menée. Le plan d'expérience est donc très proche de celui précédemment décrit (*cf.* fiche signalétique présentée par le [tableau XIII](#)), de manière à pouvoir compléter les résultats de chacune des expérimentations.

Le suivi de la contamination tout au long de cette expérimentation est présentée en [annexe E1](#) de ce document.

Tableau XIII. Fiche signalétique relative à l'évaluation des toxicités chimique et radiologique (2)

Objectif	Etude de la part relative des effets induits chimiquement et radiologiquement par l'uranium sur les paramètres de génotoxicité et d'histopathologie		
Conditions expérimentales testées	Pression chimique	3 conditions	0 - 20 - 100 µg/L
	Pression radiologique	4 conditions	0 - 237* - 2 375 - 7150 Bq/L
	Durée d'exposition	4 conditions	0** - 3 - 10 et 20 j
Analyses réalisées	Paramètres de génotoxicité	Tissus : gonades, foie, sang	Intégrité de l'ADN, dommages oxydatifs à l'ADN
	Observations histologiques	Organes divers	Gonades, branchies, muscle, cerveau
Réplicats par condition (n)	n = 5 (1 individu par réplicat) pour les mesures de génotoxicité dans le foie et les gonades	320 organismes au total	
	n = 10 (1 individu par réplicat) pour les mesures de génotoxicité dans le sang		
	n = 3 (1 individu par réplicat) pour les observations histologiques		
Remarques	<p>* : La condition 237 Bq/L n'a été investiguée que pour une concentration massique de 20 µg/L</p> <p>** : Pour cette expérimentation, l'acclimatation des organismes a été réalisée au sein du système d'exposition, les poissons ayant été répartis dans les huit bacs d'exposition représentant chacune des conditions d'exposition à l'uranium. A t = 0, les mesures de génotoxicité ont donc concerné huit groupes d'individus issus de chacune des populations ainsi formées.</p>		

4.1 - Etude de la génotoxicité

Les données brutes ainsi que le traitement statistique réalisé sont exposés en [annexe E2](#).

Lors de cette expérimentation, la version modifiée de l'essai des comètes visant à détecter les dommages oxydatifs portés à l'ADN (protocoles incluant une étape d'incubation avec des enzymes de réparation) a été pratiquée. Néanmoins, aucun des résultats obtenus n'a permis de révéler la présence de dommages oxydatifs par ce biais. C'est pourquoi nous n'aborderons pas cet aspect de l'expérimentation dans ce chapitre.

4.1.1 - Tissu sanguin

4.1.1.1 - Mesures de la génotoxicité par l'essai des comètes

Les résultats obtenus à l'issue de l'analyse des érythrocytes par l'essai des comètes sont présentés en [figure 50](#).

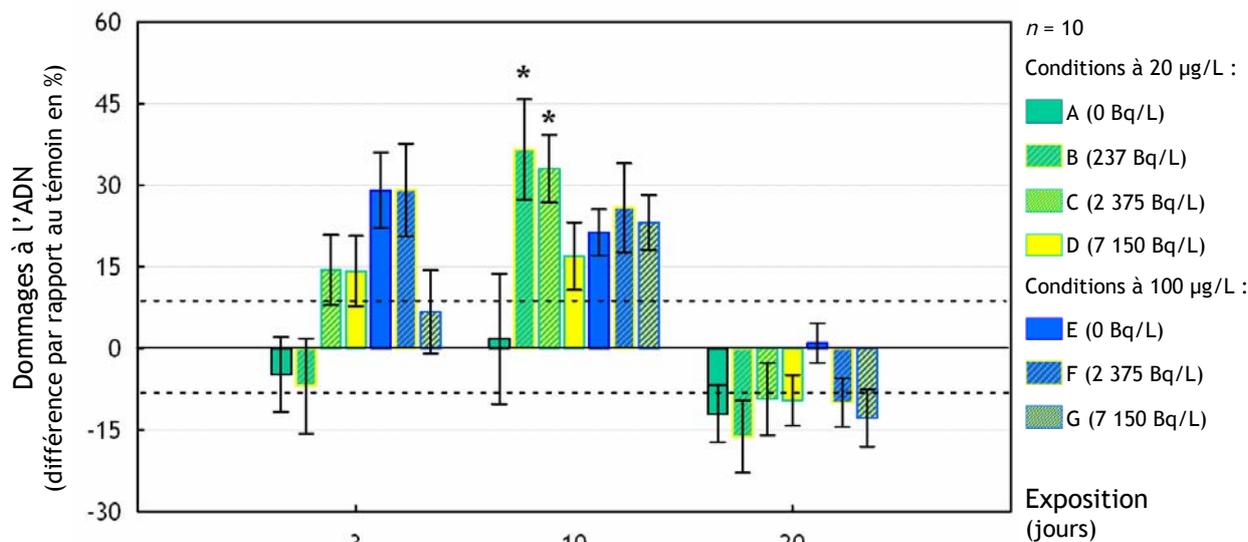


Figure 50. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (Résultats obtenus par le biais de l'essai des comètes en version alcaline. Paramètre retenu : "mean tail length", soit la longueur moyenne de la queue des comètes)

Après 3 j d'exposition, des altérations du matériel génétique tendent à apparaître. Ainsi, chez les poissons exposés à 100 µg/L d'uranium total et à une activité radiologique nulle ou faible (conditions E et F) on observe une tendance à l'augmentation (Dunnnett p -values $\leq 0,1$) par rapport

aux organismes témoins. Cette augmentation est similaire pour les deux conditions d'exposition et s'élève à 29 %. Cette tendance n'est pas retrouvée chez les organismes exposés à la même quantité d'uranium total (100 µg/L) mais à une activité radiologique plus importante (condition G).

Après 10 j, la même tendance est constatée pour la concentration en uranium total la plus faible (20 µg/L). A nouveau, un effet génotoxique est observé chez les poissons exposés à des activités radiologiques faibles (conditions B et C) mais pas chez ceux exposés à une activité radiologique plus importante. Cette augmentation du niveau de dommages dans les érythrocytes chez les organismes des groupes B et C est de l'ordre de 35 % (Dunnett p -values < 0,05).

Après 20 j, plus aucune manifestation génotoxique n'est constatée par l'essai des comètes au niveau du tissu sanguin.

4.1.1.2 - Mesures de la génotoxicité par la cytométrie en flux

Les résultats obtenus par l'analyse cytométrique sont présentés dans la [figure 51](#).

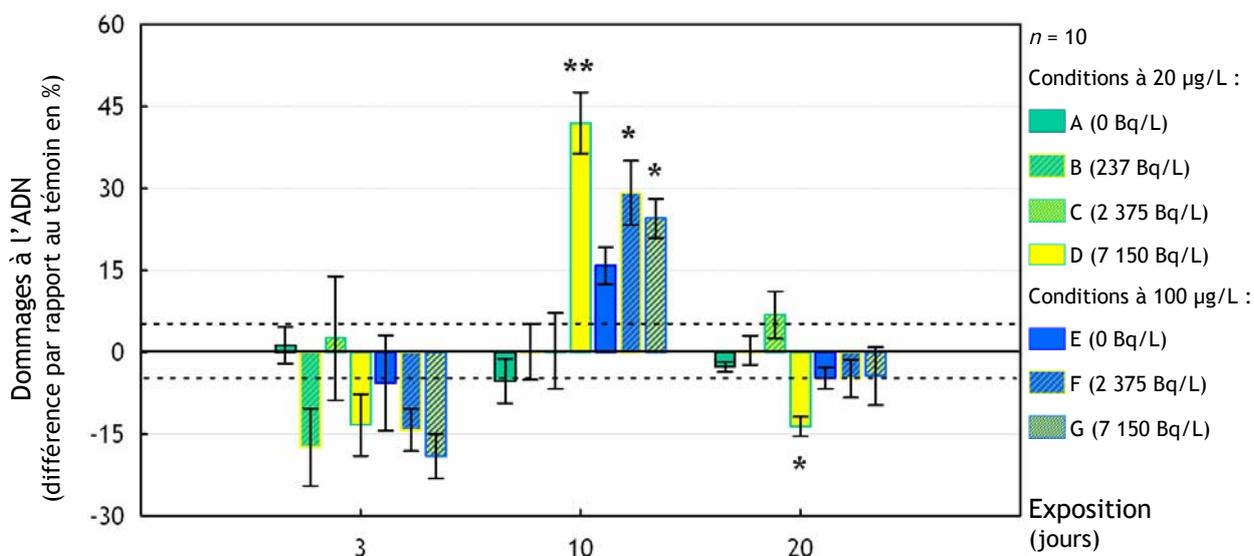


Figure 51. Evolution de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire au cours de l'exposition (Résultats obtenus par le biais de la cytométrie en flux. Paramètre retenu : "FSC mean" soit le diamètre moyen des nucléoïdes)

Les premiers effets significatifs sont observés après 10 j (ANOVA p -value < 0,001). On observe alors une augmentation significative du niveau de dommages à l'ADN chez les organismes exposés, de façon générale, à de fortes activités radiologiques.

Ainsi, une augmentation significative des dommages à l'ADN est constatée chez les poissons exposés à 7 150 Bq/L quelle que soit la concentration massique en uranium (conditions D et G) ainsi que chez les poissons exposés à 2 375 Bq/L pour une concentration totale en uranium de 100 µg/L (condition F). Cette augmentation par rapport au témoin atteint 41 % pour la condition D (Dunnett p -value < 0,001), 29 et 24 % pour les conditions F et G respectivement ((Dunnett p -values < 0,05).

Après 20j, une seule condition expérimentale induit un effet significatif mis en évidence par la cytométrie. Cet effet prend la forme d'une diminution significative de la taille des nucléoïdes (Dunnett p -value \leq 0,05) chez les organismes exposés à 20 µg/L d'uranium et 7 150 Bq/L (condition D).

4.1.2 - Tissu hépatique

Lorsque l'on s'intéresse au tissu hépatique (dont l'intégrité du matériel génétique a uniquement été investiguée par l'essai des comètes, [figure 52](#)).

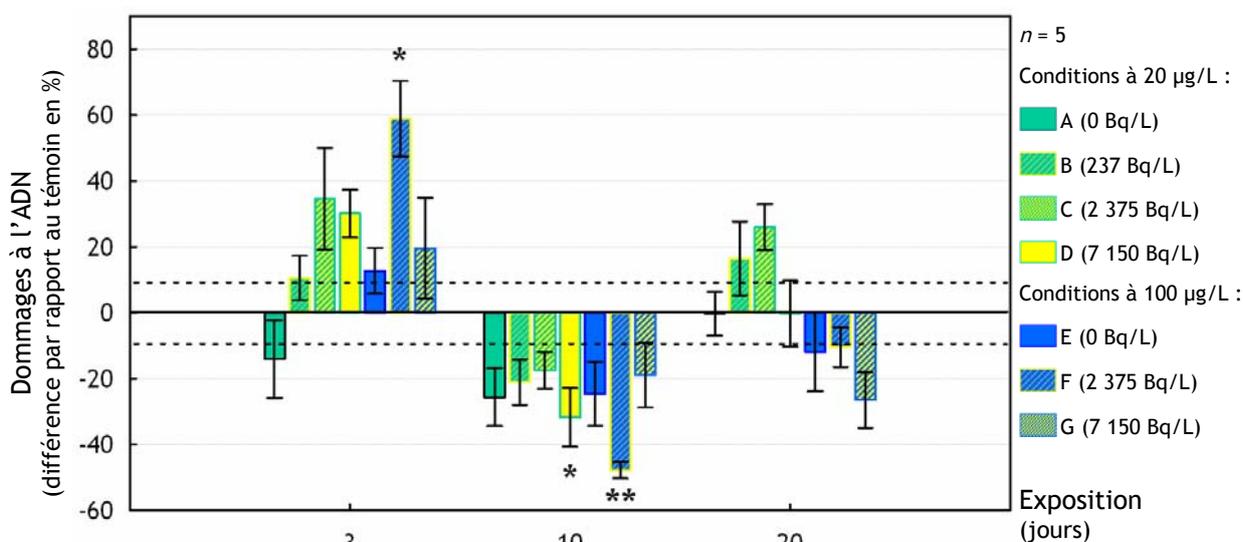


Figure 52. Evolution de l'intégrité de l'ADN des cellules hépatiques. (Paramètre retenu : "mean tail length", soit la longueur moyenne de la queue des comètes)

On remarque que des évènements génotoxiques apparaissent dès 3 j.

La condition expérimentale qui semble la plus drastique vis-à-vis de l'intégrité du matériel génétique des cellules hépatiques est la condition F (100 µg/L d'uranium total et 2 375 Bq/L d'activité radiologique). Les poissons exposés à cette condition présentent en effet un taux de dommages de l'ADN hépatocytaire 59 % plus élevé que les témoins (Tukey HSD p -value < 0,05).

A 10 j, on constate une diminution de la longueur moyenne des queues de comètes obtenues à partir d'individus issus des groupes D et F. Cette diminution significative par rapport aux témoins (Dunnett p -values < 0,05 et 0,001 respectivement) s'élève à 32 % chez les organismes exposés à la condition D et 48 % chez ceux exposés à la condition F.

4.1.3 - Tissu gonadique

Seule la durée d'exposition la plus importante (20 j) a permis d'induire des dommages génotoxiques au niveau des gonades (ANOVA p -value < 0,001) (figure 53).

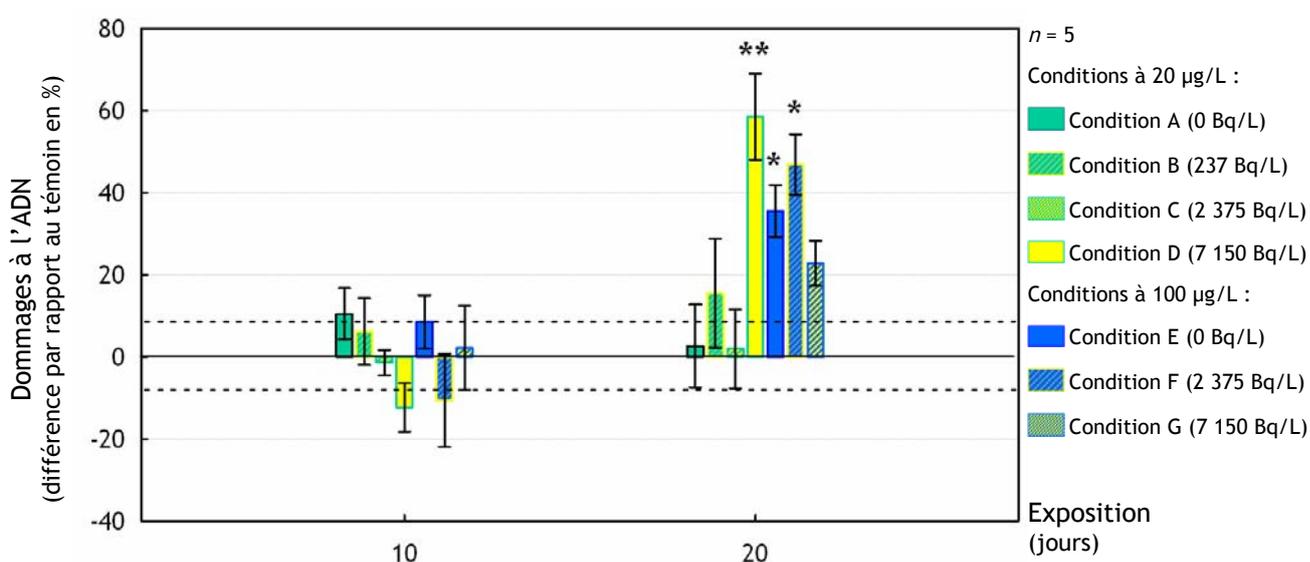


Figure 53. Evolution de l'intégrité de l'ADN des cellules gonadiques au cours de l'exposition (paramètre retenu : "mean tail length", soit la longueur moyenne de la queue des comètes).

On constate une augmentation significative du niveau de dommages à l'ADN chez les organismes exposés, de façon générale, aux conditions les plus drastiques (concentrations et/ou activités radiologiques les plus importantes). Ainsi, une augmentation significative des dommages à l'ADN est observée chez les poissons exposés à seulement 20 µg/L mais à 7 150 Bq/L (conditions D) ainsi que chez les poissons exposés à une de 100 µg/L et des activités radiologiques faibles voire nulles (conditions E et F). Cette augmentation par rapport au témoin atteint 59 % pour la condition D (Dunnett p -value < 0,001), 36 et 47 % pour les conditions E et F respectivement ((Dunnett p -values < 0,05). Étonnamment, cette augmentation du niveau de dommages n'est pas constatée chez les individus soumis à la condition G alliant une concentration en uranium importante (100 µg/L) et une forte activité radiologique (7 150 Bq/L).

4.2 - Observations histologiques

Analyse en cours...

SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS

Au cours des différentes expérimentations menées, nous avons pu révéler certains aspects du comportement toxicocinétique ainsi que de la toxicité de l'uranium envers les poissons.

Du point de vue toxicocinétique, nous avons pu voir que l'uranium est fortement bioaccumulé et bioconcentré par les poissons. Il s'accumule préférentiellement dans les branchies et le foie mais peut également atteindre l'ensemble des tissus (et notamment le squelette, le cerveau et les gonades).

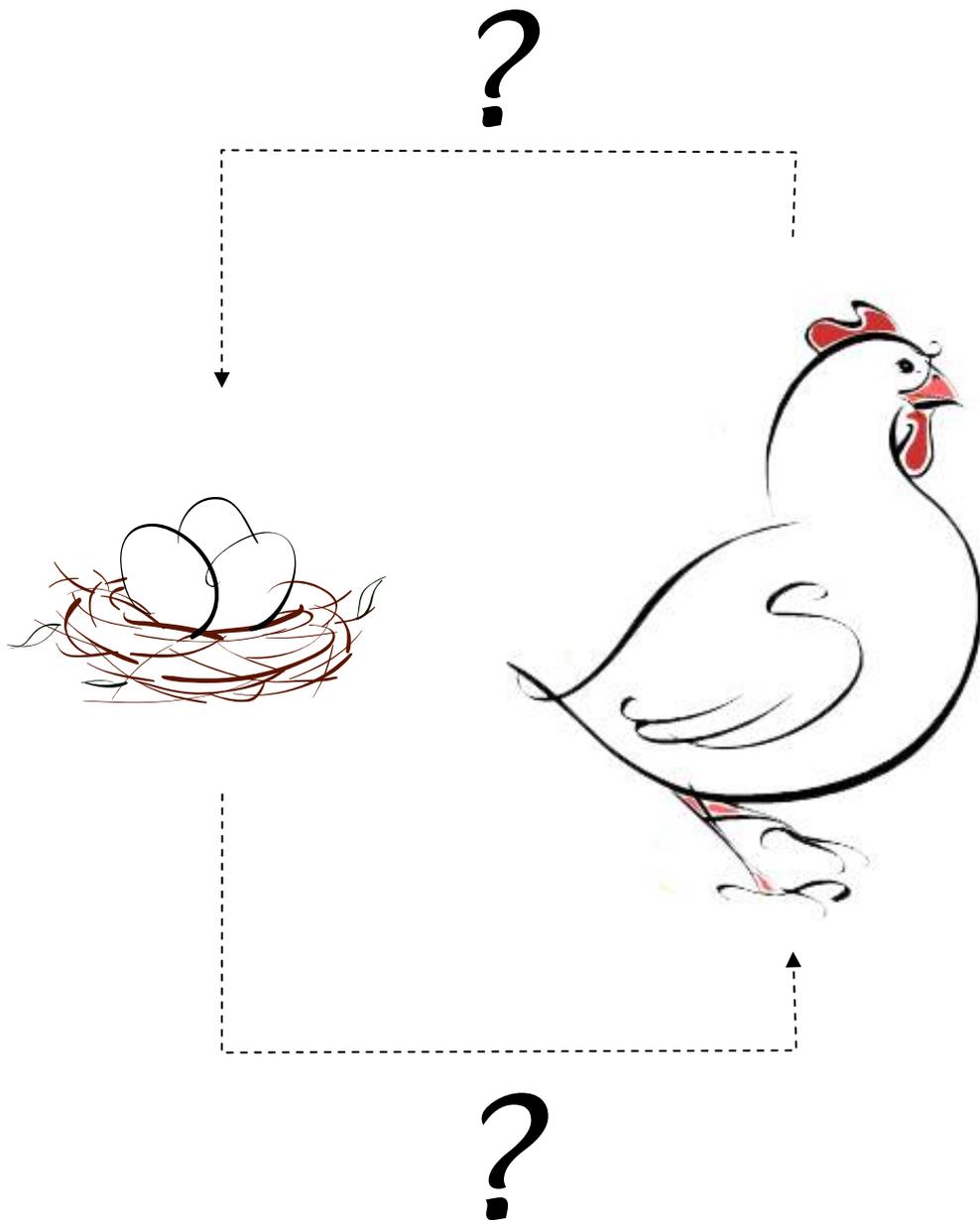
Du point de vue toxicologique, il est de surcroît capable d'induire :

- (1) un stress oxydant au niveau hépatique (inhibition des activités SOD, CAT et GPx et déplétion de la quantité de GShtot) ;
- (2) des modulations de l'activité AChE cérébrale ;
- (3) l'altération de l'intégrité du matériel génétique de certains types cellulaires (érythrocytes, hépatocytes et cellules gonadiques) ;
- (4) ainsi que la formation de pathologies tissulaires (du moins au niveau branchial et musculaire).

A cela, nous pouvons également ajouter que l'activité radiologique présentée par l'uranium semble influencer sur ces caractéristiques (aussi bien toxicocinétiques que toxicologiques), jouant notamment un rôle sur la cinétique des effets observés. Dans le cas de l'exposition des organismes à des activités radiologiques significatives (mélanges d'uranium appauvri et d'²³³U), nous avons ainsi pu observer :

- (1) une baisse transitoire de l'accumulation à l'échelle de l'organisme entier,
- (2) une concentration de l'élément plus importante dans les tissus gonadiques
- (3) des inhibitions enzymatiques plus précoces que celles induites chimiquement mais généralement observées de façon transitoire
- (4) des manifestations génotoxiques ainsi que des pathologies tissulaires sensiblement différentes de celles observées uniquement sous l'effet chimiotoxique de l'uranium.

DISCUSSION



DISCUSSION

1 - INFLUENCE DE LA DUREE D'ACCLIMATATION ET DU SEXE

Afin de conforter certains choix expérimentaux, nous avons dû procéder à une étude portant sur l'influence de deux paramètres susceptibles d'influer sur le résultat des études de toxicité : la durée d'acclimatation précédant les phases d'exposition et le sexe des individus.

Au travers de cette étude, nous avons montré que certains paramètres du stress oxydant peuvent évoluer au cours de l'acclimatation des organismes au sein du système expérimental utilisé. Les valeurs basales des paramètres utilisés comme variables biologiques (activités enzymatiques, quantité de glutathion total) ont été, pour trois des quatre biomarqueurs, les mêmes après 2 ou 4 semaines. En effet, l'activité de la CAT ainsi que la quantité de GShtot n'ont pas évolué au cours du temps. L'activité de la SOD a quant à elle augmenté entre 2 et 3 semaines mais, après 4 semaines, a retrouvé un niveau comparable à celui observé à 2 semaines. Enfin l'activité de la GPx a montré une augmentation progressive au cours du temps (notre étude n'ayant pas permis de déterminer si une stabilisation était susceptible de survenir après une acclimatation plus importante). Nous avons donc fait le choix de conserver une durée d'acclimatation de 2 semaines, durée retenue par de nombreux auteurs. Dans l'éventualité du constat d'une variation d'un paramètre chez les témoins lors des phases d'exposition à l'uranium, nous devons donc tenir compte de cette évolution et limiter notre analyse au suivi de l'effet de la pression de contamination en uranium (concentration massique et/ou activité radiologique) et exclure l'étude de l'effet de la durée d'exposition.

Ces résultats montrent que le suivi des paramètres du stress oxydant est complexe et expose l'expérimentateur à de nombreuses difficultés quant à l'interprétation des résultats obtenus. Ainsi, du fait même du changement occasionné par l'arrivée et le maintien des organismes au laboratoire, les marqueurs de stress oxydant peuvent subir des modulations. Ceci suppose donc qu'un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas induire de facteurs de confusion pouvant conduire à la formulation de conclusions erronées.

L'influence du sexe des organismes sur l'activité des enzymes antioxydantes n'a fait l'objet que de peu d'études écotoxicologiques. Néanmoins, il a été suggéré que le sexe de même que l'âge des individus peuvent être des paramètres importants à considérer lorsque l'on s'intéresse au suivi d'activités métaboliques. [Winzer et al. \(2001\)](#) ont ainsi noté l'existence d'une différence de réponse liée au sexe sur des cultures primaires d'hépatocytes de flet (*Platichthys flesus*) exposées au benzo[a]pyrène, un agent chimique capable d'induire une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène. Les auteurs ont ainsi constaté, quel que soit le sexe des individus dont ont été extraites les cellules primaires, une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, de la peroxydation lipidique, ainsi que de la capacité cellulaire antioxydante totale (estimée par le biais du "total oxidant-scavenging capacity assay"). Néanmoins, une différence dans les niveaux de ces réponses a été enregistrée entre les sexes, soulignant l'influence de ce paramètre sur les voies métaboliques activées lors d'une contamination au B[a]P.

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas pu établir clairement de lien entre le sexe des organismes et les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes suivies. Il en a été de même pour d'autres auteurs ([Hansen et al., 2006a,b](#)). Néanmoins, afin de s'affranchir d'un biais expérimental possible du fait des perturbations physiologiques importantes engendrées par le cycle reproducteur chez les femelles, il a été décidé de n'intégrer que des individus mâles à nos expérimentations.

2 - TOXICOCINETIQUE DE L'URANIUM

2.1 - Suivi de la bioaccumulation à l'échelle des organismes entiers

Dans ce paragraphe, nous discuterons des résultats obtenus dans le cadre du suivi de la bioaccumulation de l'uranium en nous intéressant successivement à différents aspects des jeux de données obtenus. Nous nous intéresserons dans un premier temps à l'étude de la variabilité interindividuelle (qui s'est avérée très importante dans notre étude). Nous discuterons ensuite des résultats obtenus dans le cadre d'expositions de faibles niveaux (avec notamment le problème posé par la limite de quantification). A la suite de cela, nous nous attarderons sur la relation qui existe entre "bioaccumulation" et "concentration d'exposition", et discuterons de son caractère non linéaire. Enfin, nous nous intéresserons successivement à l'examen des capacités de

bioconcentration de l'uranium chez *Danio rerio* ainsi qu'à l'influence de l'activité radiologique de l'uranium sur ces capacités.

2.1.1 - Etude de la variabilité interindividuelle

Concernant l'étude des données brutes issues des analyses de bioaccumulation, il transparaît clairement que la variabilité interindividuelle est très importante. En effet, les écarts-types observés peuvent aller jusqu'à dépasser la valeur moyenne des données. Ce facteur est donc crucial à prendre en compte dans les études, notamment parce qu'il pourrait expliquer la variabilité interindividuelle de paramètres utilisés comme biomarqueurs de toxicité.

Pour de nombreux organismes, les niveaux d'accumulation de substances toxiques reflètent les niveaux d'exposition auxquels ils sont soumis. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Des facteurs tels que la taille des individus, leur sexe, leur taux de croissance, les cycles saisonniers et/ou reproducteurs ou encore la salinité peuvent en effet influencer sur les processus de bioaccumulation (Lobel et al., 1991). Ainsi, pour un groupe d'organismes issus d'une même population, la distribution des fréquences associées aux concentrations d'un élément dans un tissu donné est rarement décrite par une loi normale (gaussienne). De même, la variabilité interindividuelle peut varier d'une population à une autre.

L'étude de Lobel et al. (1992) présente une synthèse des caractéristiques générales de ce type de distribution de fréquence en se basant sur l'étude de différents éléments dont l'accumulation a été mesurée par spectrométrie de masse (ICP-MS) dans 11 tissus biologiques différents (corps entier, foie, glande digestive ou encore branchies) issus d'organismes collectés dans des eaux non polluées. Cette étude a eu pour but d'évaluer la variabilité des concentrations tissulaires rencontrées, et notamment d'étudier la variabilité dite "résiduelle". Lobel et al. définissent cette variabilité résiduelle comme la part de la variabilité ne pouvant être expliquée ni par l'état physiologique des organismes ni par des facteurs environnementaux, ni par quelque autre source de variabilité (taille, sexe, condition, différences taxonomiques, etc.). Des analyses ont ainsi été réalisées chez la moule (*Mytilus edulis*), le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*), deux espèces de poissons marins : le capelan (*Mallotus villosus*) et la loquette d'Amérique (*Macrozoarces americanus*), et deux espèces de poissons dulçaquicoles : le saumon (*Salmo salar*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) collectés *in situ* ou maintenus au laboratoire. Au travers de l'étude,

27 éléments ont été analysés : 5 métaux alcalins du groupe I (Li, Na, K, Rb et Cs), 4 métaux alcalins du groupe II (Mg, Ca, Sr et Ba), 12 métaux lourds (Al, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Ag, Cd, Sb, Pb), des éléments rares et des actinides (Y, La, Ce, U) et des éléments non métalliques (Bo, As, Se). Dans l'ensemble, les distributions de fréquence ont été caractérisées par une importante variabilité interindividuelle ainsi qu'une asymétrie positive (une large majorité des organismes présente de faibles concentrations tissulaires, seuls quelques uns présentent des concentrations anormalement élevées). Il est également apparu qu'une forte corrélation lie la variabilité et l'asymétrie des distributions. Ceci indique donc que l'accroissement de la variabilité est essentiellement le fait de la présence d'individus en faible nombre présentant des concentrations tissulaires anormalement élevées. Lobel et al. précisent également que les niveaux les plus élevés de variabilité et d'asymétrie ont été trouvés pour les métaux lourds ainsi que les actinides et autres éléments rares.

Cette étude de Lobel et al. (1992) confirme bien nos résultats, ainsi que ceux obtenus par d'autres auteurs s'étant intéressés à la bioaccumulation de l'uranium chez le poisson (Poston, 1982 ; Swanson, 1985 ; Clulow et al., 1998 ; Bettinelli et al., 2004).

Il est donc intéressant de s'interroger sur les causes possibles de cette variabilité et de cette asymétrie dans les jeux de données. L'étude de Lobel et al. (1992) apporte quelques pistes d'interprétation en ce sens. En effet, ces auteurs ont mis en évidence le fait qu'il existe une corrélation positive entre l'asymétrie de la distribution, la variabilité interindividuelle et la propension d'un élément à être stocké sous une forme insoluble au sein des tissus biologiques. Il apparaît en effet que les éléments accumulés principalement sous une forme insoluble dans les tissus voient leurs courbes de distribution de fréquence caractérisées par une variabilité et une asymétrie plus importante que celles des éléments majoritairement retrouvés dans les tissus sous une forme soluble. Les auteurs rapprochent cette conclusion avec le fait que, au sein d'une population caractérisée en majorité par de faibles concentrations internes, l'observation de concentrations tissulaires anormalement élevées chez quelques individus serait le fait d'une capacité de ces derniers à accumuler l'élément sous la forme d'amas insolubles hautement concentrés. Par exemple, les auteurs font référence au fait que des précipités solides d'éléments toxiques tels que l'aluminium, le zinc, le plomb ou encore l'uranium sont retrouvés dans les organismes, notamment au niveau du foie, tissu connu pour ses capacités d'accumulation importantes (Lobel et al., 1991). Lobel et al. (1991) expliquent que les éléments stockés sous cette

forme insoluble sont ainsi séquestrés au sein d'une matrice tridimensionnelle abaissant leur possibilité d'interaction avec les biomolécules du cytosol. Il s'agirait donc ici d'un mécanisme visant à abaisser la toxicité d'un élément internalisé. Dans le cadre de notre travail, nous avons réalisé une étude de microlocalisation (passage d'une sonde EDX couplée au MET). Par le biais de cette étude, nous avons effectivement détecté la présence d'uranium sous une forme insoluble au niveau du tissu branchial. Nos résultats semblent donc aller dans le sens des conclusions de [Lobel et al.](#). L'étude de la variabilité interindividuelle de données de bioaccumulation pourrait donc constituer une approche très intéressante dans le cadre de la compréhension de processus importants en écotoxicologie, notamment des processus de bioaccumulation.

2.1.2 - Cas des faibles niveaux d'exposition

Lors de la toute première expérimentation menée dans le cadre de notre travail, un suivi de la bioaccumulation a été réalisé dès les toutes premières heures de contact avec l'uranium. L'examen des concentrations tissulaires en uranium a ainsi permis de constater une accumulation de l'élément pour l'ensemble des cas de figure investigués. Néanmoins pour la condition d'exposition la plus "faible" parmi celles testées (0,5 j d'exposition à 20 µg/L d'uranium appauvri), les mesures de concentrations tissulaires n'ont permis de détecter de l'uranium que dans un seul des 10 organismes ayant subi une telle exposition. Il serait donc intéressant de déterminer la limite de quantification de l'appareillage employé (en terme de concentration tissulaire minimale) afin de déterminer si l'absence de résultat significatifs chez certains individus pourrait être attribuable à une limite de détection trop élevée.

Les mesures de bioaccumulation à l'échelle de l'organisme entier ont été réalisées par ICP-AES, dont la limite de détection est de 10 µg/L d'uranium pour des matrices complexes (c'est-à-dire très chargées en éléments majeurs comme les ions Ca^{2+}) telles que nos solutions acides obtenues à l'issue de la minéralisation des échantillons biologiques. Pour cette analyse, on dispose de 5 mL de minéralisat obtenu à partir d'organismes dont le poids moyen, pour cette étude, était de l'ordre de 270 mg. Ceci suppose que, par cette technique, la limite de détection de l'uranium soit de 185 ng/g de tissus frais dans les chairs de poisson. Dans le cas du seul individu chez lequel de l'uranium a été retrouvé, la concentration tissulaire mesurée était de 192 ng/g de tissus. Nous pouvons donc supposer que, dans le cas des 9 autres individus, une accumulation a effectivement eu lieu mais à

des niveaux ne permettant pas leur quantification, nous laissant suggérer qu'une exposition aussi faible que 0,5 j à 20 µg/L est suffisante pour qu'une accumulation d'uranium ait lieu dans les organismes.

2.1.3 - Relation entre bioaccumulation et concentration d'exposition

Au cours de notre étude, nous avons pu voir que l'accumulation en uranium n'était pas directement proportionnelle à la concentration de l'élément dans l'eau d'exposition. Par exemple, nous avons constaté des niveaux d'accumulation similaires chez les organismes exposés durant 20 j à 20, 100 ou 500 µg/L d'uranium appauvri.

Pour expliquer cette absence de linéarité de la relation "bioconcentration = f ([U_{eau}])", certains auteurs suggèrent que des phénomènes d'acclimatation pourraient être mis en place par les poissons. Pour comprendre ces mécanismes, il faut se pencher sur les caractéristiques de l'interaction entre un métal et l'appareil branchial des poissons. Cette interaction a fait l'objet de nombreuses études et a même été décrite au travers de différents modèles dont le plus connu est sans nul doute le modèle du ligand biologique (BLM, cf. § 4.4.3.1 du chapitre relatif à l'état de l'art sur l'uranium). Or, le cadre conceptuel adopté à propos du BLM considère que la toxicité des métaux survient à la suite de la fixation de l'ion libre à des sites d'action physiologiquement actifs présents à la surface des organismes aquatiques : les ligands biotiques (les branchies par exemple). Ces sites actifs, toujours selon le modèle du BLM, seraient caractérisés par deux constantes : la première représentant l'affinité du ligand envers l'ion libre ($\log K$) et la seconde faisant référence à la densité des ligands (B_{\max}) (Pagenkopf, 1983). Si l'on se place du point de vue de ce modèle, une relation de proportionnalité devrait s'établir entre niveau d'exposition et niveau d'accumulation. Or, cela n'est pas le cas dans notre étude et c'est également ce que certains auteurs "reprochent" au modèle du BLM, suggérant que les propriétés de l'interaction entre un métal et l'appareil branchial des organismes aquatiques seraient régies par des paramètres variables et non des paramètres fixes (Niyogi et Wood, 2003).

Les auteurs qui préconisent l'introduction dans ce modèle de paramètres variables soulignent notamment l'influence de facteurs liés à l'eau ou même à la composition de l'alimentation des organismes. Des mécanismes d'acclimatation peuvent ainsi être mis en place par les organismes lors de changements de dureté de l'eau, d'une exposition chronique aux métaux *via*

l'eau ou la nourriture, ou encore selon la qualité de leur alimentation (apports en ions essentiels tels que les ions sodiques et calciques). Par exemple, [Niyogi et Wood \(2003\)](#) font référence à des études menées sur le cuivre, le cadmium et le zinc dans lesquelles il a été montré que les caractéristiques des sites de prise en charge des métaux peuvent varier. Ainsi, chez des truites exposées à de faibles concentrations de métaux, les sites démontrés comme étant physiologiquement actifs sont caractérisés par une forte affinité (fort \log_k) mais de faibles capacités de fixation (faible B_{\max}), alors qu'à des niveaux d'exposition supérieurs, les sites sur lesquels vont se fixer les métaux sont caractérisés par une faible affinité et de fortes capacités de fixation. Il a été montré que les premiers sites mentionnés ne représentent qu'une faible fraction des sites totaux et sont saturables dans une gamme de concentrations de cuivre réalistes du point de vue environnemental. Ces sites de fixation physiologiquement actifs sont ceux qui sont directement impliqués dans les processus d'ionorégulation. A l'inverse, le second type évoqué n'est pas spécifique du cuivre (d'où sa faible affinité), non saturable et ne contribue pas à sa prise en charge. Ces changements dans les sites de fixation dédiés à la prise en charge des métaux lors d'une contamination constitueraient donc un mécanisme d'acclimatation. De même, l'apport alimentaire d'ions essentiels avec lesquels les métaux peuvent entrer en compétition (par exemple Na^+ , Ca^{2+}) peut influencer sur l'absorption de ces derniers.

Dans le cas de l'uranium, on peut donc s'attendre à ce que l'internalisation de ce radioélément ne soit pas uniquement dépendante de la quantité d'ion libre dans le milieu, et que des mécanismes d'acclimatation puissent être mis en place. L'explication du ralentissement observé au niveau de la bioaccumulation chez les organismes exposés aux plus fortes concentrations tiendrait alors au fait que les sites de prise en charge de l'uranium verraient leurs caractéristiques d'affinité et de densité évoluer au cours de l'exposition.

2.1.4 - Etude des capacités de bioaccumulation et de bioconcentration

Au travers de notre étude, nous avons également montré que le poisson zèbre est doté de facultés importantes de bioaccumulation et de bioconcentration de l'uranium. Les concentrations tissulaires mesurées dans les organismes après 20 j d'exposition à l'uranium se sont en effet avérées très importantes. Elles sont en effet comprises entre 30 et 50 $\mu\text{g/g}$ de tissus frais en moyenne (correspondant à des BCF compris entre 100 et 1000), avec des valeurs pouvant aller jusqu'à 80

µg/g pour les individus exposés à 20 et 100 µg/L d'uranium et 170 µg/g pour ceux exposés à 500 µg/L. Ces valeurs semblent comprises dans la gamme de celles citées dans la littérature obtenues lors d'études s'intéressant à des poissons collectés *in situ* ou exposés au laboratoire.

[Mahon \(1982\)](#) s'est intéressé aux organismes exposés *in situ* à des niveaux élevés de radionucléides de façon naturelle. Des mesures de concentration en uranium naturel présent dans l'eau, les sédiments, et différents acteurs de la chaîne trophique (algues, plancton, bivalves, poissons) ont été réalisées. Les analyses effectuées au niveau des nageoires des poissons (*Salmo gairdneri* et *Catostomus commersoni*) n'ont pas permis de détecter d'uranium à des niveaux supérieurs à la limite de quantification de leur appareillage (cette limite étant de 5 µg/g de tissu frais). Par contre, les analyses réalisées au niveau du squelette des organismes ont permis de détecter environ 40 µg d'uranium par g de tissu osseux, correspondant donc à un facteur de bioconcentration de l'uranium égal à 118.

Exception faite de ces zones présentant des concentrations élevées en radionucléides de façon naturelle, l'uranium peut être également présent à des concentrations élevées dans les compartiments aquatiques du fait d'activités anthropiques telles que celles liées au traitement d'un minerai d'uranium. [Mahon \(1982\)](#) fait ainsi référence à une étude dans laquelle des niveaux de contamination tissulaire ont été mesurés chez des truites (*Salmo trutta*) issues d'eaux situées en aval d'un gisement d'uranium en Tchécoslovaquie. L'étude a ainsi été menée avant et après le démarrage d'une exploitation du minerai. Les concentrations tissulaires sont alors passées de niveaux déjà relativement élevés (de l'ordre de 10 à 40 µg/g) à des niveaux beaucoup plus importants (compris entre 1 600 et 2 100 µg/g). D'autres études ont également été menées en aval de sites miniers canadiens, comme celles de [Swanson \(1985\)](#) et [Clulow et al. \(1998\)](#) qui font référence dans le domaine. [Swanson](#) a constaté des concentrations tissulaires en uranium comprises entre 0,62 et 3,39 µg/g poids frais selon l'espèce de poisson étudiée (*Couesius plumbeus*, *Catostomus commersoni*, *Notropis hudsonius* ou *Coregonus clupeaformis*) et la zone d'échantillonnage considérée. Ces valeurs sont très faibles, en comparaison de celles obtenues par [Mahon \(1982\)](#) ou par [Clulow et al. \(1998\)](#). Les travaux de ces derniers portant sur des mesures de concentrations tissulaires en différents éléments ont en effet permis de montrer que les poissons étaient capables de bioconcentrer l'uranium à des niveaux élevés, des quantités importantes de ce radionucléide ayant été retrouvées dans le squelette ainsi que le muscle de truites de lac

(*Salvelinus namaycush*) et de corégones (*Coregonus clupeaformis*). Au niveau du squelette, les concentrations en uranium retrouvées au niveau des différents sites de prélèvement étaient comprises entre 0,10 et 2,34 µg/g de tissu poids frais pour la truite et entre 0,73 et 8,32 µg/g poids frais pour le corégone. En ramenant ces concentrations tissulaires à des facteurs de bioconcentration osseuse (c'est-à-dire en normalisant ces données en fonction de la concentration en uranium de l'eau de chacun des sites), les auteurs ont ainsi obtenu des facteurs compris entre 27 et 167 pour la truite et entre 206 et 8320 pour le corégone. Néanmoins, ces données doivent être prise en compte avec précaution puisqu'elles ont été calculées à partir des données d'accumulation au niveau du squelette. Or, comme nous avons pu le voir précédemment, l'uranium présente une forte affinité envers ce tissu, contribuant notamment à l'accumulation et la rétention spécifique de l'élément sur le long terme. A l'échelle de l'organisme, il est donc vraisemblable que ces facteurs de bioconcentration soient inférieurs (la bioaccumulation moyenne de l'ensemble des tissus pouvant être inférieure à celle du squelette). Cette idée selon laquelle ces facteurs de concentrations peuvent être surestimés est confortée par le fait qu'à l'échelle des muscles, [Clulow et al. \(1998\)](#) rapportent des facteurs de bioconcentration bien inférieurs, compris entre 1 à 24.

Un autre cas concernant l'impact des activités de l'Homme sur la contamination du milieu aquatique et sur les capacités de bioaccumulation de l'uranium par les poissons a été étudié par [Bettinelli et al. \(2004\)](#). Les auteurs ont en effet voulu déterminer, notamment par une analyse isotopique de l'uranium internalisé par les organismes, si l'origine de cet uranium pouvait être liée à une contamination à l'uranium appauvri du fait d'opérations militaires préalablement conduites dans la partie nord de la mer Adriatique. Pour cela, ils ont réalisé des analyses spectrométriques de l'uranium présent dans certains poissons, échinodermes et coquillages collectés dans cette zone. Les poissons concernés par cette étude appartenaient à différentes espèces (*Merluccius merluccius*, *Mullus sp.* et *Pagellus centrodontus*). Les concentrations en uranium retrouvées dans leurs tissus étaient comprises entre 0,051 et 0,135 µg/g de tissu (poids sec). Aucune donnée relative à la concentration en uranium présent dans l'eau de mer n'étant mentionnée dans cette publication, il est impossible d'en déduire les facteurs de bioconcentration correspondant à ces niveaux d'accumulation tissulaires.

Au laboratoire, [Poston \(1982\)](#) a suivi l'exposition de truites juvéniles durant 6 j à deux concentrations d'uranium dans la colonne d'eau : $7,76 \cdot 10^{-8}$ et $9,63 \cdot 10^{-4}$ µg/L. Les concentrations

tissulaires retrouvées dans les organismes étaient alors de $2,90 \pm 2,42$ et $18,1 \pm 19,1$ ng/g de tissu poids sec et les facteurs de bioconcentrations calculés correspondants étaient alors respectivement égaux à 37 et 20. L'étude de [Parkhurst et al. \(1984\)](#) a quant à elle permis d'évaluer l'accumulation de l'uranium dans des truites (*Salmo trutta*) juvéniles exposées 60 j, toujours dans des conditions de laboratoire (eaux contaminées artificiellement à des concentrations allant de 0,16 à 10 mg/L d'uranium). Les facteurs de bioconcentration calculés étaient compris entre 1,94 et 4,28 selon la concentration d'exposition (9,08 et 0,23 mg/L respectivement). Cette étude a été complétée par une approche de terrain, des truites ayant parallèlement été collectées dans leur milieu naturel (dans des eaux présentant de 1 à 39 µg/L d'uranium). Les facteurs de bioconcentration calculés étaient quant à eux compris entre 0,08 et 2.

Au bilan, nos résultats concernant la bioaccumulation de l'uranium chez le poisson zèbre sont en accord avec la littérature. Si l'on prend comme valeur de référence l'accumulation moyenne rencontrée chez des organismes exposés 20 j à 500 µg/L, s'élevant à environ 50 µg/g de tissu frais, nous pouvons constater que nos valeurs sont dans la limite haute de celles généralement mentionnées dans la littérature. En effet, la plupart de ces données varient de quelques ng/g à quelques µg/g. Néanmoins, certains auteurs ont également constaté des niveaux d'accumulation plus importants, semblables voire même largement supérieurs à ceux constatés dans le cadre de notre étude (jusqu'à plus de 2 mg/g selon [Mahon, 1982](#)). A ces valeurs d'accumulation correspondent des facteurs de bioconcentration qui, dans notre travail, sont compris entre 100 et 1000 (respectivement pour des expositions à 500 et 20 µg/L). Une fois encore, nos résultats appartiennent à la limite haute des valeurs référencées dans la littérature mais restent compris dans les gammes de variations observées par [Poston \(1982\)](#), [Mahon \(1982\)](#) ou [Clulow et al. \(1998\)](#).

2.1.5 - Influence de l'activité radiologique de l'élément

Pour la plupart des durées d'expositions étudiées, la composition isotopique de l'uranium n'a pas affecté son internalisation. Ce constat confirme le postulat selon lequel le comportement chimique de l'ensemble des isotopes d'un élément est unique car indépendant de l'activité spécifique présentée par chacun des isotopes. Ainsi, la métabolisation de l'uranium dépendrait essentiellement de sa forme chimique et non de son activité radiologique comme cela est suggéré dans de nombreux documents de référence sur l'uranium ([ATSDR, 1999](#) ; [WHO, 2001](#)).

Néanmoins, comme nous avons pu le voir lors de la première expérimentation menée avec différentes compositions isotopiques d'uranium (expérimentation B), une différence significative de l'accumulation à l'échelle de l'organisme entier a été mise en évidence après 3 j d'exposition à une même concentration totale d'uranium (100 µg/L) mais à des activités radiologiques différentes (0 ou 2 375 Bq/L). A ce moment de l'expérience, les organismes exposés au mélange isotopique présentant l'activité radiologique la plus importante ont montré des niveaux d'accumulation en uranium significativement plus bas que ceux exposés seulement à de l'uranium appauvri. Cette différence ne peut être expliquée par un comportement différent de chacune des compositions isotopiques dans le milieu ou dans les mécanismes d'internalisation et de distribution de l'élément dans les différents tissus. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une altération de processus physiologiques (abaissement de la fréquence des mouvements respiratoires), de dommages histologiques (endommagement du tissu branchial) ou d'atteintes cellulaires (dommages membranaires, sécrétion de mucus) puisque tous ces paramètres interviennent dans les mécanismes d'internalisation de l'uranium. L'étude histologique menée en ce sens, et présentée plus loin dans ce chapitre "Discussion", nous permettra donc, en partie, de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse (cf. § 3.4.1).

2.2 - Distribution tissulaire... quelques clés d'interprétation

A ce jour, peu d'auteurs se sont intéressés à la distribution de l'uranium au travers des différents tissus d'un poisson. L'étude la plus complète menée dans ce domaine est sans doute celle de [Cooley et Klaverkamp \(2000\)](#). Ces auteurs ont estimé l'accumulation et la distribution de l'uranium chez le corégone suite à l'ingestion durant 10, 30 et 100 j de nourriture contaminée à hauteur de 100, 1 000 et 10 000 µg d'uranium/g de nourriture. Une accumulation particulièrement importante de l'élément a été constatée au sein du tractus gastro-intestinal. Selon les auteurs, les tissus intestinaux présentaient des concentrations d'uranium supérieures de deux à trois ordres de grandeur à celles rencontrées dans les autres tissus. A l'origine, notre étude de la répartition tissulaire de l'uranium chez le *Danio* exposé comprenait également l'examen du tractus gastro-intestinal (et ce, bien que la voie directe ait été retenue pour notre protocole d'étude). Néanmoins, du fait de la taille réduite de notre modèle biologique et donc de notre incapacité à extraire correctement la totalité du bol alimentaire présent dans le tractus préalablement à son analyse

chimique, nous n'avons pas pu réaliser cet examen. En effet, bien que la voie de contamination choisie dans le cadre de notre travail ait été la voie directe, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une contamination de la nourriture délivrée aux organismes durant leur exposition du fait de la durée de contact non nulle de la nourriture et de l'eau contaminée au moment de sa distribution. Exception faite de cette présence d'uranium dans le tractus gastro-intestinal, [Cooley](#) et [Klaverkamp \(2000\)](#) ont également souligné la présence d'uranium dans le squelette, les écailles, le foie, et les gonades.

Les résultats obtenus lors de notre étude de la distribution tissulaire de l'uranium corroborent, du moins en partie, les résultats de [Cooley](#) et [Klaverkamp \(2000\)](#). Néanmoins, leurs conclusions relatives au tractus gastro-intestinal sont à relier avec le fait que leur étude été menée sur des organismes exposés à l'uranium par la voie trophique. De même, dans notre étude, l'appareil branchial est apparu comme étant un site majeur d'accumulation de l'uranium. Cette observation est certainement corrélée au fait que c'est la voie directe qui a été retenue dans notre cas. Nos conclusions respectives (celles de notre étude et celles de l'étude de [Cooley](#) et [Klaverkamp](#)) sont donc directement dépendantes des conditions d'expositions choisies et ne doivent pas être considérées comme "contradictoires". D'autre part, l'examen des concentrations tissulaires en uranium a permis de montrer que le foie présente également des niveaux d'accumulation très importants. Exception faite des tissus branchiaux et hépatiques (qui constituent donc des sites majeurs d'accumulation de l'uranium dans l'organisme), l'uranium a été retrouvé à des concentrations plus faibles mais néanmoins non nulles au niveau de tous les autres organes investigués (notamment dans les tissus squelettiques, gonadiques et cérébraux). Nous allons voir dans quelle mesure cette distribution hétérogène de l'uranium entre les différents tissus et organes peut être révélatrice du rôle physiologique joué par les branchies et le foie dans la prise en charge de l'uranium par les poissons. A la suite de cela, nous nous attarderons également sur trois autres types tissulaires d'intérêt : le squelette, les gonades et le cerveau.

2.2.1 - L'appareil branchial

Bien qu'il soit aisé de considérer que le tissu branchial constitue la voie d'entrée principale de l'uranium présent dans l'eau vers le milieu intérieur, il pourrait également jouer le rôle d'une barrière physique en limitant la diffusion de cet élément à travers l'organisme. Ainsi, il n'est pas

impossible que les branchies retiennent la majeure partie de l'uranium présent à leur surface ou en leur sein afin d'éviter la contamination des autres organes. Deux mécanismes sont alors envisageables. Tout d'abord, une production importante de mucus à leur surface pourrait servir de système de protection en établissant une zone tampon entre le milieu extérieur et l'appareil branchial. Cette production anormale du mucus par les branchies a en effet déjà été décrite chez les poissons, notamment dans des cas de contamination à d'autres métaux divalents (Coello et Khan, 1996). Un autre mécanisme consisterait en une concentration de l'uranium au sein même du tissu branchial de façon à éviter sa distribution aux autres organes *via* la circulation sanguine.

Cependant, au-delà d'une certaine pression de contamination, les capacités de cette première ligne de défense vis-à-vis de l'entrée de l'uranium dans l'organisme pourraient être insuffisantes, l'uranium pouvant ainsi accéder au reste de l'organisme *via* la circulation sanguine. Une fois passé dans le compartiment sanguin, l'uranium pourrait alors se distribuer aux différents organes et notamment au foie, principal organe de détoxification des xénobiotiques.

2.2.2 - Le foie

Comme le rappellent Cooley et al. (2000), le foie joue un rôle majeur dans la prise en charge et la détoxification des métaux et donc de l'uranium. Le foie est en effet présenté comme une véritable "usine métabolique". Outre sa fonction physiologique de conversion des nutriments en substances utilisables pour le métabolisme et de gestion des déchets métaboliques, le foie est l'organe clé intervenant dans la détoxification des xénobiotiques. Pour cela, le foie empreinte trois voies principales de détoxification : il filtre le sang de façon à éliminer les agents toxiques de la circulation sanguine ; il exerce une action chimique et enzymatique sur ces agents ; et il secrète la bile afin de les éliminer. En effet, le foie fabrique des quantités importantes de bile chaque jour. Cette bile est alors stockée dans la vésicule biliaire qui la relargue en fonction des besoins. Sans cette excrétion biliaire, le foie serait sujet à une accumulation trop importante d'agents toxiques pouvant alors être à l'origine de dysfonctionnements hépatiques. Pour éviter cela, le foie va donc charger la bile en substances toxiques (qu'il s'agisse des xénobiotiques proprement dits ou de leurs sous-produits de détoxification) ; les sécrétions biliaires contribuant donc à l'élimination de ces produits dans les excréta. En effet, les matières fécales constituant les fèces ne sont constitués qu'à hauteur de 25 % des résidus de la digestion (fibres végétales ou conjonctives non digérées...),

les 75 % restant provenant des sécrétions biliaires, pancréatiques et intestinales (Stouff, 2002). Cette importance de la voie biliaire dans l'excrétion de l'uranium tendrait à être confirmée par Cooley et al. (2000). Ces auteurs ont en effet permis d'établir un parallèle entre l'occurrence d'histopathologies hépatiques et biliaires et une voie d'élimination possible de l'uranium *via* le système biliaire chez des corégones (*Coregonus clupeaformis*) exposés à l'uranium par voie alimentaire. Cette voie d'excrétion pourrait alors tenir une place relativement importante dans les mécanismes de défense de l'organisme vis-à-vis de l'uranium.

2.2.3 - Autres tissus et organes d'intérêt

En plus de l'appareil branchial et du foie, l'accumulation de l'uranium au sein du squelette, des gonades et du cerveau mérite une attention particulière. En effet, comme nous avons pu le mentionner dans le cadre de l'étude bibliographique relative à la toxicocinétique de l'uranium dans les organismes (§ 5.1.3), l'uranium présente une forte affinité pour le tissu osseux (§ 5.1.3.1), et présente de surcroît la faculté de traverser les barrières physiologiques sensées isoler les tissus cérébraux (§ 5.1.3.6) et gonadiques (§ 5.1.3.7) de la circulation sanguine générale. Ainsi, même si ces tissus n'ont pas présenté des niveaux d'accumulation foncièrement différents de ceux présentés par les autres organes investigués, leur étude semble néanmoins intéressante.

2.2.3.1 - Le squelette

Concernant l'accumulation d'uranium au sein du squelette, cette tendance peut ainsi être confirmée et expliquée par le fait que l'uranium a un comportement très proche de celui du calcium notamment en ce qui concerne sa fixation au tissu osseux. En effet, il existe des preuves selon lesquelles l'ion libre de l'uranium (UO_2^{2+}) peut prendre la place des ions calciques (Ca^{2+}) à la surface des cristaux minéraux osseux (Leggett et Pellmar, 2003). Il est également suggéré que l'uranium adsorbé à la surface des os puisse graduellement diffuser au sein du volume osseux. Ce comportement toxicocinétique de l'uranium pourrait également être envisagé pour l'appareil branchial, tissu fortement cartilagineux et donc riche en calcium ainsi que pour le cas de la peau (et plus précisément des écailles).

2.2.3.2 - Les gonades

Le cas des gonades est également intéressant à considérer du point de vue de l'accumulation d'uranium. En effet, une différence très marquée caractérise le comportement toxicocinétique de l'uranium selon que l'on a affaire à une composition isotopique présentant une activité radiologique importante ou non. En effet, comme nous avons pu le montrer lors de ce travail, les gonades sont peu affectées par la présence d'uranium dans l'organisme tant que celui-ci n'exerce pas une activité radiologique trop importante. Dans le cas de l'uranium appauvri par exemple, on ne retrouve l'uranium dans le tissu gonadique qu'à l'état de traces, bien moins concentré que dans le reste de l'organisme. Or, chez les vertébrés il existe une barrière hémato-testiculaire (BHT) assurant un isolement des gonades de la circulation sanguine générale. Ainsi, dans les testicules, on considère que les cellules proches de la lumière du tubule séminifère sont protégées des agressions toxiques, chimiques ou radioactives par cette barrière. L'hypothèse d'un passage de cette barrière semblerait néanmoins possible par le biais de la voie physiologique fer-transferrine (ce qui expliquerait que l'on retrouve de l'uranium dans les gonades, même s'il ne s'agit que de traces). De plus, des études récentes chez les rongeurs suggèrent un franchissement possible de la BHT par certains radionucléides comme le plutonium, l'américium et le polonium, grâce à la voie physiologique (Flüry-Hérard et Ménétrier, 2003). Ces résultats corroborent ceux de notre étude. En effet, nous avons également constaté une influence de l'activité radiologique sur le franchissement de cette barrière, une augmentation marquée de la quantité d'uranium retrouvée dans les gonades ayant été notée lorsque le radioélément était administré sous la forme d'un mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U , présentant une activité radiologique 1000 fois supérieure à celle de l'uranium appauvri seul. Une altération d'origine radiologique de la barrière hémato-testiculaire est donc suggérée.

2.2.3.3 - Le cerveau

Enfin, il semble important de rappeler que la présence d'uranium dans le tissu cérébral n'est pas un fait anodin. En effet, tout comme les gonades sont isolées de la circulation sanguine générale par la barrière hémato-testiculaire, l'encéphale est classiquement isolé de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique. La présence de cette barrière est généralement suffisante à éviter la diffusion des molécules indésirables vers le compartiment cérébral. Or,

d'après les résultats de notre étude il apparaît que l'uranium peut franchir cette barrière et ce, quelle que soit l'activité radiologique de l'élément. Ceci suggère qu'un franchissement facilité de la barrière hémato-encéphalique ne serait pas attribuable à une altération d'origine radiologique (comme cela est suggéré pour les gonades). Ce sont donc les propriétés chimiques de cet élément qui lui confèrent sa capacité à diffuser au travers de celle-ci. Ce franchissement de la barrière hémato-encéphalique a déjà été montré pour de nombreux métaux lourds, y compris l'uranium chez le rat (Leggett et Pellmar, 2003 ; Lemercier et al., 2003 ; Barber et al., 2005 ; Bussy, 2005 ; Lestaevel et al., 2005 ; Paquet et al., 2006). Elle n'avait cependant été observée sur le poisson que pour quelques métaux lourds tels que le plomb, le cuivre, le zinc, le chrome ou encore le cadmium, mais pas pour l'uranium (Gomaa et al., 1995 ; Deb et Santra, 1997).

3 - TOXICOLOGIE DE L'URANIUM

3.1 - Evaluation du stress oxydant

Dans le cadre de ce travail, le stress oxydant a fait l'objet d'une étude multiparamétrique. Ce choix a été motivé de façon à obtenir une "vision panoramique" des conséquences de la présence d'uranium dans un tissu vis-à-vis du système de défense antioxydante. En effet, comme nous l'avons évoqué au cours de la présentation de ce système (§ A.II.4.1), chacun des biomarqueurs retenus joue un rôle précis dans l'enchaînement des étapes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Comme nous le verrons dans ce paragraphe, il semblerait que l'ensemble du système antioxydant cellulaire ait été perturbé (inhibition de l'ensemble des enzymes et déplétion de la quantité de glutathion total).

De plus, l'étude relative des contributions chimiques et radiologiques à cette atteinte oxydante de l'uranium est apparue très intéressante. Nous verrons donc dans quelle mesure l'utilisation de différentes activités radiologiques a pu moduler la réponse observée au niveau des biomarqueurs de stress oxydant.

3.1.1 - Les marqueurs enzymatiques

3.1.1.1 - Synthèse des principaux résultats obtenus

Le suivi des marqueurs enzymatiques retenus pour l'étude du stress oxydant nous a permis de constater que, quelle que soit l'enzyme considérée (SOD, CAT ou GPx), une inhibition de leur activité survient à la suite d'une exposition à l'uranium. Ces manifestations de la toxicité de l'uranium vis-à-vis du tissu hépatique sont le fait d'atteintes chimiques et/ou radiologiques.

Effets attribuables à la chimiotoxicité de l'uranium

Les perturbations induites chimiquement par l'uranium (étudiées lors d'expositions à de l'uranium appauvri) ont été les suivantes :

- inhibition de l'activité de la SOD après 20 j d'exposition à 100 µg/L (expérimentation B) ;
- inhibition de l'activité de la CAT dès 12 h d'exposition à 500 µg/L, après 3 j pour les expositions à 20 et 100 µg/L (expérimentation A, l'expérimentation B n'ayant quant à elle permis de constater un effet sur l'activité CAT qu'après 20 j d'exposition à 100 µg/L) ;
- augmentation de l'activité GPx après 10 j d'exposition à 20 µg/L (expérimentation A).

Concernant les activités SOD et CAT, les modalités de leur inhibition semblent suggérer que le dépassement d'un seuil d'accumulation de l'élément dans les organismes est nécessaire à la manifestation d'effets toxiques. Ainsi, dans le cas de la SOD, l'examen comparatif des expérimentations A et B tend à soutenir cette hypothèse. En effet, l'expérimentation B a permis de révéler une inhibition de l'activité SOD après 20 j d'exposition à 100 µg/L d'uranium appauvri. Cette réponse n'ayant pas été montrée lors de l'expérimentation A même après 10 j d'exposition à 500 µg/L (c'est-à-dire sur une période deux fois plus courte mais pour une concentration 5 fois plus importante), il peut être intéressant de voir si ces deux conditions (20 j à 100 µg/L et 10 j à 500 µg/L) induisent des niveaux de bioaccumulation différents. En effet, si tel était le cas, nous pourrions attribuer cette toxicité chimique apparue lors de l'expérimentation B au "dépassement d'un seuil d'accumulation" au-delà-duquel la pression chimique exercée par l'uranium internalisé serait suffisante pour inhiber la SOD. Grâce au suivi de la bioaccumulation lors de l'expérimentation A, la comparaison des concentrations internes en uranium est possible. Ainsi, les concentrations en

uranium retrouvées dans les organismes ont été de $31,8 \pm 4,4 \mu\text{g/g}$ après 10 j d'exposition à 500 $\mu\text{g/L}$ et de $43,1 \pm 9,5 \mu\text{g/g}$ après 20 j d'exposition à 100 $\mu\text{g/L}$. On constate donc que les concentrations internes en uranium des individus chez lesquels l'activité SOD est significativement inhibée sont plus importantes que les concentrations internes des individus chez lesquels aucune réponse n'est apparue. L'hypothèse de l'existence d'un seuil d'apparition des effets chimiotoxiques de l'uranium vis-à-vis de l'activité SOD semble donc confirmée. De la même manière, lors de l'examen des données relatives à l'activité CAT, nous pouvons constater que plus la pression de contamination exercée sur les organismes est importante, plus l'inhibition observée est précoce (dès 12 h dans le cas de l'exposition à 500 $\mu\text{g/L}$, après 3 j pour les conditions moins drastiques, 20 et 100 $\mu\text{g/L}$). Pour qu'un tel effet survienne, il semble donc nécessaire qu'un seuil d'exposition soit franchi, avec l'idée implicite qu'à ce seuil d'exposition soit étroitement lié un seuil d'accumulation.

Les résultats obtenus lors du suivi de l'activité GPx restent quant à eux difficiles d'interprétation. Tout d'abord, seule une des 15 conditions d'exposition investiguées a permis de mettre en évidence un effet de l'uranium, notamment du fait d'une très forte variabilité de ce paramètre. De plus, cette modulation de l'activité GPx s'est traduite par une augmentation, observée après 10 j d'exposition à la plus faible dose testée (20 $\mu\text{g/L}$). Nous ne pouvons formuler aucune hypothèse permettant d'expliquer un tel effet.

Effets attribuables à la radiotoxicité de l'uranium

La modulation des caractéristiques radiologiques de l'uranium utilisé lors de l'exposition des organismes a également permis de montrer que l'uranium est radiologiquement capable d'induire une perturbation des paramètres hépatiques du stress oxydant. Ainsi, nous avons pu constater une inhibition précoce (du moins plus précoce que sous la seule action chimique de l'uranium) des activités SOD, CAT et GPx lors de l'exposition des organismes au mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U . Ainsi, à la différence de l'inhibition tardive de l'activité SOD induite par une exposition à l'uranium appauvri, une inhibition d'origine radiologique de l'activité SOD apparaît précocement, dès 3 j d'exposition au mélange. De même, une inhibition plus précoce (dès 10 j) et plus importante (56 %) que dans le cas d'une exposition à de l'uranium appauvri (apparue après 20 j et à hauteur de 46 %) a été observée lors de l'étude de l'activité de la CAT au cours d'une exposition au mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U . Enfin, seule l'exposition au mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U a

permis de constater une inhibition de l'activité GPx et ce, dès la plus courte période d'exposition étudiée (3 j). Il semble donc que l'augmentation de l'activité radiologique de l'uranium induit des effets plus précoces que ceux induits chimiquement par cet élément. En plus de leur précocité, il apparaît également que ces effets revêtent un caractère transitoire. Ainsi, les inhibitions de la SOD et de la GPx observées à 3 j ont toutes deux disparu à 10 j. De même, l'inhibition de la CAT observée à 10 j n'a pas été significativement maintenue à 20 j. Le caractère transitoire de cette inhibition des activités enzymatiques sous l'effet des radiations ionisantes nous laisse penser que des systèmes cellulaires de défense ont pu être mis en place afin de lever ou compenser l'inhibition. Ceci supposerait donc que les cellules hépatiques aient réussi à gérer le stress radiologique occasionné (par réactivation des enzymes initialement perturbées ou par induction de la synthèse de nouvelles unités enzymatiques).

Nous retiendrons donc que l'uranium est capable, tant d'un point de vue radiologique que chimique, d'affecter l'activité des enzymes du système antioxydant cellulaire. Cette toxicité de l'uranium se caractérise en premier lieu par une action radiologique précoce mais transitoire, cette action étant relayée plus tardivement par une atteinte chimique semblant ne se manifester qu'à la condition du dépassement d'un seuil d'accumulation de l'élément dans les tissus des organismes.

3.1.1.2 - Hypothèses générales relatives aux inhibitions enzymatiques

Le seul examen des données obtenues dans le cadre du suivi des paramètres enzymatiques du stress oxydant ne nous permet pas d'établir clairement quels ont été les mécanismes moléculaires à l'origine des perturbations observées. Néanmoins, quelques hypothèses pourraient permettre d'identifier des pistes mécanistiques de ces atteintes enzymatiques (tant radiologiques que chimiques). Parmi ces mécanismes susceptibles d'expliquer les inhibitions enzymatiques observées, nous aborderons successivement : (i) l'altération des enzymes du fait de dommages oxydatifs, (ii) l'interaction directe de l'uranium avec ces macromolécules, (iii) la conséquence possible des interrelations avec d'autres acteurs du système antioxydant et enfin (iv), la sous-expression des gènes codant pour ces enzymes.

Altération des enzymes par le biais de dommages oxydatifs

Tant d'un point de vue radiologique que chimique, nous pouvons nous attendre au fait que les chutes d'activité observées soit dues à des phénomènes oxydatifs (Davies, 2003). En effet, les protéines (et donc les enzymes du système cellulaire de défense antioxydante) présentent de nombreux sites réactifs susceptibles d'être endommagés lors d'un stress oxydatif (pour mémoire, un rappel de la structure des protéines est proposé dans le glossaire, cf. protéine¹).

Les altérations induites par la présence de métaux dans l'environnement des protéines vont pouvoir apparaître à différentes échelles de la structure de ces macromolécules et, en premier lieu, au niveau de la chaîne polypeptidique définie par la séquence des acides aminés qui les compose (Stadtman, 1990 ; Davies, 1987 et 2005). Cette chaîne est généralement décrite comme étant constituée par une structure répétitive faisant office de "colonne vertébrale" sur laquelle s'articulent des "chaînes latérales" qui correspondent aux résidus non engagés dans la liaison peptidique des acides aminés. Les métaux sont capables d'agir à ces deux niveaux d'organisation de la séquence en acides aminés *via* des phénomènes oxydatifs liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène précédemment décrite. Concernant la colonne vertébrale des protéines, les phénomènes oxydatifs sont généralement attribuables aux espèces radicalaires (les oxydants non radicalaires étant peu susceptibles d'agir à ce niveau). L'action principale des espèces radicalaires intervient essentiellement sous la forme de l'extraction de l'atome d'hydrogène lié au carbone α des acides aminés (atome sur lequel vient s'insérer la chaîne latérale), formant ainsi une espèce radicalaire (Davies, 2005). Cette espèce radicalaire peut alors interagir avec d'autres macromolécules mais, le plus généralement, va entraîner la fragmentation de la protéine (Garrison, 1987 ; Wolff et Dean, 1986). Les chaînes latérales peuvent également être l'objet d'altérations oxydatives (Davies et al., 1987a). Du fait du nombre important de résidus possibles, les possibilités d'altérations sont élevées. On retiendra sommairement que les conséquences de ces altérations peuvent prendre la forme de fragmentations de la chaîne, de dimérisations ou d'agrégations intra ou interchaînes, de ruptures des liaisons disulfures ou encore de formations d'espèces radicalaires (groupements thiyles ou peroxydes par exemple). Dans ce dernier cas, la formation d'espèces radicalaires peut être à l'origine de réactions en chaînes aboutissant notamment à l'oxydation d'autres macromolécules comme l'ADN, les lipides et les autres protéines (Davies, 1996 ; Gebicki et Gebicki, 1999 ; Hawkins et Davies, 2001 ; Salvi et al., 2001 ; Davies, 2005). L'ensemble de ces

altérations peut conduire à des changements conformationnels (Davies et Delsignore, 1987). Ainsi, certaines études ont montré que l'oxydation d'acides aminés présents dans la partie hydrophobe d'une protéine (c'est-à-dire, ceux qui sont enchâssés au centre de celle-ci) peut entraîner l'apparition d'un caractère hydrophile des résidus oxydés. Ceci peut être à l'origine d'une force de translocation des chaînes internalisées vers la périphérie de la protéine, aboutissant donc à des changements de la structure tertiaire (Davies, 2005). De même, la rupture ou la formation de ponts disulfures peuvent changer la structure tridimensionnelle de la protéine (Thomas, 1999). Enfin, l'oxydation de certains acides aminés peut influencer sur la dégradation des protéines ; les résidus oxydés pouvant agir comme marqueurs cellulaires induisant la prise en charge des protéines par les protéasomes et les lysosomes (Davies et al., 1987b). Ces altérations de la structure moléculaire des enzymes peuvent alors réduire l'affinité de ces protéines envers leur substrat, affecter le site actif de l'enzyme de sorte que l'action catalytique soit perdue, ou bien encore abaisser la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (Beatty et al., 1980 ; Levine, 1983 ; Charron et al., 2000).

Ces phénomènes oxydatifs ont notamment été décrits pour la méthionine, l'histidine, le tryptophane, la lysine, la tyrosine, la proline, la cystéine ou encore l'arginine (Sies, 1986 ; Amici et al., 1989). Ainsi, dans le cas de la SOD, Kwon et al. (1998) ont montré, suite à la génération d'espèces réactives de l'oxygène par réaction de Fenton, l'oxydation de la SOD. Cette oxydation s'est traduite par une baisse d'activité enzymatique. De même, la perte de certains acides aminés à la suite d'un dommage oxydatif peut être à l'origine de l'inactivation de certaines enzymes. Ceci a notamment été montré pour la glutamine synthétase par Levine en 1983. Nous pouvons donc supposer que ces phénomènes oxydatifs pourraient expliquer, du moins en partie, les inhibitions enzymatiques observées au cours de notre étude

Interaction directe de l'uranium avec les enzymes et/ou leurs cofacteurs

Une interaction directe du métal et de la protéine est également possible. En effet, il a été montré, notamment pour le plomb ou le mercure, que les enzymes peuvent voir leur activité enzymatique inhibée de manière irréversible par liaison du métal au niveau de certains groupements fonctionnels tels que les groupements sulfhydriles (Ercal et al., 2001). Néanmoins, comme nous pourrions le voir dans l'étude du glutathion, l'uranium n'est pas capable de se lier à de

tels groupements. L'hypothèse d'une interaction directe de l'uranium et du site actif d'une enzyme est donc peut probable dans notre cas.

Il est également proposé que les métaux lourds puissent se complexer avec certains cofacteurs enzymatiques tels que le sélénium (cofacteur de la GPx), le fer (présent au sein du domaine hémique de la catalase), le cuivre, le zinc ou le manganèse (cofacteurs de la SOD). La formation de tels complexes conduirait alors à une inhibition de l'activité des enzymes concernées (Ercal et al., 2001). Tout comme pour l'hypothèse de dommages oxydatifs occasionnés sur les enzymes, l'hypothèse d'une perturbation de la relation entre les enzymes et leur(s) cofacteur(s) respectif(s) peut être avancée dans le cas de notre étude. Nous ne disposons néanmoins d'aucun élément de réponse permettant d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse.

Conséquences des relations entre les différents acteurs du système antioxydant

Le couplage SOD/CAT

Du fait de la relation qui existe entre les activités de la SOD et de la CAT au sein du système cellulaire de défense antioxydante, nous pouvons entrevoir la possibilité d'un lien entre les inhibitions observées.

L'activité de la catalase consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2). Or, la production de peroxyde d'hydrogène est notamment attribuable à l'activité de la superoxyde dismutase. L'inhibition de la superoxyde dismutase pourrait donc induire une diminution de la quantité de substrat disponible pour la catalase (H_2O_2). Cette chute de l'activité CAT pourrait alors être à l'origine d'un ralentissement du renouvellement du pool intracellulaire de cette enzyme. Cependant, au cours des différentes expérimentations réalisées, l'inhibition de la catalase a généralement été observée plus précocement que l'inhibition de la SOD. Le seul cas pour lequel l'inhibition de la CAT a fait suite à celle de la SOD est celui de l'exposition au mélange d'uranium appauvri et d' ^{233}U . En effet, pour cette condition expérimentale (étudiée lors de l'expérimentation B), une inhibition de la SOD a été observée à 3 j et une inhibition de la CAT a été observée à 10 j. Néanmoins, le manque évident de données ne nous permet pas d'étayer cette hypothèse.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'inhibition de la CAT du fait de ses liens biochimiques avec l'activité SOD reposerait non plus sur l'absence d'hydroperoxyde mais sur l'excès d'anions superoxyde. En effet, il a été montré que la catalase pouvait être inhibée par la présence de ces ions dans son environnement proche (Kono et Fridovich, 1982), le domaine hémique de la catalase pouvant voir son statut redox être altéré et ainsi devenir inactif. Cette hypothèse, bien que théoriquement admissible, est néanmoins l'une des plus fragiles parmi celles formulées jusqu'à maintenant pour expliquer les inhibitions enzymatiques observées. Même si aucun élément ne nous permet de l'écarter, nous préférons tout de même rester prudents et garder à l'esprit qu'il s'agit plus d'une "possibilité" que d'une "probabilité".

Les couplages GPx/GSHtot et GPx/peroxydes membranaires

Dans le cas de la GPx, l'activité de cette enzyme est étroitement dépendante de facteurs connexes tels que la quantité de glutathion disponible ou de l'état de peroxydation des lipides membranaires.

Concernant le lien existant entre l'activité de la GPx et le glutathion, il semble important de rappeler que la principale GPx présente chez les poissons est une enzyme tétramérique sélénium-dépendante présente au niveau cytosolique et qui utilise le glutathion comme cofacteur. Lorsque la quantité de GSH disponible vient à diminuer, les capacités d'action de l'enzyme sur la détoxification du peroxyde d'hydrogène sont consécutivement limitées.

De même, la glutathion peroxydase est considérée comme une enzyme jouant un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs occasionnés au niveau des membranes par le biais de la peroxydation lipidique. Or, il a été montré que l'uranium est capable d'induire la peroxydation des phospholipides membranaires chez le poisson (Cooley et al., 2000). De plus, Charron et al. (2000) ont observé une chute de l'activité de la GPx chez des poissons zèbres exposés à des rayonnements ultraviolets (de type UV-B) chez lesquels des niveaux élevés de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (test TBARS) ont parallèlement été démontrés. Ces substances (telles que le malonedialdéhyde) sont le reflet de la présence de molécules ayant subi une peroxydation. Les auteurs en ont donc conclu que la chute d'activité observée au niveau de la glutathion peroxydase était susceptible d'être la conséquence de la peroxydation lipidique. Il a en effet été montré qu'une dégradation accrue de la GPx peut survenir dans le but de recruter de

nouveaux stocks de sélénium. Le sélénium rendu ainsi disponible serait alors utilisé pour la synthèse d'une autre forme de glutathion peroxydase, la PHGPx (*phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase*), qui catalyse spécifiquement la réparation des lipides peroxydés (Imai et Nakagawa, 2003). Certaines études ont d'ailleurs montré l'importance de cette enzyme dans le cadre d'exposition à des métaux tels que le plomb, le fer ou encore le cuivre (de Almeida et al., 2004 ; Kang et al., 2004).

L'activité de la GPx peut donc être affectée par tout un ensemble de facteurs propres au statut redox régnant dans le milieu intracellulaire. Il existe d'ailleurs une forte similarité entre les cinétiques des perturbations observées dans notre étude au niveau de l'activité GPx et de la quantité de GShtot. Cette similarité nous incite à penser que cette relation "GPx-GShtot" pourrait réellement jouer un rôle dans les perturbations observées.

Sous-expression génique de ces enzymes

Quelques études de toxicogénomique[?] indiquent enfin que le gène codant pour la SOD peut être sous-exprimé à la suite d'une contamination à l'uranium chez des modèles rongeurs (Schramm et al., 2002 ; Taulan, 2004). Ceci constituerait donc une piste sérieuse permettant d'expliquer la chute d'activité SOD constatée dans le cadre de notre travail. Il pourrait en être de même pour les autres activités suivies (CAT et GPx) pour lesquelles une chute d'activité a été observée. Néanmoins, aucune étude dans ce domaine n'a encore été menée à notre connaissance.

3.1.1.3 - Bilan de l'étude des marqueurs enzymatiques du stress oxydant

Nous avons donc pu voir que les activités SOD, CAT et GPx sont inhibées à la suite d'une exposition à l'uranium. Cette inhibition trouve son origine dans des phénomènes tant radiologiques que chimiques. Dans le cas des atteintes radiologiques, elles semblent induites précocement et de manière transitoire, tandis que les atteintes chimiques (qui semblent résulter de l'accumulation de l'élément dans les tissus) apparaissent plus tardivement. Nous ne pouvons que formuler des hypothèses quant à l'origine de ces observations. Cependant, au regard de la littérature, il semble probable que les mécanismes suggérés (dommages oxydatifs, action directe de l'uranium, conséquences des interrelations enzymatiques ou perturbation de l'expression génique) aient effectivement été mis en jeu.

3.1.2 - Les marqueurs non enzymatiques

3.1.2.1 - Etude du glutathion

Du point de vue chimique, les cinétiques d'altération de la quantité hépatique de glutathion total semblent assez semblables à celles observées pour l'activité CAT (déplétion observée dès 12 h d'exposition à 500 µg/L d'uranium appauvri, ou après 3 j pour les expositions à 20 et 100 µg/L).

Du point de vue radiologique, il a également été constaté une déplétion des quantités de GSHTot lors d'une exposition au mélange d'uranium appauvri et d'²³³U (à 3 j). Cette déplétion a été observée alors qu'aucune variation de ce paramètre n'a été constatée avec de l'uranium appauvri (même sur des périodes plus longues, jusqu'à 20 j).

Lors d'une modulation du statut cellulaire en glutathion à la suite d'un stress métallique, l'une des premières pistes explicatives généralement avancées est celle d'une liaison directe du glutathion au métal. En effet, le glutathion dispose d'un groupement acide carboxylique, d'un groupement amine, d'un groupement sulfhydryle (-SH) et de deux pontages peptidiques susceptibles d'être impliqués dans des réactions avec les métaux lourds. Son groupement fonctionnel -SH jouerait alors un rôle important dans la liaison au métal. Les groupements thiols (-SH) représentent en effet le facteur le plus important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire de la balance redox. Ainsi, ces entités chimiques peuvent être oxydées par deux électrons *via* une réaction enzymatique, cette oxydation aboutissant alors à la formation d'un pont disulfure (S-S). Dans un second temps, ces ponts disulfures peuvent être à nouveau réduits pour redonner les groupements thiols initiaux. De cette façon, le rapport entre les formes réduites et oxydées de ces groupements peut être considéré comme l'un des paramètres prépondérant dans l'évaluation des capacités antioxydantes cellulaires (Galaris et Evangelou, 2002). C'est pourquoi le rapport des quantités de glutathion réduit et oxydé est souvent étudié en écotoxicologie afin d'estimer le statut oxydatif d'un tissu donné. Dans le cadre de notre étude, il a été envisagé de suivre ce rapport oxydé/réduit du glutathion (plutôt que de ne regarder que la quantité totale du glutathion quel que soit son état d'oxydation). Néanmoins, le problème de la disponibilité de protocoles permettant un tel suivi s'est rapidement posé. Il est en effet apparu que le dosage des formes réduites et oxydées du glutathion est complexe. Sur la base de discussions avec les membres du laboratoire de l'INERIS avec lequel nous avons collaboré à ce sujet, il a donc été décidé de nous limiter au suivi du glutathion total.

Les poissons téléostéens, tout comme les mammifères, possèdent des concentrations importantes de GSH dans leurs tissus. L'exposition à des métaux a été démontrée comme étant à l'origine d'une altération du statut en GSH. En effet, de nombreux métaux (tels que le cadmium, le chrome et, à moindre échelle, le nickel) sont caractérisés par une forte affinité vis-à-vis des groupements thiols et forment des complexes avec ces entités chimiques. Ainsi, des expositions chroniques au plomb, au cadmium ainsi qu'au mercure ont induit une variation des concentrations hépatiques en GSH chez de nombreuses espèces de téléostéens (Thomas et Wofford, 1984 ; Thomas et Juedes, 1992 d'après Maracine et Segner, 1998). Ces interactions métal-glutathion sont généralement labiles d'un point de vue thermodynamique, ce qui peut conduire à la formation de radicaux thiyles ($-S^{\circ}$) sous certaines conditions. Bien que ces radicaux soient relativement stables et puissent interagir entre eux pour former des ponts disulfures non radicalaires, ils peuvent également réagir avec l'oxygène et ainsi générer des espèces réactives de l'oxygène (Galaris et Evangelou, 2002). Ceci souligne le rôle important du glutathion dans la gestion d'un stress métallique.

Cependant, tous les métaux ne sont pas égaux devant leur capacité à interagir avec le glutathion et, plus généralement, avec les groupements thiols. En effet, une caractéristique chimique des métaux va influencer sur l'affinité de ces derniers envers les groupements -SH. Il s'agit du caractère "dur" ou "mou" au sens de Pearson (1963) des espèces chimiques considérées. Ainsi, Pearson propose de classer les ions métalliques en deux classes : les "métaux durs" généralement de taille réduite et faiblement polarisables (dont font partie le plomb et l'uranium par exemple), et les métaux "mous" de taille plus conséquente et fortement polarisables. Dans la première classe citée, on retrouve les ions des métaux alcalins ou alcalino-terreux et des métaux de transition dans leurs degrés d'oxydation les plus élevés (c'est-à-dire fortement chargés). Les ions métalliques de la seconde classe comprennent quant à eux les métaux de transition lourds et de degrés d'oxydation les plus bas (faiblement chargés). Ainsi, les métaux tels que le plomb ou l'uranium s'avèrent être des métaux "durs" tandis que le mercure par exemple appartient à la classe des métaux "mous". Or, cette caractéristique chimique est déterminante vis-à-vis de la liaison des ions métalliques aux sites nucléophiles cellulaires tels que les groupements sulfhydryles (Maracine et Segner, 1998). En effet, seuls les métaux mous sont caractérisés par une forte affinité envers ces groupements fonctionnels. L'étude de Maracine et Segner (1998) a ainsi permis de montrer que le glutathion

intracellulaire protège les cellules de poissons contre l'action cytotoxique du mercure, du cadmium ou encore du cuivre (tous trois des "métaux mous") mais pas contre les effets du zinc, du nickel ou du plomb (des "métaux durs"). Le rôle du glutathion comme molécule piégeant les métaux afin d'abaisser la concentration de leur forme libre au sein du cytosol est donc inopérant dans le cas de l'uranium. C'est pourquoi, dans le cadre de notre étude, nous ne pourrions retenir cette hypothèse d'une liaison directe de l'uranium et du glutathion, pour expliquer la déplétion du GSHTot observée.

Dans le cas particulier de l'uranium, une autre explication peut être toutefois avancée afin d'expliquer la déplétion du GSH. Ainsi, la variation observée de la quantité hépatique de glutathion peut être le reflet d'une redistribution de glutathion vers d'autres tissus et organes comme ceci a déjà été décrit chez la truite arc-en-ciel ou la barbotte brune (Otto et Moon, 1995, 1996). Ainsi, sous l'effet d'un stress oxydant sévère, les capacités de la cellule à réduire le glutathion oxydé (GSSG) par le biais de la glutathion réductase (GR) peuvent être dépassées, aboutissant alors à une accumulation de GSSG dans le cytosol (Sies et Akerboom, 1984 ; Cadenas et Sies, 1985 ; DeLeve et Kaplowitz, 1991). Afin de protéger la cellule d'un déséquilibre de la balance redox, celle-ci peut exporter activement le GSSG comme cela a notamment été démontré sur des érythrocytes issus de nombreuses espèces animales (oiseaux, rongeurs, équidés, ovins, poissons, Homme) (Srivastava et Beutler, 1969 ; Kondo, 1980) ainsi que sur des hépatocytes de rat (Sies et al., 1972). De plus, dans le cadre d'un fonctionnement physiologique normal, il existe un renouvellement constant du glutathion au sein de l'organisme. Le GSH est ainsi majoritairement synthétisé dans le foie, relargué au travers de la membrane sinusoidale vers le plasma sanguin pour être redistribué aux organes périphériques. Il existe ainsi une homéostasie entre les organes, l'efflux de glutathion à partir du foie étant notablement accru en réponse à des besoins grandissant au niveau des organes périphériques (Lew et al., 1985 ; Pyke et al., 1986).

Il est donc possible qu'à la suite des expositions à l'uranium réalisées sur le *Danio* dans le cadre de notre travail, le glutathion ait été délocalisé du foie vers d'autres organes. Cette délocalisation pourrait ainsi avoir été initiée à la suite d'un stress oxydant à l'origine d'une accumulation de glutathion réduit au sein du cytosol des cellules hépatiques, ou bien à la suite d'une demande en glutathion de la part d'autres organes sujets à un stress oxydant. Cet efflux de glutathion réduit lors d'expositions à l'uranium a notamment été constaté *in vitro* par Pourahmad et al. (2006). Ces auteurs ont en effet travaillé sur des cultures d'hépatocytes de rat et ont

constaté qu'à la suite d'une exposition à l'uranium (50 μM), 85 % du glutathion présent dans les cellules hépatiques ont été oxydés en moins de 5 min et que le glutathion oxydé (GSSG) ainsi formé a alors été relargué par les cellules dans le milieu de culture.

Une chute du pool intracellulaire de glutathion peut donc être une conséquence possible de la présence d'uranium dans la cellule. Mais cette chute peut également être considérée comme un mécanisme préventif à l'action de l'uranium. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, le glutathion et l'uranium peuvent interagir lors d'un cycle générant des espèces réactives de l'oxygène (*cf.* § A.1.5.3.1.1) et certains auteurs ont ainsi constaté qu'une déplétion du pool de glutathion hépatocytaire peut permettre d'abaisser la génération d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que la production de lipides peroxydés (Pourahmad *et al.*, 2006).

3.1.2.2 - Conséquences probables sur l'action des métallothionéines

Lorsque l'on s'intéresse à l'étude de la toxicité des métaux, l'intérêt d'un suivi des métallothionéines (MT) comme biomarqueur est souvent mis en avant. Les métallothionéines sont des protéines ubiquistes de bas poids moléculaire caractérisées par leur richesse en cystéine (acide aminé pourvu d'un groupement thiol et qui représente de 20 à 30 % des acides aminés qui la composent) ainsi que par une structure remarquablement conservée au cours de l'évolution (Kille *et al.*, 1992). Dans des conditions physiologiques normales, on considère que leur fonction primaire est de participer au maintien de l'homéostasie vis-à-vis du cuivre et du zinc (Olsson, 1996). La synthèse des MT peut néanmoins être induite à la suite d'une exposition à des métaux non essentiels (Cd, Hg et Ag notamment), à des métalloïdes (As) (Eller-Jessen *et Crivello*, 1998) ou à des niveaux excessifs en cuivre et zinc chez le poisson (Roesijadi, 1992). Les MT séquestrent alors ces métaux par complexation au niveau des groupements thiols, fonctionnant de cette manière comme des protéines de détoxification (Roesijadi, 1992) et permettant aux organismes de s'acclimater à la présence de ces métaux.

L'intérêt du suivi des métallothionéines lors d'études portant sur des interactions métal/poisson au niveau de sites contaminés a déjà été démontré par différents auteurs (Hansen *et al.*, 2006a,b ; Marie *et al.*, 2006 ; Chan *et al.*, 2006). L'utilisation des MT en tant qu'indicateur d'exposition à des métaux chez les poissons ou d'autres organismes aquatiques a d'ailleurs fait l'objet de recommandations pour de nombreux programmes de biosurveillance (Roesijadi, 1992 ;

Olsson, 1996 ; Schiedek et al., 2006). Or, comme nous l'avons précisé précédemment, il n'y a pas d'interaction directe possible entre l'uranium et les groupements thiols. C'est pourquoi, compte tenu de leur mode d'action, les métallothionéines ne peuvent intervenir dans la gestion d'un stress induit par des métaux durs tels que l'uranium. Nous avons néanmoins choisi d'évoquer le cas des métallothionéines dans ce manuscrit puisque certains auteurs s'y sont intéressés dans le cas d'exposition à l'uranium chez le poisson. En effet, la notion de métaux "durs" et "mous" n'est pas souvent mentionnée lorsque l'on s'intéresse aux métaux, sa prise en compte ne suscite donc pas forcément l'intérêt des auteurs lors d'études menées sur les métaux. Ainsi, Cooley et al. (2000) ont choisi de suivre les concentrations en métallothionéines (MT) des tissus hépatiques et rénaux chez des corégones exposés à l'uranium. Comme nous pouvions le supposer, ils ont conclu leur étude sur le fait que les MT ne constituent pas un indicateur fiable de l'exposition à l'uranium. Néanmoins, leur étude n'aura pas été complètement vaine puisqu'ils ont tout de même constaté une induction de ces protéines après 10 j d'exposition à la plus forte dose testée. Cette induction n'est survenue que de manière transitoire puisqu'elle n'a pas été retrouvée ultérieurement. Les MT peuvent également agir en tant que molécules antioxydantes (en piégeant les radicaux libres) (Hamer, 1986 ; Sato et Bremner, 1993). Ce rôle des MT permettrait donc de relier l'induction observée par Cooley et al. (2000) à un stress oxydatif plus qu'à un effet direct de l'uranium.

3.1.3 - Synthèse relative à l'étude du stress oxydant

L'étude de paramètres biologiques impliqués dans le stress oxydant a ainsi permis de montrer que, suite à une exposition à l'uranium par voie directe, ce radioélément est capable d'induire des effets délétères sur les acteurs du système de défense cellulaire. Ainsi, le complexe cellulaire formé par les agents antioxydants hépatiques est altéré tant par le fait que les systèmes enzymatiques voient leurs capacités d'action être amoindries (des inhibitions de l'ordre de 15, 30 et 55 % ayant été observées au niveau des activités SOD, GPx et CAT respectivement), que par le fait que les stocks de glutathion intracellulaire soient déplétés (déplétion de 50 % environ).

Nos résultats sont donc en accord avec ceux disponibles dans la littérature traitant des effets de l'uranium chez les poissons. Labrot (1996) a en effet constaté des perturbations de marqueurs du stress oxydant, notamment au travers de diminutions des quantités de lipides peroxydés et peroxydables ainsi que des activités d'enzymes telles que la CAT, la GPx, la NADH

réductase, la NADPH réductase ainsi que la xanthine oxydase. De même, [Cooley et al. \(2000\)](#) ont décrit une élévation de la peroxydation lipidique.

Ces perturbations laissent donc penser que l'uranium serait capable d'induire une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène de manière rapide (dès les premières heures de contact) et très importante. En effet, étant donné les perturbations observées (inhibitions enzymatiques, déplétion du glutathion, augmentation de la peroxydation lipidique) il semblerait que les organismes soient incapables de mettre en place une réponse au stress induit par l'uranium comme cela est notamment décrit pour d'autres métaux lourds. En effet, différentes études portant soit sur l'effet des métaux lourds soit sur celui des radiations ionisantes ont conduit à l'observation de phénomènes inductifs pour certains paramètres du système antioxydant (induction de la synthèse *de novo* ou augmentation de l'efficacité catalytique). Ainsi, par exemple, [Abou-Seif et al. \(2003\)](#), ont montré une augmentation des activités SOD et CAT chez des rats soumis à des irradiations γ . Cette induction a alors été interprétée comme étant le résultat de plusieurs mécanismes possibles : la mise en place d'activités SOD-mimétiques de manière à faciliter le remplacement de l'activité SOD potentiellement altérée ou encore la promotion de la synthèse de nouvelles unités enzymatiques. Cette hypothèse d'une induction de la synthèse supposerait la surexpression du gène codant pour cette enzyme. Dans le cas de l'uranium, de tels mécanismes ne semblent pas être mis en place par les organismes, laissant supposer que les perturbations du système antioxydant sont trop importantes pour pouvoir être contrecarrées.

3.2 - Evaluation de la neurotoxicité

Comme nous avons pu le voir (§ A.II.4.3.1), l'acétylcholinestérase est impliquée dans la dégradation de l'acétylcholine au niveau des fentes synaptiques. De son bon fonctionnement dépend donc un codage correct de l'information nerveuse transmise. Du fait du caractère neurotoxique avéré de l'uranium, il semble donc essentiel d'étudier les effets d'une exposition à cet élément sur le système nerveux.

Le système cholinergique (dont le neurotransmetteur est l'acétylcholine, l'enzyme de dégradation est l'AChE et les récepteurs sont dits nicotiniques ou muscariniques) joue un rôle important dans de nombreuses fonctions neurocognitives (telles que la mémoire, l'apprentissage) ou

encore dans les mécanismes de contraction musculaire (tels que ceux intervenant dans la régulation du rythme cardiaque, des mouvements péristaltiques lors de la digestion ou encore de la nage).

Lors des différentes expérimentations, et notamment de l'expérimentation A, nous avons montré que l'effet de l'exposition à l'uranium sur le système cholinergique est double. L'activité de l'enzyme est tout d'abord inhibée (lors des toutes premières heures d'exposition) puis accrue (à des temps d'observation plus importants), pour revenir finalement à un niveau basal. L'amplitude ainsi que la cinétique de cette réponse se sont avérées être influencées par la concentration en uranium testée (plus cette concentration augmente, plus l'amplitude de la réponse augmente et plus chacune des étapes de la réponse est observée précocement). Il semblerait donc que ces effets de l'uranium sur l'activité de l'ACHé soient liés à l'accumulation de cet élément dans les tissus, tout comme cela a été montré pour les activités SOD et CAT dans le cadre de notre travail. Par contre, aucun effet de la composition isotopique de l'uranium n'a pu être dégagé, inscrivant les propriétés chimiques de l'uranium comme étant seules à l'origine de la toxicité observée.

Le seul examen de nos données ne nous permet pas d'expliquer les phénomènes étant à leur origine. Néanmoins, de nombreuses études menées sur des modèles de mammifères (rongeurs ou Homme) semblent évoquer des mécanismes reflétant exactement les modalités de la réponse que nous avons observée. Ainsi, à l'inhibition précoce (sans doute attribuable à des dommages oxydatifs ou à des modifications de l'environnement ionique de l'ACHé), ferait suite une surexpression du gène codant pour l'ACHé. Cette surexpression serait donc à l'origine d'une augmentation des niveaux d'activité de l'enzyme dans le tissu cérébral. Cependant, les variations de l'activité AChE observées dans le cadre de notre travail, même si elles semblent disparaître après quelques semaines, ne seraient pour autant pas sans conséquences à plus long terme. En effet, comme nous le verrons, le système cholinergique ne semble pas être restauré de manière à retrouver sa "configuration" d'origine, suggérant que des modifications à long terme du tissu cérébral sont à prévoir.

3.2.1 - Inhibition précoce de l'AChE...

3.2.1.1 - ... du fait de l'instauration d'un stress oxydant

L'inhibition observée lors des premières heures du contact de l'uranium avec les organismes peut s'expliquer, comme cela a été précédemment décrit, par l'instauration d'un stress oxydant dans le milieu intracellulaire du fait de la présence d'uranium. Cette inhibition oxydative de l'AChE a en effet été observée à différentes reprises.

C'est notamment le cas de l'étude d'[Abou-Seif et al. \(2003\)](#), portant sur l'évaluation des effets induits sur certains paramètres biologiques au niveau du foie, des reins, de la rate et du cerveau de rats à la suite d'irradiations γ . Cette étude (ayant entre autres consisté en un suivi des activités AChE, SOD, GR, CAT et du glutathion total présent au niveau plasmatique) a notamment permis de constater une inhibition progressive de l'activité AChE. Cette inhibition a été attribuée par les auteurs à des phénomènes d'oxydation (notamment des groupements thiols) et à la formation de ponts disulfures en réponse à la libération de radicaux libres au moment de l'irradiation (radiolyse de l'eau). Cette baisse de l'activité AChE a également été corrélée à une chute importante des quantités de glutathion total présent au sein du plasma sanguin. Pour expliquer cette corrélation, les auteurs rappellent en effet que le glutathion est un agent antioxydant qui peut notamment prévenir les phénomènes oxydatifs altérant des macromolécules telles que les enzymes et autres protéines. La chute du glutathion observée ne serait donc pas sans lien avec l'inhibition marquée de l'acétylcholinestérase.

Cette hypothèse d'une cause oxydative de l'inhibition de l'acétylcholinestérase est également étayée par l'étude de [Schallreuter et al. \(2004\)](#). Ces auteurs ont en effet étudié les mécanismes d'inactivation de l'AChE par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ils concluent leurs travaux en mentionnant le fait que les acides aminés impliqués dans les mécanismes d'oxydation sont les tryptophanes 432 et 435 ainsi que la méthionine 436. L'altération chimique de ces trois acides aminés conduit alors au déplacement ainsi qu'à la désorientation de l'histidine 440 du site actif de l'enzyme, inactivant ainsi cette dernière. Parallèlement, une chute de l'activité de la catalase cérébrale a également été constatée, confirmant l'instauration d'un stress oxydant.

L'étude de [Antonio et al. \(2003\)](#) relie également une inactivation de l'AChE a un stress oxydant chez des rats exposés durant leur développement embryonnaire et fœtal à des métaux lourds (cadmium et plomb). Le marqueur de stress oxydant suivi dans le cadre de cette étude (l'activité CAT), de même que le suivi de l'activité AChE ont en effet permis d'établir un lien entre l'instauration d'un stress oxydant (augmentation de l'activité CAT cérébrale) et une altération du système nerveux cholinergique (inhibition de l'activité AChE cérébrale).

Dans le cas de l'uranium, l'étude de [Briner et Murray \(2005\)](#) menée sur des rats durant plusieurs mois a également permis de démontrer qu'un stress oxydant est susceptible de s'instaurer au niveau cérébral à la suite d'une contamination à l'uranium appauvri par l'eau de boisson (diagnostic établi au vu de mesures de la peroxydation lipidique). Ces auteurs ne se sont pas attachés à suivre l'activité AChE mais ont noté que des différences de comportement (exploration d'un nouvel environnement, temps alloué à la toilette, défécation, etc.) survenaient dès 2 semaines d'exposition à 150 mg/L d'uranium appauvri et étaient maintenues jusqu'à la fin de l'expérimentation (6 mois).

Au bilan, nous retiendrons donc que l'inhibition de l'activité AChE observée dans le cadre de notre étude semble étroitement liée à l'instauration d'un stress oxydant au sein du tissu cérébral. Néanmoins, pour en être sûr, il aurait été bon de réaliser des mesures en ce sens . Ne disposant pas de ces éléments de confirmation, nous ne pouvons donc que rester au stade de l'hypothèse.

3.2.1.2 - ... du fait de la présence d'ions métalliques dans le milieu

Une autre hypothèse permettant d'expliquer la modulation de l'activité de l'AChE à la suite d'un stress métallique peut également être formulée. Cette hypothèse serait basée sur un changement conformationnel de l'enzyme du fait de la présence d'ions libres métalliques dans l'environnement proche de l'enzyme. En effet, les régions codantes de l'AChE ont été séquencées chez de nombreux modèles biologiques, vertébrés et invertébrés, tels que les insectes, les nématodes, les poissons, les reptiles, les oiseaux et quelques mammifères dont l'Homme. L'étude de la structure tridimensionnelle de cette enzyme, notamment par cristallographie, a d'abord été réalisée sur un poisson, la torpille (*Torpedo californica*) avant d'être élargie à la souris, à la drosophile ainsi qu'à l'Homme. Les structures tridimensionnelles ainsi établies se sont avérées être fondamentalement similaires. Plusieurs régions fonctionnelles se distinguent : le site actif

accueillant l'acétylcholine (niché au fond d'une cavité profonde et étroite formée par repliement de l'enzyme), un site de fixation périphérique (qui semble très important notamment vis-à-vis des fonctions annexes, "non catalytiques" de l'AChE), un site anionique périphérique et des sites fonctionnels permettant l'oligomérisation de plusieurs unités enzymatiques ou l'association à des unités protéiques d'ancrage (Soreq et Seidman, 2001).

En dépit du fait que l'acétylcholine doive parcourir une distance relativement importante avant d'atteindre le site actif de l'enzyme, l'AChE est l'une des enzymes dont l'action est des plus rapides. On considère en effet que la vitesse de réaction est uniquement limitée par la constante de diffusion moléculaire (Zimmerman et Soreq, 2006). Une des théories émises en vue d'expliquer cette rapidité est basée sur l'importance du champ électrique créé autour de l'enzyme. Il a en effet été proposé que ce champ électrique était une aide à la catalyse par le fait qu'il attire le substrat cationique (l'ACh) et repousse le produit anionique formé (l'acétate), influant ainsi sur la formation du complexe enzyme/substrat au niveau du site actif (Ripoll et al., 1993 ; Radic et al., 1997). Une modification de ce champ électrique très particulier pourrait donc être à l'origine d'une modulation de l'activité de l'enzyme.

Cette hypothèse d'une modification du champ électrique dans l'environnement proche du site actif de l'enzyme a notamment été retenue par différents auteurs ayant constaté une variation de l'activité AChE à la suite d'exposition à des agents toxiques. C'est notamment le cas de Romani et al. (2003) qui ont examiné les variations possibles de l'activité de l'AChE dans le cerveau et le muscle blanc d'un téléostéen de Méditerranée (*Sparus auratus*) exposé durant 20 j à des concentrations sublétales de cuivre (100 et 500 µg/L). Ces auteurs ont ainsi observé une augmentation de l'activité spécifique et de l'efficacité catalytique de l'AChE dans ces tissus. Toujours dans le cadre des travaux de Romani et al., cette augmentation de l'efficacité catalytique a également été constatée *in vitro* sur des extraits tissulaires exposés à du Cu²⁺. Cet effet activateur des ions Cu²⁺ a ainsi été attribué à une modulation de la conformation structurale de l'AChE du fait de changements de la composition ionique du milieu environnant. De même, il a été montré qu'une force ionique accrue est capable d'augmenter l'efficacité catalytique de l'AChE chez la torpille, *Torpedo californica* (Berman et Leonard, 1990). Ces études ont donc permis de montrer l'influence de l'environnement ionique sur la conformation de l'AChE du fait d'interactions entre les ions du milieu et le site périphérique anionique de l'enzyme.

Si l'on tient compte du fait que l'uranium peut atteindre le tissu cérébral, l'hypothèse d'un rôle joué par les ions uranyles (UO_2^{2+}) dans la modification de la composition ionique du milieu pourrait donc également expliquer l'observation d'une modulation de l'efficacité catalytique de l'enzyme, telle que nous l'avons observée lors des tous premiers temps de notre étude. Néanmoins, une fois encore, nous ne disposons pas des éléments permettant l'infirmer ou à la confirmation de cette hypothèse.

3.2.2 - De l'inhibition à l'activation enzymatique

Nous avons également pu constater qu'une augmentation de l'activité AChE chez les organismes exposés à l'uranium faisait suite à l'inhibition initialement observée. Cette augmentation serait, selon divers auteurs, la conséquence d'une surexpression du gène codant pour cette enzyme.

En effet, un stress accru, de même que l'action d'inhibiteurs de l'AChE (comme c'est le cas de l'uranium), peuvent être à l'origine d'une présence d'acétylcholine en des quantités anormalement élevées au niveau synaptique. Cette accumulation d'acétylcholine au niveau synaptique serait la conséquence d'une augmentation de durée de vie biologique du neurotransmetteur, conséquence directe de la baisse d'activité de l'enzyme chargé de son hydrolyse : l'AChE. Cette altération du codage neurochimique assuré par l'acétylcholine serait alors à l'origine d'une phase d'hyperexcitation neuronale. La stimulation intense des récepteurs muscariniques du fait de cette hyperexcitation conduirait alors à une inhibition de type "feedback" visant à arrêter la transmission cholinergique (Nitsch et al., 1998 ; Salmon et al., 2005). De manière à induire cette hypoexcitation, l'expression du gène codant pour le facteur de transcription c-Fos est induite. L'augmentation de la production de facteurs c-Fos a ainsi été observée *in vivo* chez le rat soumis au stress d'une nage forcée ou exposé à un inhibiteur de l'AChE ainsi qu'*in vitro* sur des coupes histologiques de cerveaux de rats exposés à un inhibiteur de l'AChE (Kaufer et al., 1998).

Ce facteur va alors intervenir au niveau de sites spécifiques de l'ADN de manière à induire une cascade d'évènements concourant à réguler la transmission de l'influx nerveux. Cette liaison du facteur c-Fos au niveau de l'ADN va ainsi permettre de réguler la transcription d'un ensemble de gènes-clés du système cholinergique, notamment les gènes codant pour l'acétylcholinestérase (AChE), la choline acétyltransférase (ChAT) et le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine

(VACHT). On note alors une augmentation de la transcription du gène codant pour l'AChE et une réduction de la transcription des gènes codant pour la ChAT et le VACHT. L'action combinée de ces réponses va ainsi permettre d'abaisser la biodisponibilité de l'acétylcholine du fait d'une production et d'un stockage réduits ainsi que d'une dégradation accrue du neuromédiateur. Cette chute de neuromédiateur au niveau synaptique va alors concourir à une désexcitabilité neuronale.

Les observations réalisées lors de notre étude ne nous permettent pas de juger si l'augmentation d'activité AChE est réellement attribuable à une régulation de l'expression du gène codant pour cette enzyme. Néanmoins, l'importante similitude de nos résultats avec ces mécanismes semble conforter cette hypothèse.

3.2.3 - Conséquences à long terme de cette réponse bimodale

A l'issue de l'examen de ces mécanismes d'inhibition de l'activité de l'AChE puis d'induction de sa transcription, nous pourrions donc penser que le système cholinergique des organismes exposés à l'uranium retrouve ses caractéristiques initiales. Cependant, si l'on se réfère aux études menées chez l'Homme et différentes espèces de rongeurs, il semblerait que la régulation de transcription de l'AChE fasse l'objet de modulations subtiles mais aux conséquences néanmoins importantes. Bien que les résultats de notre travail ne nous permettent pas d'étayer les hypothèses suivantes, il nous a toutefois semblé important de les mentionner.

3.2.3.1 - Production d'une nouvelle forme d'AChE

Il est important de noter que l'hyperexcitation initiale ne va pas seulement induire une modulation de la transcription des gènes, elle va également être à l'origine de modifications de la traduction de certains d'entre eux et notamment de celui codant pour l'AChE. Ainsi, la synthèse *de novo* induite en réponse à son inhibition ne va pas remplacer l'enzyme sous sa forme constitutive (appelée AChE-S pour AChE synaptique). L'enzyme synthétisée va en effet être une isoforme légèrement différente appelée "*read-through*" AChE (AChE-R).

En effet, les gènes codant pour l'AChE, quelle que soit l'espèce considérée (poissons, souris, Homme, etc.) sont organisés de manière à pouvoir être à l'origine de la formation de différentes formes de l'enzyme. Selon l'épissage^① réalisé au niveau de l'ARN pré-messager en vue de l'obtention de l'ARN messager mûre, différents domaines peuvent apparaître sur le produit

protéique final (Camp et al., 2005). Trois variants possibles de l'enzyme peuvent être produits, chacun ayant une séquence C-terminale différente : un variant synaptique (AChE-S), un variant érythrocytaire (AChE-E) et un variant “*readthrough*” (AChE-R) (Soreq et Seidman, 2001 ; Meshorer et Soreq, 2006). L'expression “*readthrough*” en anglais signifie qu'une lecture d'un bout à l'autre de l'ARNm a été effectuée, à la différence d'une lecture normale qui implique l'épissage de certaines régions de l'ARNm avant sa traduction sous la forme de l'enzyme. Dans le cas de la synthèse *de novo* d'acétylcholinestérase, un des exons (appelé “pseudo-intron 4”) n'est pas excisé, l'ARN mature contient donc cette séquence, ce qui aboutit à la synthèse d'une enzyme différente : la “*read-through*” AChE. Or, cette isoforme possède des propriétés différentes de l'AChE-S.

La différence de séquence C-terminale de ces isoformes de l'enzyme leur confère des propriétés distinctes d'assemblage. Ainsi, la formation d'oligomères d'AChE ainsi que leur association à des sous-unités non catalytiques va alors être spécifique à chaque variant. L'AChE-S va ainsi pouvoir former des dimères par pontage disulfure. A ces dimères deux autres monomères peuvent venir se greffer par le biais d'interactions hydrophobes. Ces tétramères peuvent alors se lier à des sous unités non catalytiques telles que des protéines proches du collagène. Ces sous-unités pseudo-collagènes peuvent alors former des superstructures en associant différents tétramères entre eux, pouvant former des complexes enzymatiques comprenant 4, 8 ou 12 sous-unités AChE-S. L'AChE-E peut quant à elle se lier aux groupements glycoposphatidyl inositol (GPI) présents à la surface externe des érythrocytes. L'AChE-R ne dispose quant à elle d'aucune région qui permettrait la formation de pontage avec d'autres molécules (qu'il s'agisse d'autres AChE-R ou de protéines d'ancrage). C'est pourquoi cette dernière isoforme n'existe que sous forme monomérique et soluble (Soreq et Seidman, 2001 ; Meshorer et Soreq, 2006). Ainsi, il est généralement admis que l'acétylcholine est hydrolysée au niveau de la fente synaptique par les tétramères d'AChE-S. Selon que l'on se place à l'interface neuromotrice ou au sein du tissu nerveux, ces tétramères sont liés par le biais de molécules proches du collagène aux cellules formant la jonction neuromusculaire (neurone/cellule musculaire), ou par le biais d'autres sous-unités structurales aux cellules formant la jonction neuro-neuronale. Les monomères d'AChE-R quant à eux resteraient libres au sein de la fente synaptique quelle qu'elle soit. L'association aux sous-unités non catalytiques va donc déterminer la localisation subcellulaire de chaque isoforme (Soreq et Seidman, 2001).

A notre connaissance, une seule étude menée dans le domaine de l'écotoxicologie s'est intéressée à la mesure des quantités relatives des isoformes de l'AChE à la suite de l'exposition à un inhibiteur de cette enzyme (Badiou et al., *in press*). Il s'agit de travaux menés sur un modèle biologique encore peu utilisé dans le cadre de l'étude d'effets de contaminants environnementaux : l'abeille (*Apis mellifera*). Les organismes ont été exposés à des insecticides : la deltaméthrine (appartenant à la famille chimique des pyréthrinoïdes) et/ou le primicarbe (un carbamate). A la suite de cette exposition, des mesures de l'activité de l'AChE ont été pratiquées avec un intérêt particulier porté sur la mesure des différentes isoformes présentes : l'AChE membranaire (soit l'AChE-S) et l'AChE soluble (soit l'AChE-R). Les auteurs ont alors constaté une augmentation de la forme soluble de l'enzyme chez les organismes n'ayant pas survécu aux traitements comportant le pyréthrinoïde. Il semblerait donc que la production de l'isoforme "R" de l'AChE ait bien lieu lors de l'exposition d'organismes à des contaminants et, qu'en outre, la production de cette isoforme ne soit pas sans conséquences sur le devenir des organismes. Cette étude écotoxicologique nous paraît donc constituer une base sur laquelle nous appuyer pour suggérer que, dans le cadre de nos travaux, l'exposition à l'uranium serait susceptible d'induire des effets à long terme sur le système cholinergique cérébral des poissons zèbres.

3.2.3.2 - Conséquences possibles de la présence de cette isoenzyme

Pour comprendre l'intérêt conféré par la production d'une isoforme différente de celle initialement présente (ou, tout au moins, pour disposer de quelques clés d'interprétation), il faut s'intéresser à la "double-vie" menée par cette enzyme qu'est l'AChE.

En effet, il a récemment été montré que l'AChE possède des activités parallèles à l'activité catalytique pour laquelle cette enzyme est principalement connue. Ces activités annexes ont ainsi été qualifiées de "non classiques" par les divers auteurs s'y étant intéressés. Parmi ces rôles "non classiques" joués par l'AChE et pour lesquels le site de fixation périphérique de l'enzyme serait largement impliqué, on peut notamment citer son implication dans des processus aussi divers et variés que l'hématopoïèse, la formation du tissu osseux ou encore la transformation des cellules vers un phénotype néoplasique (Lapidot-Lifson et al., 1989 ; Soreq et Seidman, 2001).

Or, il semblerait que les différentes isoformes de l'AChE, bien qu'elles partagent la même activité hydrolytique, diffèrent notamment de part leurs fonctions "non classiques". Par exemple,

l'AChE-S s'avèrerait être un composant essentiel des jonctions neuromusculaires (Seidman et al., 1995). A ce titre, on peut se poser la question des conséquences de son remplacement par l'AChE-R à la suite d'un stress. De même, des études cytochimiques attestent du fait qu'il existe une régulation spatio-temporelle de l'AChE au cours des toutes premières heures de l'embryogénèse, au cours de l'extension des neurites^① et du développement des muscles de l'embryon, ainsi qu'à l'initiation de la synaptogénèse^② (Soreq et Seidman, 2001 ; Zimmerman et Soreq, 2006). Or, il a également été montré que seule l'isoforme AChE-S est impliquée dans la neuritogénèse (Karpel et al., 1996). Nous pouvons donc supposer que l'exposition de stades embryo-larvaires de poissons à des composés anticholinestérasiques tels que l'uranium pourrait, si elle conduit à une surproduction de l'AChE-R, induire de profondes altérations de la structure même du tissu nerveux en développement.

Se repose donc la question de l'intérêt d'une surproduction de l'AChE-R au détriment de l'AChE-S à la suite d'un stress. Les auteurs s'étant intéressés à cette question n'ont, à ce jour, pas réussi à reconstituer l'ensemble du puzzle, et de grandes interrogations restent encore en suspens.

Parmi les éléments permettant de démontrer l'avantage d'un tel changement du ratio entre les isoformes S et R, on peut tout d'abord évoquer le fait qu'il semblerait que cette réponse à une situation de stress constitue une stratégie de défense puisque les individus adoptant cette stratégie présentent alors des signes pathologiques moins prononcés que des individus transgéniques incapables de cette adaptation (Sternfeld et al., 2000 ; Sklan et al., 2006). Ainsi, il a été montré que des souris incapables de produire l'AChE-R, présentent notamment certaines manifestations neuropathologiques pouvant entre autres conduire à une détérioration progressive des tissus nerveux et musculaires, des dysfonctionnements neuromoteurs, une hypersensibilité aux inhibiteurs de cholinestérasés de même qu'une altération de la diffusion des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique (Shapira et al., 2000 ; Cohen et al., 2002 ; Farchi et al., 2003 ; Meshorer et al., 2005). Dans un toute autre registre, Meshorer et Soreq (2006) ont constaté que les niveaux sanguins d'AChE-R sont inversement corrélés avec la tendance à l'anxiété des individus. La capacité des organismes à surproduire l'AChE-R en réponse à différents stressseurs pourrait donc être un élément déterminant dans la capacité à faire face à des stimuli anxiogènes. Par conséquent, il y aurait donc un bénéfice physiologique à l'épissage différentiel du gène codant pour l'AChE en réponse à un stress.

Néanmoins, à l'opposé de ces avantages, de nombreux inconvénients viennent souligner le caractère ambigu de cette réponse. Certaines études font ainsi mention du fait que la production de l'isoforme R de l'ACHé puisse être à l'origine d'effets néfastes sur le système nerveux. Ainsi, chez des souris transgéniques surexprimant le gène codant pour l'ACHé humaine et donc surexprimant l'ARNm codant pour l'ACHé-R (de manière à limiter l'excitation neuronale) [Cohen et al. \(2002\)](#) ont noté des altérations comportementales de même qu'une réduction notable des capacités d'apprentissage et de mémorisation. Par exemple, lorsque ces souris sont confrontées à un nouveau congénère, la durée des interactions sociales s'établissant avec ce dernier est significativement plus importante que la durée de ces interactions entre des souris témoins et ce même individu. De même, le temps passé à la reconnaissance de cet individu après seulement une séparation de quelques minutes est significativement augmenté chez les souris transgéniques comparativement aux souris témoins. Enfin, confrontées à un nouvel environnement, les souris transgéniques montrent une activité locomotrice plus importante que chez des souris témoins. D'autres articles décrivant un dysfonctionnement du système cholinergique corrélé à des changements des comportements sociaux viennent conforter ces observations ([Winslow et al., 1995](#) ; [Gheusi et al., 1994](#)).

Au bilan, nous pouvons constater qu'en plus de cette fonction protectrice apparente, l'ACHé-R pourrait également induire des changements cellulaires néfastes à long terme. [Meshorer et Soreq \(2006\)](#) ont ainsi suggéré que des niveaux élevés d'ACHé-R soluble et diffusible pourraient permettre de piéger les inhibiteurs de cholinestérase circulant dans l'organisme, agissant par là même comme un agent de protection et limitant les manifestations toxiques, du moins pour un temps. Cependant, les auteurs insistent sur le fait qu'une surproduction prolongée d'ACHé-R puisse également être à l'origine de dommages.

3.2.4 - Synthèse relative à l'étude de la neurotoxicité

Cette étude aura donc permis de montrer qu'une exposition à l'uranium par voie directe, même sur des temps très courts de l'ordre de quelques jours, est susceptible d'induire des effets non négligeables sur le tissu cérébral et, notamment, sur la transmission de l'information nerveuse. Ainsi, l'inhibition de l'activité AChE observée dès les premiers jours laisse supposer un codage erroné de l'information nerveuse véhiculée par le système cholinergique. Les organismes semblent

néanmoins pouvoir réagir face à cet effet inhibiteur de l'uranium. En effet, une suractivation de l'enzyme est constatée assez rapidement. Ces résultats sont donc très novateurs puisqu'à notre connaissance notre étude est la première menée sur le modèle poisson au cours de laquelle une réponse biphasique de l'activité AChE est constatée. En effet, la plupart des études écotoxicologiques incluant des mesures de l'activité AChE ne font mention que d'une inhibition de l'enzyme et cela, quel que soit le contaminant étudié (Weiss, 1958 ; Mineau, 1991 ; Szabo et al., 1992 ; Galgani et al., 1996 ; Payne et al., 1996 ; Bocquené et al., 1997 ; Dembélé et al., 1999 ; Kirby et al., 2000 ; de la Torre et al., 2000 et 2002 ; Fulton et Key, 2001 ; Bocquené et Galgani, 2004).

Cependant, au vu des conclusions faites à l'issue de différentes études décrivant les conséquences d'une inhibition cholinestérasique, il semblerait que la réponse compensatoire des organismes observée dans notre travail ne restaure pas le système cholinergique tel qu'avant son altération. Le fait qu'une isoforme différente de l'AChE soit produite à la suite d'un stress n'est en effet pas anodin, surtout si l'on considère que l'AChE est dotée de fonctions annexes à sa fonction catalytique et que chaque isoforme ne joue pas exactement les mêmes rôles dans ces domaines "non classiques" de la fonction de l'AChE. Nous pouvons donc nous attendre à une dérive de la structuration même du tissu cérébral sur le long terme si la pression de contamination à l'origine de l'inhibition de la forme normale de l'AChE est maintenue.

3.3 - Evaluation de la génotoxicité

3.3.1 - L'approche multianalytique : quelques remarques

3.3.1.1 - Complémentarité de l'essai des comètes et de la cytométrie en flux

Au cours de ces travaux, deux techniques analytiques ont été mises en œuvre dans le but d'évaluer le potentiel génotoxique d'une exposition à l'uranium par voie directe : la version alcaline de l'essai des comètes et une technique de cytométrie en flux.

Alors que l'essai des comètes a fait ses preuves dans de nombreux domaines, notamment en écotoxicologie aquatique (Lee et Steinert, 2003), la seconde technique utilisée n'a, à ce jour, fait l'objet d'aucun consensus scientifique. En effet, cette utilisation de la cytométrie en flux dans le

cadre de mesures de génotoxicité a été développée lors de mon stage de recherche de DEA mené au Laboratoire des Sciences de l'Environnement (ENTPE de Vaulx en Velin) en collaboration avec l'UMR 754 (INRA-ENVL de Lyon) (Barillet, 2003). Nous avons donc choisi d'effectuer une étude comparative des deux approches dans le cadre de notre présent travail. Cependant, l'étude cytométrique de l'intégrité du matériel génétique des cellules hépatiques et gonadiques s'est avérée impossible (l'étape d'isolement cellulaire est en effet incompatible avec une procédure de congélation nécessaire à un transport jusqu'à Lyon, où est situé le cytomètre).

Au cours de notre étude de l'impact d'une exposition à l'uranium sur l'intégrité du matériel génétique de cellules de *Danio rerio*, nous avons pu voir que l'uranium est effectivement un élément génotoxique. Cette génotoxicité s'exprime à la fois par le biais de ses propriétés chimiques et radiologiques, notamment pour les conditions d'exposition les plus drastiques (durées, concentrations massiques et/ou activités radiologiques importantes).

Cependant, dans le détail, les conditions induisant un effet génotoxique significatif ne sont pas exactement les mêmes selon que l'on s'intéresse aux résultats obtenus par l'essai des comètes ou par la cytométrie de flux.

Lors d'un stress à la fois chimique et radiologique (expérimentation C), le suivi de l'intégrité de l'ADN érythrocytaire par l'essai des comètes a permis de révéler une augmentation des dommages chez les organismes exposés à 20 µg/L (après 10 j) et 100 µg/L (dès 3 j) d'uranium présentant de faibles activités radiologiques (conditions B-C et E-F). Les effets révélés par le biais de cet essai semblent donc plus liés à la quantité d'uranium ayant transité par les organismes qu'à l'activité radiologique de l'élément. Ces effets semblent de plus transitoires (indiquant la mise en place de systèmes de réparation) puisque la tendance dessinée après 3 j chez les organismes exposés à 100 µg/L d'uranium total disparaît dès 10 j chez ces derniers et que l'effet observé à 10 j chez les organismes exposés à 20 µg/L d'uranium total disparaît également à 20 j. L'essai des comètes permettrait donc de révéler préférentiellement les effets chimiotoxiques de l'uranium (les variations d'activités radiologiques n'ayant que peu d'influence sur les résultats).

A l'inverse, après 10 j d'exposition à de fortes activités radiologiques (conditions D, F et G), l'analyse cytométrique fait apparaître une altération du matériel génétique érythrocytaire non

décelée par l'essai des comètes. La cytométrie en flux serait donc plus apte à détecter les altérations radiologiques de l'ADN par les rayonnements ionisants émis par l'uranium.

Chacun des deux tests semble donc adapté à la détection d'une altération génotoxique de l'ADN érythrocytaire à la suite d'une exposition à l'uranium. Néanmoins, les dommages mis en évidence semblent être de nature différente. Dans le cas de l'essai des comètes, les types de dommages révélés sont bien connus et identifiés (cassures simple et double brins, sites abasiques alcali-labiles). Par contre, du fait du caractère novateur de l'utilisation de la cytométrie en flux dans le cadre de l'évaluation du potentiel génotoxique d'un contaminant, les types de dommages révélés restent imprécis. Le principe de ce test repose sur la relaxation de la structure des nucléoïdes du fait d'un abaissement des forces de surenroulement normalement exercées. Il a ainsi été supposé que les cassures double brins pouvaient induire une baisse importante des forces de condensation de l'ADN. Les cassures simple brin ne seraient quant à elles à l'origine que d'un effet limité sur la structure globale des nucléoïdes. Selon ce principe, la cytométrie en flux serait donc apte à détecter les dommages génotoxiques relatifs à la fragmentation du matériel génétique (cassures simple et double brins), avec la particularité de révéler de façon beaucoup plus spécifique les cassures double brins. En effet, la présence de cassures bicaténaires, même en faible nombre, induirait une augmentation très importante du diamètre des nucléoïdes (paramètre d'intérêt dans cette technique), à la différence des cassures monocaténaires, aux conséquences plus limitées. Or, l'effet direct de l'action des rayonnements ionisants sur le matériel génétique (qui vient se surajouter aux dommages indirects résultant de l'ionisation des molécules d'eau) prend généralement la forme de cassures double brins. Ceci expliquerait donc pourquoi les dommages radiologiques sont potentiellement mieux détectés par l'analyse cytométrique.

Un examen attentif des résultats nous permet donc de voir que l'essai des comètes semble plus apte à révéler des effets génotoxiques trouvant leur origine dans les caractéristiques chimiques de l'uranium, la cytométrie semblant quant à elle plus sensible à la détection des effets radiologiques. La prise en compte de cette différence dans la nature des événements détectés par chacun des deux essais nous permet donc de disposer de nouvelles clés d'interprétations.

3.3.1.2 - Les limites constatées

L'essai des comètes, comme la cytométrie de flux, présentent des limites de quantification (qu'il s'agisse de limite basse ou de limite haute) entre lesquelles s'inscrit le domaine d'application qui leur est propre.

Ainsi, l'essai des comètes est connu pour être très sensible, permettant de révéler de faibles niveaux de dommage. Il a ainsi été décrit comme pouvant détecter jusqu'à 100 cassures de brins par génome (Monleau, 2005). A l'inverse, pour des dommages croissants, les capacités de discrimination entre différents niveaux se réduisent. On observe ainsi souvent un plateau au-delà duquel les figures de comètes sont tellement diffuses (les brins d'ADN disparaissant au sein du gel d'agarose) qu'il devient difficile de prendre en compte la totalité des fragments d'ADN dans la quantification des différentes parties de la comète, et notamment de la queue. On assiste alors généralement à une sous-estimation du niveau de dommage, une partie des brins d'ADN appartenant à la queue n'étant alors pas prise en compte dans l'estimation des paramètres de taille et de fluorescence de cette dernière. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, ce cas ne semble pas s'être posé, les figures de comètes n'ayant pas atteint des niveaux de fragmentation tels que leur traitement par le logiciel d'analyse d'image soit notablement affecté.

La technique de cytométrie en flux retenue pour cette étude ayant été développée lors d'un précédent stage de recherche et n'ayant à ce jour fait l'objet d'aucune publication, nous ne disposons que de très peu d'informations quant à ses limites de détection et de quantification des dommages mesurées (Barillet, 2003). Cependant, dans le cadre même de cette thèse, il semblerait que la limite haute de détection ait été franchie. En effet, d'après les principes physiques sur lesquels sont basés cette technique, la présence de cassures au sein des nucléoïdes induit normalement une augmentation du diamètre de ces derniers. Or, lors de l'expérimentation C, une diminution significative de ce paramètre a été observée. La taille des nucléoïdes obtenus après la lyse de l'ADN érythrocytaire issu d'organismes exposés à 20 µg/L d'²³³U (activité radiologique nominale : 7 150 Bq/L) a ainsi été successivement 42 % plus importante (à 10 j) puis 14 % moins importante (à 20 j) que celle des témoins. Cette chute importante de la taille des nucléoïdes pourrait, après réflexion, être attribuable à un endommagement très important de l'ADN. En effet, les nucléoïdes présentant un taux d'endommagement très important pourraient ne plus conserver

leur intégrité du fait des conditions drastiques dans lesquelles ils sont maintenus (mis en suspension puis soumis aux pressions d'aspiration et de conduction au sein de l'appareil). Ces "pelotes" d'ADN verraient alors leur structure se désagréger, cette désagrégation étant alors à l'origine de l'apparition d'un nombre important d'évènements de petite taille (débris), rendant alors impossible toute quantification des dommages.

3.3.1.3 - Détection des dommages oxydatifs par l'essai des comète

Dans le cadre de la dernière expérimentation réalisée, une version modifiée de l'essai des comètes a été employée de manière à détecter la présence de dommages oxydatifs au sein du matériel génétique de cellules issues de poissons exposés à l'uranium. Cependant, l'examen des résultats obtenus à l'issue de cette analyse n'a pas permis de révéler la présence de dommages supplémentaires à ceux obtenus par le biais de la version classique de l'essai des comètes.

Néanmoins, il doit être rappelé que la technique employée pour cette étude des dommages oxydatifs à l'ADN a été mise en place au laboratoire sur la base de la consultation d'articles scientifiques, aucune collaboration avec une équipe maîtrisant l'essai n'ayant été possible. Il n'est donc pas exclu que certaines subtilités des protocoles aient pu nous échapper, influant ainsi sur la capacité et/ou la sensibilité de ce test à révéler de manière spécifique certains dommages oxydatifs.

De plus, il faut rappeler que cette modification de l'essai des comètes n'a, pour l'essentiel, fait l'objet que de publications décrivant des expérimentations menées *in vitro*. Ce constat nous porte donc à nous interroger sur les limites de cette technique lorsqu'elle est utilisée dans le cadre d'études *in vivo*.

En conclusion, nous ne pouvons pas retenir l'absence de résultats significatifs pour cette étude comme la preuve de l'absence de mécanismes oxydatifs ayant conduit à l'altération du matériel génétique.

3.3.2 - Tendances générales observées

Dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité de l'uranium chez le *Danio*, deux tendances générales ont été constatées. Pour certaines conditions d'exposition à l'uranium, un niveau d'endommagement plus faible que celui des témoins a été observé chez les organismes exposés

(dans la suite du document, nous désignerons cette différence sous le terme de “diminution”). A l'inverse, pour d'autres conditions d'exposition, une augmentation du niveau de dommages a été mise en évidence. Nous verrons donc dans quels cas de figure apparaissent ces tendances et tenterons d'expliquer l'origine de telles observations.

3.3.2.1 - “Diminution” du niveau de dommage

Une “diminution” du niveau de dommage à l'ADN a été constatée à deux reprises dans le cadre de ce travail.

Le premier cas de figure dans le cadre duquel une telle “diminution” a été constatée concerne des expositions à une faible pression de contamination. Un niveau d'endommagement plus faible que celui des témoins a ainsi été observé au niveau de l'ADN érythrocytaire de poissons exposés à différentes concentrations d'uranium appauvri (20, 100 et 500 µg/L - manip A) après seulement 5 j. Précisons ici que nous assimilons ces expositions à des expositions “de faible niveau” en nous basant sur le fait que les premiers effets “réellement” génotoxiques (augmentation du niveau de dommage) n'ont été observés qu'après 20 j d'exposition à ces mêmes concentrations.

Le second cas de figure ayant conduit à l'observation d'un niveau de dommage “diminué” a été tout autre. En effet, lors de l'expérimentation C, l'examen du tissu hépatique a permis de montrer une diminution significative de l'endommagement de l'ADN d'hépatocytes issus d'organismes exposés durant 10 j à des conditions pour lesquelles un effet génotoxique s'était manifesté après seulement 3 j (conditions D et F). Dans ce cas, nous pouvons donc considérer que la “diminution” du niveau d'endommagement est apparue à des niveaux d'exposition supérieurs à ceux pour lesquels un effet génotoxique était apparu. Nous assimilerons donc cette tendance à une réponse à de forts niveaux d'exposition.

Afin de comprendre les mécanismes ayant conduit à de telles observations, il est important de rappeler que les dommages mesurés par les tests de génotoxicité sont la résultante de deux composantes : les dommages initiaux (induits par la présence du toxique dans le milieu) et les facultés de réparation (du fait de l'activation du système cellulaire de contrôle des dommages). Au premier facteur (les dommages) vient donc se déduire le second (la réparation) pour obtenir les dommages rémanents à l'instant t de la mesure.

Les cellules disposent d'un arsenal très complet pour contrôler d'intégrité de leur ADN. En effet, en l'absence de toute perturbation exogène due à l'exposition à un contaminant chimique et/ou à des rayonnements ionisants, les cellules doivent constamment faire face à des altérations de leur matériel génétique. Ces altérations sont majoritairement attribuables à la présence dans l'environnement intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène générées par le métabolisme des cellules aérobies. Ces cellules disposent donc, de manière intrinsèque, de systèmes de contrôle afin de se prémunir et de réparer les dommages causés à l'ADN (et notamment ceux attribuables aux effets des espèces réactives de l'oxygène) ainsi que pour éliminer les cellules endommagées. Ces mécanismes, nécessaires à la préservation du génome, sont multiples. La prévention des dommages est ainsi notamment assurée par les processus de détoxification des radicaux libres (enzymes et autres molécules non enzymatiques impliquées dans la gestion d'un stress oxydant). Les réparations, intervenant une fois les dommages apparus, sont quant à elles réalisées par le biais d'enzymes hautement spécifiques (Fpg, Endo III par exemple). Enfin, quand le fonctionnement des deux premières lignes de défense cellulaires ne suffit plus à assurer un maintien satisfaisant de l'intégrité du matériel génétique, les cellules trop endommagées peuvent devenir nécrotiques ou entrer en apoptose et ainsi être éliminées du tissu *via* l'action de cellules immunitaires (Pollycove et Feinendegen, 2003).

Selon une étude menée par Pollycove et Feinendegen (2003), les cellules, par le biais de leur activité métabolique, produiraient ainsi 10^9 radicaux libres par cellule et par jour (étude menée chez l'Homme). La détoxification des espèces réactives de l'oxygène réduirait le nombre de ces dommages oxydatifs générés de manière endogène à environ $10^6/\text{cellule/j}$. La réparation de ces dommages résulterait en un niveau basal de dommages persistants à environ $10^2/\text{cellule/j}$. Enfin, l'élimination des cellules les plus fortement touchées réduirait le nombre de mutations rémanentes à $1/\text{cellule/j}$. L'accumulation progressive (au cours de la vie des organismes) de ces altérations persistantes de leur matériel génétique est ainsi à l'origine du vieillissement, des maladies dégénératives ou encore de cancers.

Or, les différents acteurs du système de contrôle des dommages à l'ADN (intervenant dans la prévention ou la réparation des dommages ainsi que dans l'élimination des cellules trop fortement altérées) sont susceptibles d'être stimulés par de faibles concentrations d'espèces réactives de l'oxygène. Par exemple, chez l'Homme, l'endonucléase spécifique aux sites abasiques

(apuriniques ou apyrimidiques, sites AP), appelée AP endonucléase (ou APE) et qui joue un rôle central dans la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN, peut être activée de façon sélective par de faibles concentrations d'espèces réactives de l'oxygène ou par la présence d'agent chimiques ou physiques contribuant à la surproduction de telles espèces (Ramana et al., 1998). Ainsi, et de manière plus générale, la modulation des concentrations cellulaires en espèces réactives de l'oxygène peut influencer, directement, sur l'activité d'enzymes ou, indirectement, sur l'expression de gènes impliqués dans la défense cellulaire, la réparation et l'élimination des dommages par le biais de processus apoptotiques ou nécrotiques (Chandra et al., 2000). Il a ainsi été décrit qu'une légère surproduction d'espèces réactives de l'oxygène peut être à l'origine de phénomènes de stimulation des différentes composantes du système de contrôle des dommages à l'ADN. Cette stimulation conduit alors notamment à l'observation de niveaux de dommages inférieurs aux niveaux basaux constatés en temps normal (Pollycove et Feinendegen, 2003). Des événements tels que des irradiations faibles doses à des rayonnements ionisants ont été montrés comme étant à l'origine d'une stimulation des systèmes de contrôle chez de nombreux types cellulaires issus de différentes espèces. Cette stimulation a ainsi été observée à l'échelle moléculaire et cellulaire : stimulation de la défense antioxydante, prévention de dommages persistants à l'ADN (probablement par une réparation accrue) et élimination des cellules les plus lésées (par apoptose, nécrose ou stimulation de la réponse immunitaire) (Feinendegen et al., 1987 et 1988; Wolff et al., 1988 ; Makinodan et James, 1990 ; Joiner et al., 1996 et 1999 ; Norimura et al., 1996 ; Kojima et al., 1998).

Cette stimulation du système de contrôle des dommages à l'ADN a également été étudiée d'un point de vue théorique par Pollycove et Feinendegen (2003). Pour cela, les auteurs ont estimé la part relative des dommages oxydatifs attribuables aux rayonnements par rapport aux dommages oxydatifs primaires générés de façon endogène. Cette estimation a été réalisée pour différents débits de dose. Les auteurs se sont d'abord placés au niveau du bruit de fond généralement considéré chez l'Homme en terme d'exposition à des radiations ionisantes : 1 mGy /an. Ce ratio a ainsi été estimé à 2.10^8 (ce qui signifie que les dommages occasionnés par le fait même du métabolisme cellulaire sont 2.10^8 plus importants que ceux générés par l'irradiation). De la même façon, ce ratio a été calculé pour un niveau d'exposition 10 fois supérieur : 10 mGy/an. D'après leurs estimations, il serait alors de 2.10^7 . Cette augmentation du niveau d'irradiation devrait alors augmenter le nombre de cellules impactées par les rayonnements chaque jour, passant alors de

1/365 pour 1 mGy/an à 10/365 pour 10 mGy/an (ce qui représente donc environ 3 % des cellules par jour). Selon ces auteurs, chacune de ces cellules impactées devrait induire ses systèmes de contrôle des dommages de manière à augmenter d'environ 60 % leur efficacité. Cette induction est, toujours selon [Pollycove et Feinendegen](#), sensée perdurer 10 j. En conséquence, tous les 10 j, 30 % des cellules devraient voir l'efficacité de leurs systèmes de contrôle augmenter de 60 %. De ce fait, l'augmentation moyenne de la réponse de la population cellulaire totale devrait être d'environ 20 % (30 % de la population voyant son efficacité accrue de 60 %). Les auteurs en concluent donc que l'augmentation de l'irradiation (en restant toujours à de faibles doses, inférieures à 200 mGy/an) résulterait en une réduction globale des dommages à l'ADN s'élevant à 20 % environ pour une exposition à 10 mGy/an.

Ces considérations, bien que théoriques, concordent néanmoins avec des observations expérimentales et épidémiologiques faites dans le domaine de l'étude des effets des faibles doses de rayonnement. En effet, certains auteurs ont observé une diminution du taux de transformations spontanées de cellules en culture et exposées à des doses croissantes de rayonnements γ . Ainsi, à chaque augmentation d'un facteur 10 du niveau d'irradiation (de 1 à 100 mGy), une diminution de 70 % de l'incidence des transformations néoplasiques a été observée ([Azzam et al., 1996](#)). De même, cette réduction des dommages a également été observée lors d'études épidémiologiques s'intéressant à l'état sanitaire et l'incidence de cancers de populations humaines particulièrement exposées aux radiations. Ces études ont donc été menées sur des populations localisées dans des régions géographiques caractérisées par des bruits de fond naturels en radiations très élevés ([Cheriyen et al., 1999](#) ; [Jaikrishan et al., 1999](#) ; [Ghiassi-Nejad et al., 2002](#)), sur des travailleurs du nucléaire ([Tokarskaya et al., 1997](#)) ou des malades traités par radiothérapie ([Rossi et Zaider, 1997](#) ; [Pollycove, 1998](#)).

Dans le cadre de notre étude, lorsque l'on s'intéresse au tissu sanguin (manip A), la diminution du niveau de dommages est apparue bien en amont de l'augmentation des dommages. Ceci signifierait donc que la mise en place des mécanismes de "surréparation" et/ou de stimulation de l'entrée en apoptose des cellules et de leur élimination par le système immunitaire soit survenue avant même que les premières manifestations génotoxiques délétères soient survenues. Ces mécanismes seraient initiés très précocement lors d'expositions à de faibles pressions de contamination (dès 5 j quelle que soit la concentration testée : 20, 100 ou 500 $\mu\text{g/L}$). Comme

évoqué précédemment, la présence en faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène générées chimiquement par l'uranium pourrait alors être à l'origine de cette stimulation des systèmes de contrôle. Néanmoins, pour des pressions de contamination plus importantes, cette activation ne serait plus suffisante pour contenir l'extension des dommages et le bilan "dommages/réparation" basculerait alors en faveur d'une augmentation de l'endommagement (comme cela est observé à 20 j). Précisons qu'ici le terme de "réparation" comprend également les phénomènes annexes de prévention des dommages et d'élimination des cellules trop fortement lésées. En effet, il est généralement admis que les systèmes de réparation de l'ADN sont peu actifs dans les érythrocytes, l'entrée en apoptose pouvant alors constituer une voie privilégiée du contrôle des dommages.

A l'inverse, lorsque l'on s'intéresse au tissu hépatique (manip C), l'observation d'un niveau de dommage inférieur à celui constaté chez les témoins est apparue après qu'un effet génotoxique ait été constaté. Ceci signifierait donc un décalage dans les cinétiques d'apparition des dommages et d'induction des systèmes de contrôle. Ainsi, la stimulation des systèmes cellulaires de maintien de l'intégrité de l'ADN ne serait initiée ou, du moins, ne serait efficace qu'après un délai important. Cette caractéristique des hépatocytes à présenter un niveau de dommage à l'ADN inférieur à celui des témoins pour des niveaux d'exposition élevés a déjà été mentionnée *in vitro* par [Devaux et al. \(1997\)](#). Les auteurs ont ainsi étudié les effets d'une exposition au benzo[a]pyrène sur des hépatocytes de truite. Le suivi des dommages à l'ADN a été effectué par le biais de l'essai des comètes après 4, 24 et 48 h d'exposition à 0, 0,1, 1 et 10 μM de B[a]P. Les résultats obtenus montrent un niveau de dommage directement corrélé à la concentration en B[a]P après 4 et 24 h, tandis qu'après 48 h, le niveau de dommages est inférieur au témoin chez les cellules exposées aux deux plus fortes concentrations testées. De même, l'étude *in vivo* de [Shugart \(1988\)](#), a montré qu'une exposition au B[a]P induit chez l'espèce *Lepomis macrochirus* une forte diminution de l'intégrité de l'ADN hépatocytaire dans les premiers temps de l'exposition, l'intégrité de l'ADN redevenant ensuite progressivement comparable à celle des témoins. Ceci met donc en évidence le fait que la stimulation des systèmes de réparation des hépatocytes peut être induite tardivement et/ou pour de fortes pressions de contamination.

3.3.2.2 - Augmentation du niveau de dommage

Exception faite de ces différents cas où le bilan “dommages/réparations” a conduit au maintien de l’intégrité de l’ADN cellulaire (niveaux de dommages inférieurs à ceux des témoins), l’uranium apparaît comme un agent génotoxique susceptible d’affecter l’intégrité de l’ADN, tant d’un point de vue chimique que radiologique.

Lors de l’expérimentation A, des effets génotoxiques sont apparus dès 10 j d’exposition à la concentration en uranium appauvri la plus forte parmi celles investiguées (500 µg/L). Dans ce cas, seule la technique de cytométrie en flux a permis de détecter des effets aussi précoces (l’essai des comètes n’ayant permis de détecter des effets qu’après 20 j). Comme nous avons pu l’évoquer précédemment, la cytométrie semble adaptée à la mise en évidence de cassures double brins. Cette expérimentation n’ayant pas engagé d’activités radiologiques significatives, on peut supposer que des altérations de types “adduits à l’ADN” ont pu survenir, puisque de telles lésions sont susceptibles d’induire des cassures double brins. Il a en effet été montré que l’uranium était capable de s’adduire covalamment à l’ADN au niveau des sites phosphatés (Yazzie et al., 2003). Ces évènements génotoxiques non imputables à l’action d’espèces réactives de l’oxygène sont généralement plus rares que d’autres évènements tels que les cassures simple brin ou les modifications de bases azotées. L’absence de réponse de l’essai des comètes dans ce cas pourrait être due à une faible sensibilité de la version alcaline de l’essai vis-à-vis des cassures double brins (cette version de l’essai étant plus spécifique de la détection d’évènements plus fréquents tels que les cassures simple brin ou l’apparition de sites alcali-labiles qui masquent ainsi numériquement les cassures double brins). L’utilisation de la version neutre de l’essai (permettant de détecter spécifiquement les cassures double brins) permettrait donc de savoir si les dommages détectés dès 10 j par la cytométrie en flux sont effectivement attribuables à des cassures double brins. Néanmoins, l’essai des comètes tel qu’il a été pratiqué dans cette thèse a également permis de détecter un effet à 20 j. Ceci suppose donc que l’uranium a été internalisé à des concentrations suffisantes pour l’initiation d’un stress oxydant au niveau des érythrocytes.

Cette idée de l’existence d’un seuil d’accumulation nécessaire à l’instauration d’un stress génotoxique semble en effet être confirmée lors de l’expérimentation C. Ainsi, dans le cadre de l’étude de l’intégrité de l’ADN érythrocytaire, l’analyse par l’essai des comètes a permis de

montrer que l'apparition de cassures à l'ADN dépend à la fois de la concentration en uranium et de la durée d'exposition. En effet, à des temps courts (3 j), seuls les organismes exposés à la plus forte concentration massique d'uranium total testée (100 µg/L) présentent un taux d'endommagement supérieur à celui des témoins. A l'inverse, pour des durées d'exposition plus importantes (10 j), des dommages apparaissent chez les organismes exposés à la plus faible concentration testée (20 µg/L).

En outre, il est intéressant de noter que le recours à de fortes activités radiologiques conjointement à des concentrations massiques comparables à celles précédemment mentionnées (20 et 100 µg/L) n'ont pas conduit à l'altération de l'intégrité du matériel génétique. En effet, dans les deux cas d'exposition aux mélanges isotopiques présentant les proportions en ²³³U les plus fortes (condition D pour 20 µg/L totaux et condition G pour 100 µg/L totaux), l'endommagement observé n'était pas significativement différent de celui constaté chez les témoins. Dans le cas de ces expositions, les concentrations massiques engagées (20 et 100 µg/L) ont démontré leur action génotoxique comme nous avons pu le voir précédemment. On peut donc raisonnablement suggérer la possible mise en place d'une activation des systèmes de contrôle de l'intégrité de l'ADN (réparation et élimination) sous l'effet des activités radiologiques engagées. Si l'on part de ce principe, les conditions D et G seraient donc à l'origine de dommages radiologiques qui viendraient se surajouter aux dommages chimiques. Cette accumulation des dommages serait alors susceptible d'induire une activation des systèmes de réparation et conduirait alors à la disparition de l'ensemble des dommages. Cette hypothèse d'un rôle joué par l'activité radiologique de l'uranium dans l'initiation de dommages à l'ADN est confirmée par l'étude des mêmes échantillons en cytométrie de flux. Ainsi, l'analyse cytométrique a permis de montrer que des dommages apparaissent préférentiellement pour les conditions d'exposition caractérisées par de fortes activités radiologiques (conditions D et G mais également F, couplant une forte concentration massique et une activité radiologique significative).

L'étude des tissus hépatiques et gonadiques donne des résultats assez similaires à ceux précédemment évoqués. En effet, dans le cas des hépatocytes, des dommages n'ont été observés qu'à un seul des temps testés (3 j) et pour une seule des conditions d'exposition investiguées (condition F). Or, cette condition n'est pas la plus drastique parmi celles testées. En effet, si elle correspond bien à la pression chimique la plus forte (100 µg/L), cette condition n'est pas celle pour laquelle l'activité radiologique délivrée était la plus importante ("seulement" 2 550 Bq/L). Aucun

effet sur l'intégrité de l'ADN n'a ainsi été décelé chez des poissons exposés à une pression chimique inférieure mais une activité radiologique très élevée (condition D : 30 µg/L - 10 600 Bq/L) ni même chez ceux exposés à une pression chimique similaire et une activité radiologique plus importante (condition G : 100 µg/L - 7 050 Bq/L). Ceci montre bien l'intervalle très limité dans lequel s'inscrivent les manifestations génotoxiques résultant en une baisse de l'intégrité de l'ADN hépatocytaire. Il semblerait donc qu'une exposition à une pression chimique conséquente soit nécessaire à l'apparition de dommages (rejoignant ici l'idée de l'atteinte d'un certain seuil d'accumulation de l'élément dans les tissus des organismes). A l'inverse, une pression radiologique importante semble "gommer" l'effet chimique (suggérant ici la stimulation des systèmes de contrôle cellulaire). On peut ainsi supposer que, dans le cas des organismes exposés à la condition G (voire même dans le cas de ceux exposés à la condition D), l'activation radiologique des systèmes de contrôle des dommages a permis d'atténuer le niveau d'endommagement global jusqu'à pouvoir le rendre similaire à celui des témoins. Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'à des temps plus longs (10 j), on observe une tendance généralisée à une "diminution" des dommages, notamment chez les organismes exposés aux conditions radiologiques les plus drastiques (conditions D et F). De même, dans le cas des cellules gonadiques, les conditions D, E et F sont à l'origine de dommages tandis que les organismes exposés à la condition G (sensée être la plus drastique) ne présentent pas un niveau de dommages différent du témoin.

Il semblerait donc que la fenêtre d'action génotoxique de l'uranium soit très étroite. Les dommages observés semblent en effet être le résultat d'un équilibre entre les atteintes chimiques portées à l'ADN (dont l'apparition semble conditionnée par le dépassement d'un seuil d'accumulation de l'élément) et l'activation des systèmes de contrôle cellulaires (suspectée d'être étroitement liée à l'activité radiologique délivrée).

Le caractère génotoxique de l'uranium a été souligné par de nombreuses études. Il a ainsi été montré *in vitro* que l'uranium est capable d'induire la formation de cassures simple brin, de cassures double brins ou encore de bases modifiées (Lin et al., 1993 ; Miller et al., 2002a ; Yazzie et al., 2003 ; Stearns et al., 2005). *In vivo*, cet effet génotoxique est également retrouvé, notamment chez le rat (Monleau, 2005). Néanmoins, dans le cadre de cette dernière étude où les rongeurs ont été soumis à des inhalations uniques ou répétées de différentes formes d'uranium, il apparaît que l'intégrité du matériel génétique de cellules du système respiratoire et rénal n'est que rarement

affectée. En effet, [Monleau \(2005\)](#) explique que de nombreux types d'expositions (pourtant considérées comme aiguës) n'ont pas conduit à l'observation de dommages à l'ADN. De plus, l'auteur souligne que, lorsque de telles lésions ont été décelées, elles ne l'ont souvent été que transitoirement. Il semblerait donc que l'action génotoxique de l'uranium soit régie par des mécanismes complexes. Notre hypothèse de l'existence d'un seuil d'accumulation tissulaire ainsi que la prise en compte de la balance entre "génération de dommages" et "stimulation des systèmes de contrôle" pourraient expliquer cette complexité.

3.3.3 - Remarques spécifiques aux tissus hépatiques et gonadiques

3.3.3.1 - Cas du tissu hépatique

La survenue dès 3 j de dommages à l'ADN au sein du tissu hépatique suggère que l'uranium est capable d'atteindre relativement rapidement le tissu hépatique et que ce type tissulaire est sensible à l'action génotoxique de l'uranium.

Néanmoins, le foie semble disposer de capacités de réparation très efficaces. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, la fenêtre d'action génotoxique de l'uranium sur le tissu hépatique est très étroite (cf. 5^{ème} paragraphe du 3.3.2.2). La disparition totale des effets à des temps importants (10 et 20 j) atteste de cette capacité compensatoire dont dispose le tissu hépatique pour se prémunir des dommages, les réparer et/ou éliminer les cellules trop fortement endommagées. La génotoxicité de l'uranium ne semble donc pouvoir s'exprimer au sein du tissu hépatique que sous certaines conditions bien précises, les premières altérations ne survenant qu'à des niveaux d'exposition relativement élevés (pas d'effet génotoxique jusqu'à 100 µg/L d'uranium et 2 375 Bq/L) et les systèmes de réparation semblant pouvoir s'activer rapidement (notamment pour une activité radiologique supérieure à 2 375 Bq/L).

A notre connaissance, aucune autre étude ne s'est intéressée à l'évaluation de la génotoxicité de l'uranium au niveau de cellules hépatiques (qu'il s'agisse d'études menées *in vitro* ou *in vivo*). Il est donc difficile d'estimer la pertinence des hypothèses que nous avons émises au sujet de ce type cellulaire.

3.3.3.2 - Cas du tissu gonadique

L'apparition tardive d'effets génotoxiques au niveau des cellules gonadiques (après 20 j) peut être expliquée par le comportement toxicocinétique de l'uranium et/ou par les caractéristiques propres aux cellules gonadiques. En effet, ce délai dans l'apparition de dommages pourrait être expliqué par le fait que le tissu gonadique est moins accessible à l'uranium que d'autres organes. En outre, il peut être lié au fait que les cellules gonadiques sont globalement peu sensibles à l'action génotoxique de l'uranium.

Concernant l'aspect toxicocinétique, quelques pistes d'interprétation peuvent être retenues au regard des données de bioaccumulation tissulaire obtenues lors de l'expérimentation B. Ainsi, lors de cette étude, il a été montré que le tissu gonadique n'était que faiblement contaminé par l'uranium lors de sa distribution tissulaire (*cf.* paragraphe 2.3 de ce chapitre). Ainsi, l'uranium appauvri est quasiment incapable de pénétrer cet organe (sa concentration relative y est en effet de 0,0873, ce qui signifie que la concentration en uranium dans les gonades est alors environ 11 fois moins élevée que la concentration moyenne des autres organes) tandis que l'uranium enrichi à hauteur de 7 % en ^{233}U est capable d'être internalisé de manière comparable aux autres organes (concentration relative : 1,138). La composition isotopique de l'élément est donc un facteur important à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Concernant la sensibilité relative des cellules germinales, une étude bibliographique très complète de [Martoriati \(1999\)](#) s'est attaché à répondre en partie à cette question. Ce document décrit de manière très exhaustive les différentes modalités de l'organisation nucléaire des spermatozoïdes avant de procéder à un inventaire des méthodes utilisées dans la littérature pour l'évaluation des altérations du noyau de ces cellules.

Selon l'auteur, la caractérisation des altérations possibles de l'ADN des spermatozoïdes ainsi que la compréhension des conséquences liées à ces altérations sont indissociables d'une bonne connaissance de l'organisation de cet ADN. En effet, l'organisation de la chromatine des cellules germinales est différente de celle des cellules somatiques et est variable selon l'espèce considérée.

Avant de présenter ces organisations spécifiques aux cellules germinales, nous proposons un bref rappel de l'organisation "classique" du noyau des cellules différenciées, dites somatiques ou spécialisées telles que le sont les érythrocytes et les hépatocytes. Dans les cellules somatiques, le

nucléosome est l'unité élémentaire répétée de la chromatine donnant à l'ADN un aspect caractéristique dit "en collier de perles". Chaque nucléosome (c'est-à-dire chacune des perles) est issu de la complexation de quelques centaines de paires de bases de l'ADN avec des histones, petites protéines très basiques (Martoriati, 1999). Cette association ne résulte pas de liaisons covalentes mais d'interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement des histones (arginine et lysine) et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN (Ward, 1993). Le "collier de perles" composé de la succession des nucléosomes peut s'enrouler sur lui-même et former des replis et des boucles qui caractérisent la fibre de chromatine. En plus de leur rôle dans la compaction de l'ADN, les histones modulent également l'activité du génome car ils contrôlent l'accès à l'ADN des enzymes de transcription ou de réplication (Ward, 1993).

Dans le cas du noyau des spermatozoïdes, deux organisations complètement différentes de l'ADN existent selon l'espèce ou la famille à laquelle on s'intéresse. Leur différence réside dans la nature des protéines nucléaires qui peuvent être de type histone (noyau à nucléosome) ou de type protamine. Dans le cas du poisson zèbre, Cypriniforme, les protéines nucléaires des spermatozoïdes sont des histones, tout comme chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) ou encore l'amour blanc (ou carpe chinoise, *Ctenopharyngodon idella*). L'organisation de la chromatine est donc proche de celle retrouvée dans les noyaux des cellules somatiques (Munöz-Guerra et al., 1982 ; Kadura et al., 1983 ; Martoriati, 1999).

Néanmoins, l'organisation finale de l'ADN des spermatozoïdes est acquise au cours de la gamétogénèse qui voit se succéder des stades transitoires permettant à une cellule à noyau de type somatique d'atteindre le niveau de compaction supérieur typique du spermatozoïde. Ainsi, les cellules présentent des histones différentes des cellules somatiques (notamment par le biais de méthylations/déméthylations ou d'acétylations/désacétylations), du moins à partir des spermatocytes (Grimes, 1986). Au fur et à mesure du déroulement de la spermatogénèse, il y a ainsi augmentation de la condensation du noyau, aussi bien pour les noyaux à protamines que les noyaux à histones (Martoriati, 1999).

Ainsi, quelle que soit la nature des nucléoprotéines dans le noyau du spermatozoïde, la chromatine est plus compactée que dans une cellule somatique. Cette surcompaction faciliterait la mobilité des spermatozoïdes par réduction de leur volume, serait à l'origine d'une inactivation

transcriptionnelle du génome mais servirait également de protection de l'information génétique contre l'action d'agents exogènes (Ciereszko et al., 2005). En effet, aucune enzyme de réparation de l'ADN n'a été mise en évidence dans le noyau de spermatozoïdes (Martoriati, 1999 ; Dietrich et al., 2005). Cette inaptitude à la réparation rend en effet le sperme très fragile vis-à-vis des agressions externes *in vivo* (exposition des individus aux radiations, polluants) ou *in vitro* (conservation, congélation) et accroît d'autant plus la nécessité de systèmes annexes de protection tels que la protection mécanique conférée par la surcondensation du matériel génétique.

En plus de cette surcompaction, certaines particularités physiologiques confèrent aux poissons des capacités de préservation de l'intégrité des cellules germinales. Ainsi, durant la maturation et le stockage de ces cellules dans les tubes séminifères, un plasma séminal produit par certaines cellules sécrétrices de l'épithélium baigne les cellules spermatiques. Ce plasma, tout comme le milieu intracellulaire des spermatozoïdes, contient tout un ensemble de substances incluant des composés de faible poids moléculaire tels que l'acide ascorbique ou l'acide urique, ainsi que des composés de haut poids moléculaire tels que la transferrine et des enzymes antioxydantes (telles que la catalase et la glutathion peroxydase). Ce liquide séminal est donc utile au maintien de l'équilibre oxydatif des cellules et prévient donc l'apparition de dommages à l'ADN (Ciereszko et al., 1999 ; Ciereszko et Dabrowski, 2000 ; Dietrich et al., 2005). Néanmoins, en conditions physiologiques normales, la protection conférée par ce liquide devient caduque dès lors que le sperme est émis lors de la frai, diluant alors le plasma séminal dans le milieu extérieur. De même, lors de l'exposition à un xénobiotique, si celui-ci parvient à atteindre le tissu gonadique et à s'y accumuler, le plasma séminal ne constitue alors plus un environnement protecteur aussi efficace et ses capacités antioxydantes peuvent être rapidement dépassées.

Dans la littérature, un intérêt particulier a été porté aux altérations génotoxiques occasionnées aux spermatozoïdes des poissons. En effet, tant d'un point de vue scientifique (recherches dans le domaine de la génétique) que commercial (aquaculture), le suivi des effets d'une inactivation du génome des spermatozoïdes de poissons suscite un intérêt important, notamment vis-à-vis du phénomène de gynogenèse (Dietrich et al., 2005). Ainsi, divers traitements (notamment des irradiations UV) sont pratiqués sur le sperme de poissons afin d'inactiver la transmission du patrimoine génétique des individus mâles sans pour autant affecter son pouvoir fécondant. De cette manière, les œufs fertilisés par ces spermatozoïdes dont l'ADN est inactif sont

haploïdes car ils ne disposent que du patrimoine génétique maternel pour se développer, la diploïdie est donc restaurée par l'application d'un choc thermique ou barométrique juste après la fertilisation (Felip et al., 1999). L'intérêt scientifique de ces organismes gynogénétiques réside dans leur complète homozygotie permettant l'établissement de cartes génétiques, l'étude de l'effet de loci uniques et des mécanismes de détermination sexuelle. L'intérêt commercial de cette parthénogenèse réside quant à lui dans la production rapide d'individus de taille conséquente puisque de nombreuses espèces de poissons présentent un dimorphisme sexuel, les femelles étant généralement plus grosses que les mâles. De même, et toujours motivé par des intérêts commerciaux, le suivi des effets de la cryopréservation du sperme de poisson (notamment pour la fécondation d'espèces telles que l'esturgeon) a suscité un fort intérêt.

Parmi les techniques permettant de révéler les cassures de brins d'ADN, l'essai des comètes a été mis en œuvre à de nombreuses reprises. Chez le poisson, l'essai des comètes a ainsi été utilisé pour la mesure de la fragmentation du matériel génétique de spermatozoïdes issus de différentes espèces telles que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la lamproie marine (*Petromyzon marinus*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) ou encore le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Ciereszko et al., 2005 ; Dietrich et al., 2005 ; Zhou et al., 2006 ; Giraudo, 2006 ; Adam et al., 2007). En outre, chez l'Homme, il a été démontré une très forte corrélation entre les résultats de l'essai des comètes et ceux obtenus par d'autres techniques telles que le SCSA (*sperm chromatin structure assay*) qui permet de détecter un défaut de compaction de la chromatine qui peut notamment être dû à la présence de cassures de brins, ou encore la méthode TUNEL (*terminal uridine nick end-labelling assay*) qui rend compte de la présence d'extrémités 3'OH rendues libres par la présence de cassures de brins (Aravindan et al., 1997). Ceci est cohérent étant donné que ces différentes approches rendent compte du même phénomène : les cassures de brins d'ADN. Plusieurs études ont tenté de relier le niveau d'endommagement de l'ADN mesuré par l'essai des comètes et les problèmes de fertilité en comparant l'intégrité de l'ADN nucléaire du sperme d'individus stériles et fertiles (Hughes et al., 1996 et 1997 ; McKelvey-Martin et al., 1997 ; Anderson et al., 1997). Aucune différence n'a été constatée. Les corrélations entre l'intégrité de l'ADN spermatique et la fertilité sont en effet généralement très faibles voire inexistantes même si un nombre important de noyaux endommagés augmente la probabilité d'avortements embryonnaires ou de mutations (Martoriati, 1999). Ce type de méthode n'apporte donc qu'une réponse partielle aux conséquences

populationnelles de l'exposition à un polluant et ne permet d'identifier *a priori* que la fragilité de l'ADN. Ceci est d'autant plus vrai si l'on considère le fait que certains auteurs ont démontré qu'une réparation des dommages présents au niveau de l'ADN des spermatozoïdes peut avoir lieu au niveau de l'ovocyte lors de la fécondation (Ashwood-Smith et Edwards, 1996 ; Ciereszko et al., 2005 ; Dietrich et al., 2005).

Les conséquences des altérations de l'intégrité de l'ADN observées dans le cadre de notre travail sont donc très difficiles à établir. La fertilité des individus n'étant pas forcément affectée lorsque l'intégrité de l'ADN spermatique est altérée, seuls des protocoles beaucoup plus lourds permettraient d'étudier les effets transgénérationnels d'altérations du matériel génétique de spermatozoïdes (fécondations *in vitro* à partir de spermatozoïdes exposés à des stressseurs, croisements répétés d'organismes, étude des descendance par estimation de la survie).

3.3.4 - Synthèse relative à l'étude de la génotoxicité

Au travers des différentes études menées dans le but d'évaluer la génotoxicité de l'uranium, nous avons pu voir que l'uranium est effectivement un élément génotoxique mais que l'expression de cette génotoxicité est complexe. En effet, elle résulte de la combinaison de nombreux facteurs : atteinte d'un seuil d'accumulation chimique en deçà duquel aucune altération de l'ADN ne semble induite, importance du système de contrôle de l'intégrité de l'ADN (très différent selon le type cellulaire étudié), possibilités de stimulation de ces systèmes par de faibles niveaux d'exposition (chimique ou radiologique), etc.. De plus, il est intéressant de souligner que les mécanismes à l'origine de cette toxicité semblent être majoritairement liés à des phénomènes indirects d'altération de l'ADN, sans doute liés à l'instauration d'un stress oxydatif cellulaire.

3.4 - Observations histologiques

Au cours de ce travail, une autre échelle de l'organisation biologique a également été étudiée : l'échelle tissulaire. Ainsi, au suivi de l'évolution des marqueurs biochimiques précédemment décrits (enzymes ou autres molécules clés du système hépatique antioxydant, acétylcholinestérase cérébrale et intégrité du matériel génétique de différents types cellulaires), nous avons choisi d'ajouter un examen histologique. Cette étude a ainsi concerné différents types tissulaires et a été réalisée sous microscopie photonique (à des grossissements allant de x 10 à x 40)

et microscopie électronique à transmission (à des grossissements allant de x 15 000 à x 90 000). A notre connaissance, seule l'étude de [Cooley et al. \(2000\)](#) fait mention d'effets histopathologiques d'une exposition à l'uranium chez le poisson. Néanmoins, ces auteurs ne se sont intéressés qu'à des organes différents de ceux retenus pour notre étude (foie, vésicule biliaire et rein). L'interprétation de nos résultats ne pourra donc être formulée que sur la base de travaux visant à estimer la toxicité de polluants autres que l'uranium (des métaux lourds pour la plupart).

3.4.1 - Le tissu branchial

Le premier tissu auquel nous nous sommes intéressés a été le tissu branchial. Les branchies sont en effet aux premières lignes de l'interaction entre l'organisme et les polluants présents dans la colonne d'eau. Ce tissu est donc susceptible d'être altéré au contact des polluants. De plus, toute pathologie susceptible d'affecter les branchies peut interférer avec les échanges gazeux et ioniques mais également, de façon plus générale, sur l'absorption d'éléments présents dans le milieu (que ceux-ci soient toxiques ou non).

Lors de notre étude, nous avons observé différentes atteintes branchiales. Nous avons pu noter la présence d'œdèmes épithéliaux très sévères chez les poissons exposés à l'uranium appauvri, voire même une desquamation généralisée suite à la rupture complète de cet épithélium dans le cas des organismes exposés au mélange d'uranium appauvri et d'²³³U. En effet, nous avons pu constater de manière très significative par rapport aux organismes témoins, un décollement de l'épithélium avec l'axe "cellules pilier/sinus sanguin". Nous verrons donc dans quelle mesure ces résultats correspondent à ce que l'on peut trouver dans la littérature. Mais avant cela, il semble important de rappeler qu'afin de limiter le contact entre le tissu branchial et un contaminant tel que l'uranium, l'organisme dispose d'une première ligne de défense : la sécrétion de mucus.

3.4.1.1 - La sécrétion de mucus en tant que stratégie de défense

L'un des premiers moyen de défense dont dispose le tissu branchial pour contrecarrer une exposition à des substances polluantes consiste en une augmentation de la couche de mucus présent à sa surface. Ce mécanisme d'autoprotection augmente ainsi l'espace dans lequel se fait la diffusion des molécules entre l'eau et le sang et réduit donc l'importance des échanges. Il s'agit d'un mécanisme bioprotecteur assez généralement reconnu au niveau des divers épithéliums en contact

avec le milieu extérieur (branchie, peau, intestin) (Ni Shuilleabhain et al., 2006). Dans le cadre de notre étude, du fait du protocole d'inclusion en résine suivi en vue de l'examen histologique (fixation chimique, marquage à l'osmium mais surtout déshydratation progressive dans des bains successifs d'alcool), il nous a été impossible d'observer la présence ou non de mucus au niveau du tissu branchial. Néanmoins, au vu des résultats obtenus au travers de différentes études, il semblerait que la production de mucus soit observé de manière récurrente lors de l'exposition à des métaux lourds tels que le cuivre ou le cadmium (Coello et Khan, 1996). On peut donc supposer qu'il en soit de même suite à une exposition à l'uranium. Deux conséquences sont donc attendues suite à cette sécrétion accrue de mucus : la limitation du passage d'éléments toxiques du milieu extérieur vers le milieu intérieur mais également la réduction de l'efficacité des échanges gazeux assurant notamment l'oxygénation sanguine et la dépuración des déchets métaboliques (Jeziarska et Witeska, 2004). L'intérêt d'une telle réponse du tissu branchial est donc nuancé par le fait qu'elle se fait au détriment de fonctions physiologiques essentielles telles que la respiration.

3.4.1.2 - Altérations histopathologiques de l'appareil branchial

Outre la surproduction de mucus, l'exposition à des polluants peut avoir des conséquences sur la structure même du tissu branchial. Ces altérations, induites à la suite d'une exposition à des substances toxiques, ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant plus d'une quarantaine d'années. Dans son article de synthèse sur le sujet, Evans (1987) évoque tout d'abord le fait que ces pathologies branchiales sont symptomatiques d'effets toxiques communs à une large variété de polluants aquatiques dont font notamment partie les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les herbicides, les dérivés du pétrole, les composés nitrogénés, les métaux lourds, mais aussi certaines substances médicamenteuses. De même, l'acidification des eaux (notamment par les pluies acides) peut être à l'origine de telles altérations.

Les anomalies morphologiques les plus communément observées sont : (1) l'hyperplasie lamellaire (c'est-à-dire la fusion de lamelles entre elles suite à l'augmentation du nombre des cellules épithéliales qui les recouvrent), (2) l'hypertrophie épithéliale (augmentation du volume des cellules de l'épithélium), (3) la télangiectasie (sorte d'anévrisme, soit une dilatation marquée des vaisseaux sanguins terminaux), (4) la formation d'œdèmes résultant de la séparation de l'épithélium et de la membrane basale, (5) la desquamation de l'épithélium (suite à la rupture de

l'épithélium, cas extrême de l'évolution des œdèmes) ainsi que (6) l'évolution du tissu branchial vers un état nécrotique généralisé. La plupart de ces réactions sont de type défensif et aboutissent, comme l'hypersécrétion de mucus, à établir une distance entre le polluant et l'organisme. Ainsi, des phénomènes de décollement de l'épithélium (œdèmes), de desquamation ou encore d'hyperplasie lamellaire permettent d'augmenter la distance entre toxique et flux sanguin, de même que les fusions entre lamelles conduisent à la diminution de la surface vulnérable des branchies. En effet, il est important de savoir que la surface des branchies peut constituer jusqu'à 70 % de la surface corporelle d'un poisson. Elles représentent donc un lieu d'échanges complexes avec le milieu et une des voies principales de pénétration des toxiques dans l'organisme. La fusion de lamelles entre elles va ainsi permettre d'abaisser cette surface d'échange.

[Evans](#) précise qu'aucune de ces réponses possibles n'apparaît comme spécifique de l'action d'un polluant ou d'un type de polluant. Ainsi, les altérations branchiales semblent être le reflet d'une réponse globale à un stress quel qu'il soit mais ne permettent pas de rendre compte du type de contaminant auquel sont exposés les organismes.

En s'appuyant sur différentes études menées dès le début des années 1970, [Evans \(1987\)](#) décrit plus particulièrement l'effet des métaux lourds sur les branchies et indique que les métaux lourds induisent de profondes modifications sur le transport branchial de l'eau et des solutés. Il rapporte notamment les résultats de deux études menées chez la truite arc-en-ciel. Dans la première, les auteurs se sont attachés à suivre les effets d'une exposition au zinc (40 mg/L pendant 3 h) ([Skidmore et Tovell, 1972](#)). Les auteurs ont ainsi montré que l'aspect général de l'arborescence branchiale a été notablement modifié, les lamelles ayant pris une allure courbée et présentant des œdèmes (résultats d'un décollement de l'épithélium lamellaire et de la membrane basale). La seconde étude à laquelle [Evans](#) fait référence est celle d'[Olson et al. \(1973\)](#) au travers de laquelle les auteurs ont suivi l'apparition de modifications histologiques branchiales chez des truites exposées à des composés mercuriels. Les altérations constatées ont pris la forme d'une réduction de la hauteur des crêtes présentes normalement à la surface des cellules constitutives des filaments ainsi que de l'apparition de vacuoles au sein de cellules épithéliales. [Matthiessen et Bradfield \(1973\)](#) ont quant à eux choisi l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) comme modèle biologique dans le cadre d'une étude des effets induits par des expositions au zinc ou à de l'eau distillée. Une fois

encore, l'apparition d'histopathologies branchiales s'est avérée être un marqueur efficace de la toxicité de ce métal.

Plus récemment, des études de terrain ont également permis de révéler la présence d'altérations branchiales chez des poissons exposés *in situ* à différents contaminants. On peut ainsi citer l'étude de [Stentiford et al. \(2003\)](#) travaillant sur différentes espèces (*Platichthys flesus*, *Pomatoschistus minutus* et *Zoarces viviparus*) collectées au niveau d'estuaires britanniques impactés par divers contaminants. Des études comparables ont également été menées à travers le monde avec notamment les travaux de [Teh et al. \(1997\)](#) menée aux Etats-Unis sur les espèces *Lepomis auritus* et *Micropterus salmoides*, celle de [Pawert et al. \(1998\)](#) menée en Allemagne sur *Salmo trutta* et *Barbatula barbatula* ou encore celle de [Khan \(1999\)](#) menée dans une baie de Terre-neuve sur l'espèce *Pleuronectes americanus*.

Dans le cadre d'expositions au laboratoire on peut également faire référence aux études de [Thophon et al. \(2003\)](#) et [Giari et al. \(2007\)](#) menées sur des poissons (respectivement *Lates calcarifer* et *Dicentrarchus labrax*) exposés au cadmium dans des conditions aiguës et subaiguës. Sont également disponibles dans la littérature des études portant sur les effets du mercure sur les branchies de *Gambusia holbrooki*, *Trichomycterus zonatus* et *Salvelinus alpinus* ([Jagoe et al., 1996](#) ; [Oliveira Ribeiro et al., 2000](#)) ou sur les effets du plomb sur *Clarias gariepinus* ([Olojo et al., 2005](#)). Mais il n'y a pas que les métaux lourds qui ont intéressé les scientifiques dans l'étude au laboratoire des histopathologies branchiales. On peut ainsi citer l'étude de [Miossec et Bocquené \(1986\)](#) menée sur la civelle (post-larve de l'anguille, *Anguilla anguilla*) dans le but d'évaluer les effets létaux et sublétaux de tensio-actifs non ioniques, les nonylphénols polyéthoxylés.

Même si le suivi des altérations histologiques n'est pas encore très développé dans le cadre de l'évaluation de la toxicité environnementale des polluants, il semblerait donc que cette approche tissulaire constitue un indicateur efficace de la toxicité qui s'exerce sur les organismes tels que les poissons.

3.4.1.3 - Conséquences possibles de ces altérations

Suite à l'observation de telles altérations tissulaires, on peut se poser la question des conséquences physiologiques pour l'organisme. En effet, de par le rôle essentiel joué par les branchies dans le maintien de l'homéostasie osmotique, des balances ionique et acido-basique

sanguines, différents auteurs se sont intéressés au suivi des conséquences physiologiques (notamment au niveau de paramètres hématologiques) de l'altération du tissu branchial.

Plusieurs auteurs ont ainsi suivi les concentrations sanguines en ions Na^+ et Cl^- et/ou l'activité d'enzymes clés telle que la Na^+/K^+ -ATPase, véritable pompe physiologique assurant le maintien de l'équilibre des concentrations de ces deux solutés essentiels à l'homéostasie sanguine (McKim et al., 1970 ; Schreck et Lorz, 1978 ; Lauren et McDonald, 1985). Il a ainsi été mis en évidence qu'une exposition au cuivre est à l'origine d'une chute notable des concentrations sanguines en Na^+ et Cl^- . Cette chute serait attribuable à différents mécanismes complémentaires : l'inhibition de l'entrée de ces ions, la stimulation de leur efflux vers le milieu extérieur et l'entrée accrue d'eau dans l'organisme. Les auteurs expliquent la baisse de l'influx ionique par l'inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase et décrivent l'efflux ionique ainsi que l'influx d'eau comme le résultat d'un possible effet sur la perméabilité de l'épithélium branchial. Cette perméabilité accrue serait la conséquence d'une action sur les ions Ca^{2+} présents dans le ciment intercellulaire, ces ions étant à l'origine du contrôle des jonctions membranaires établies entre les cellules épithéliales. Il peut être intéressant de rappeler la grande similitude qui existe entre l'uranium et le calcium. En effet, comme nous avons pu l'évoquer lors de l'étude bibliographique concernant la rétention biologique de l'uranium, il a été montré que l'uranium peut prendre la place du calcium au sein du tissu osseux. Dans l'éventualité de l'apparition de phénomènes semblables de substitution du calcium par l'uranium au niveau branchial, on pourrait donc s'attendre à des effets comparables de l'uranium sur la perméabilité épithéliale à l'eau et aux solutés.

D'autres auteurs se sont quant à eux intéressés au maintien de la balance acido-basique sanguine. Une étude portant sur les effets d'une exposition au zinc sur des truites arc-en-ciel a ainsi mis en évidence l'apparition d'une acidose, diagnostiquée comme la résultante d'un défaut de ionorégulation branchiale. En effet, les auteurs supposent qu'une stimulation des échanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ serait induite au détriment des échanges Na^+/H^+ (l'influx de Cl^- étant supérieur à celui des ions Na^+). En outre, une inhibition de l'anhydrase carbonique concourrait à cet acidose sanguine (Spry et Wood, 1985).

L'exposition à l'uranium, au même titre que les métaux lourds et autres polluants environnementaux précédemment évoqués, pourrait donc induire des effets tant morphologiques

que physiologiques sur la structure et les fonctions de l'appareil branchial. Néanmoins, notre étude n'ayant pas été conçue de façon à mettre ces altérations physiologiques en évidence, nous ne disposons pas d'éléments permettant de confirmer cette hypothèse.

3.4.1.4 - Similitudes histologiques entre le tissu branchial et d'autres tissus

Un rapprochement est souvent esquissé entre ces manifestations histopathologiques au niveau des branchies chez les poissons et les observations histopathologiques d'organes clés chez les mammifères dont l'Homme lorsque ceux-ci sont soumis à l'action toxique de contaminants. Un parallèle est ainsi souvent évoqué entre l'appareil branchial des poissons et les tissus pulmonaires mais aussi hépatiques, rénaux voire intestinaux des mammifères. Par exemple, [Evans \(1987\)](#) rappelle que l'épithélium rénal, tout comme l'épithélium branchial, est doté d'enzymes de transport actif telles que la Na^+/K^+ -ATPase ou l'anhydrase carbonique, sa perméabilité aux ions est contrôlée par des jonctions serrées sous la dépendance de flux calciques, il présente également à sa surface différents canaux de transport ionique tels que ceux régissant les échanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, Na^+/H^+ et le cotransport NaCl/KCl .

Ce parallèle entre les branchies et d'autres organes est également établi dans une étude de [Jouhaud et al. \(1999\)](#) dans laquelle les effets histopathologiques d'une contamination au platine ont été évalués chez le *Danio*. Les auteurs ont ainsi mis en évidence des phénomènes de fusion de villosités intestinales adjacentes réduisant ainsi fortement la surface intestinale. L'induction d'un tel mécanisme, également observé lors d'une contamination par le mercure ([Banerjee et Bhattacharya, 1995](#)) permettrait de limiter l'absorption du contaminant et constituerait ainsi un processus bioprotecteur original vis-à-vis des métaux lourds. Cette fusion des microvillosités intestinale rappelle de beaucoup la fusion de lamelles branchiales observées par certains auteurs. De plus, [Jouhaud et al.](#) ont observé une hyperproduction de mucus intestinal, tout comme cela a pu être observé au niveau des branchies.

Si l'on se rappelle les effets néphropathiques de l'uranium ainsi que les mécanismes à l'origine de ces effets, on s'aperçoit en outre que des similitudes existent avec les effets histopathologiques observés au niveau des branchies de poisson. Ainsi, les conséquences d'une exposition à l'uranium sur l'épithélium rénal observées au cours d'études menées aussi bien chez les poissons que chez les mammifères rappellent de beaucoup les effets précédemment décrits sur

l'épithélium branchial. Ainsi, les symptômes majeurs d'une exposition à l'uranium chez le rat sont la conséquence de dysfonctionnements du filtre glomérulaire (altération des échanges de solutés) et de l'épithélium tubulaire (dégénérescence partielle, voire nécrose) (Tyrakowski, 1979a,b,c). On note notamment une fragmentation des microvillosités apicales de la bordure en brosse, un gonflement des cellules tubulaires et une vacuolisation de leur cytoplasme (vacuolisation également notée au niveau branchial lors d'études sur le poisson). Ces atteintes intracellulaires peuvent s'amplifier avec, en particulier, un dysfonctionnement mitochondrial généralement attribué à une modification du métabolisme calcique (modification que l'on retrouve au niveau branchial, à l'origine d'une perméabilité altérée de l'épithélium). Toujours dans le cas du rein, l'atteinte du métabolisme calcique perturbe de nombreux systèmes intracellulaires, notamment ceux gérés par la calmoduline. En effet, la fixation du calcium modifie la conformation de cette protéine, modulant ainsi l'activité de molécules importantes telles que les phosphodiesterases, l'adénylate cyclase ou les protéines kinases. Parmi les conséquences possibles de telles perturbations, une inhibition de la phosphorylation oxydative peut alors survenir, conduisant à une diminution de la production d'ATP nécessaire à la réabsorption du sodium et de l'eau. Cette perturbation de la pompe à sodium ATP dépendante est également observée au niveau branchial, ce qui suggère que les mécanismes liant altérations du métabolisme calcique et des transports membranaires eau/solutés peuvent être similaires à ceux décrits au niveau rénal.

3.4.1.5 - Synthèse de l'étude histologique de l'appareil branchial

Le caractère pertinent des études portant sur le suivi de paramètres histologiques comme biomarqueurs d'effets, ainsi que le parallèle existant entre le tissu branchial et d'autres tissus d'intérêt en toxicologie (tels que les tissus hépatiques, rénaux ou encore intestinaux) concourent donc au fait que l'intérêt de ce type de biomarqueur "macroscopique" est devenu indéniable (Evans, 1987 ; Hinton et al., 1987 ; Au, 2004). Dans le cas précis de l'uranium, seules peu d'études se sont pourtant intéressées à ces marqueurs histologiques. Leurs résultats tendent néanmoins à confirmer nos observations réalisées sur le tissu branchial.

3.4.2 - Le tissu musculaire

A notre connaissance, seules quelques rares études traitent des effets histopathologiques d'une exposition à un contaminant sur le tissu musculaire (et aucune d'elles ne traite du cas de l'uranium). Néanmoins, selon les études successives de Wang et al. (2004), Mughal et al. (2004) et Koca et al. (2005), l'exposition à certains polluants est susceptible d'altérer la structure du tissu musculaire chez les poissons, comme nos résultats semblent le laisser supposer pour l'uranium.

Le premier de ces travaux a concerné un poisson, le violon jarbua (*Terapon jarbua*), exposé à un pesticide, le tributylétain. A la suite de cette exposition (5 µg/L durant 60 j), les auteurs ont noté la présence d'un nombre important de fibres musculaires nécrosées aussi bien au sein du muscle rouge que du muscle blanc des organismes. L'examen de coupes transversales a également permis de constater une diminution significative du diamètre des fibres, de même qu'un gonflement de leur noyau ou encore une vacuolisation de cytoplasme. En outre, les tissus lésés ont été progressivement remplacés par du tissu connectif. En effet, au sein d'un tissu normal, le muscle strié présente différents niveaux d'organisation. Le muscle est ainsi recouvert dans son entier par une couche de tissu connectif (l'épimysium). Ce tissu connectif est également présent dans le muscle (périmysium) et divise ce dernier en plusieurs fascicules contenant chacun entre 20 et 40 fibres musculaires. À l'intérieur du fascicule, les fibres musculaires sont séparées les unes des autres à nouveau par un dernier tissu connectif (l'endomysium) qui lie les fibres musculaires entre elles. Wang et al. ont ainsi constaté un déséquilibre entre tissu musculaire et connectif, le premier disparaissant progressivement au profit du second. L'observations de coupes longitudinales (dans le sens des fibres) a également permis de montrer l'apparition de myofibrilles dégénératives, la plupart d'entre elles apparaissant comme torsadées et enchevêtrées, faisant disparaître l'organisation des bandes A et Z caractéristiques des muscles striés. Cette désorganisation des myofibrilles a également été notée par Mughal et al. (2004) et Koca et al. (2005), ces auteurs ayant respectivement étudié les effets d'une contamination au cadmium sur la structure musculaire de la carpe indienne (*Labeo rohita*) et les effet d'une contamination environnementale à différents polluants (métaux lourds et pesticides notamment) sur différents tissus de la perche arc-en-ciel (*Lepomis gibbosus*). Enfin, toujours dans le cadre de l'étude de Wang et al. (2004), un examen par

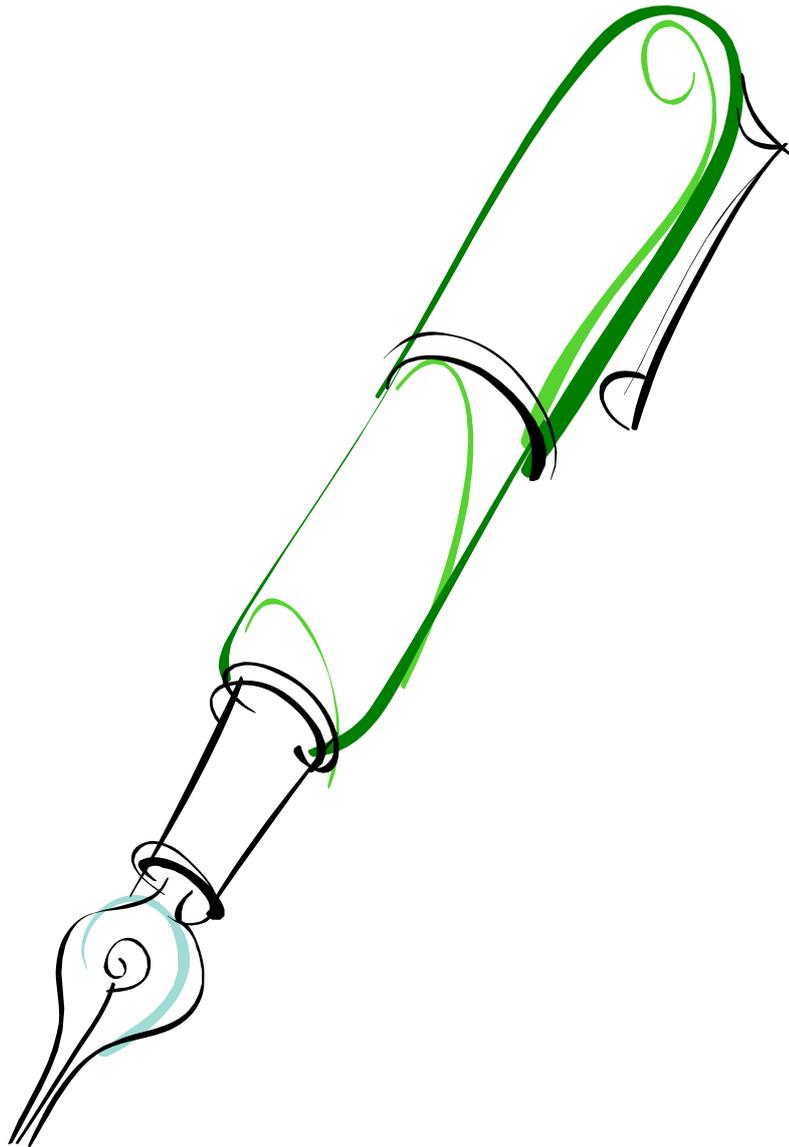
microscopie électronique à transmission a permis de montrer la présence d'amas de mitochondries au sein même des faisceaux de fibres musculaires.

La plupart des observations faites par ces auteurs recourent donc nos propres observations (désorganisation des myofibrilles et intrusions de mitochondries au sein des faisceaux), faisant apparaître de profonds remaniements du tissu musculaire et soulignant ainsi l'intérêt d'un suivi histologique du muscle chez les poissons lors d'études écotoxicologiques. Malgré cela, peu d'auteurs s'y sont intéressés. D'ailleurs aucune mention n'en est faite dans les articles de synthèse sur l'étude des histopathologies en écotoxicologie (Hinton et al., 1987 ; Au, 2004).

Etant donné le faible intérêt porté à l'étude des histopathologies musculaires, il est donc normal que peu d'études aient à ce jour été engagées sur le suivi des conséquences physiologiques de telles altérations. Seule une étude de Farchi et al. (2003) inclut un couplage de données biochimiques (expression de l'acétylcholinestérase) à des mesures physiologiques d'activité musculaire chez des souris dont la morphologie musculaire est affectée. Les auteurs, ayant travaillé sur des souris transgéniques surexprimant l'AChE-S, ont ainsi montré qu'une fatigue musculaire survient de façon anormalement rapide du fait d'une diminution progressive de la transmission nerveuse et de dysfonctionnements mécaniques musculaires. En plus de ce phénomène de fatigue précoce, le temps de récupération entre deux efforts a été notablement augmenté. Les auteurs concluent leur étude sur le fait que les divers effets constatés sur les fonctions musculaires de souris surexprimant le variant AChE-S sont la conséquence de réponses à la fois directes et indirectes de l'état hypo-cholinergique de ces souris.

D'après notre étude, incluant à la fois un suivi de l'évolution de l'activité AChE cérébrale et un examen histopathologique du muscle chez le poisson zèbre au cours d'une exposition à l'uranium, nous pouvons donc supposer que les effets enregistrés au niveau du système nerveux cholinergique et ceux constatés à l'échelle du tissu musculaire sont liés. La désorganisation des myofibrilles ainsi que l'altération de la structure générale du tissu nerveux (intrusion de mitochondries au sein des faisceaux de fibres) pourraient ainsi être la conséquence d'une suractivation de l'activité acétylcholinestérasique au niveau du tissu musculaire, de la même façon que nous avons pu le voir au niveau du tissu cérébral.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES



CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Comme annoncé dans l'introduction du manuscrit, deux objectifs majeurs constituaient notre projet initial : (i) étudier les paramètres toxicocinétiques (internalisation, distribution de l'élément dans l'organisme) et toxicologiques (mécanismes d'action toxique, effets biologiques) de l'uranium chez le poisson et (ii) estimer l'influence relative des caractéristiques chimiques et radiologiques de l'uranium sur ces paramètres.

Dans le domaine de l'évaluation de la toxicologie environnementale de l'uranium, les études s'adressant à la mesure de perturbations précoces et sublétales chez le poisson sont peu nombreuses. De plus, les résultats des quelques travaux existant n'ont pas réellement permis d'établir un profil toxicologique précis des atteintes biologiques induites par l'uranium. Par exemple, les conclusions issues des études de Labrot (Labrot, 1996 ; Labrot et al., 1999), notamment basées sur un suivi *in vitro* et *in vivo* des conséquences biologiques d'une exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), restent relativement imprécises et souvent peu consistantes (baisse inexplicquée du taux de lipides peroxydés, réponse faible et contradictoire de marqueurs de stress oxydant, etc.). Seule l'inhibition de l'acétylcholinestérase (marqueur de neurotoxicité) semble apparaître de façon plus claire. L'étude de Cooley et al. (2000) n'apporte quant à elle que peu d'informations concernant les perturbations moléculaires et précoces d'une exposition à l'uranium chez le corégone (*Coregonus clupeaformis*) par voie trophique. Ces auteurs n'ont ainsi retenu qu'une élévation de la peroxydation lipidique ainsi que des atteintes histopathologiques du foie et des reins comme marqueurs d'un stress chimique induit par l'uranium. A partir de ces observations éparées, il semble donc difficile de retracer la cascade des évènements moléculaires, cellulaires et tissulaires à leur origine. Font également défaut des études permettant d'estimer la part relative des effets chimiques et radiologiques induits *in vivo* par l'uranium.

C'est donc sur la base du constat d'un manque de connaissances concernant l'interaction uranium/poisson que notre travail de recherche a été initié, que diverses expérimentations ont été conduites, et qu'un nouveau bilan peut être proposé aujourd'hui.

SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS, HYPOTHESES

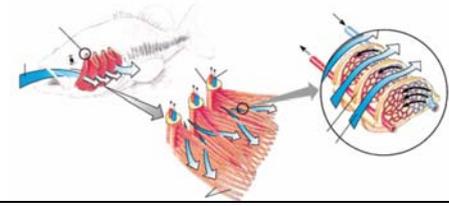
A chacun des objectifs initialement fixés, nous avons essayé d'apporter différentes réponses. L'examen toxicocinétique du comportement de l'uranium dans les poissons a ainsi permis de montrer que ce radioélément est susceptible d'être bioaccumulé et bioconcentré par les organismes à des durées et des concentrations d'exposition très faibles et donc proches de la réalité environnementale. Nous avons par ailleurs constaté une hétérogénéité de distribution de l'élément au travers de l'organisme, les tissus branchiaux et hépatiques constituant les principaux organes de stockage de l'uranium. La présence d'uranium observée également dans les gonades et le cerveau suggère en outre que l'uranium est capable de franchir les barrières physiologiques isolant normalement ces tissus de la circulation sanguine générale. Il semblerait qu'une activité radiologique suffisante conditionne le passage de l'uranium vers le compartiment gonadique, suggérant une altération radiologique de la barrière hémato-testiculaire. L'élément aurait par contre emprunté une voie métabolique "classique" pour atteindre le cerveau comme cela a été montré pour d'autres tissus. Par exemple, pour atteindre les tissus calcifiés tels que le squelette ou les écailles, l'uranium emprunte la voie métabolique normalement empruntée par le calcium. Nous pensons donc que des mécanismes analogues pourraient intervenir lors du passage de la barrière hémato-encéphalique par l'uranium.

L'accumulation et la distribution de l'uranium au sein des organismes pose alors le problème de la toxicité de ce radioélément. Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié quatre aspects possibles de l'expression de la toxicité de l'uranium : stress oxydant, neurotoxicité, génotoxicité et altérations histologiques. Nous avons ainsi pu constater un déséquilibre de la balance oxydative (du moins au niveau hépatique), une perturbation profonde du système cholinergique cérébral, l'altération de l'intégrité du matériel génétique de divers types cellulaires (érythrocytes, hépatocytes et cellules gonadiques) ainsi que des modifications structurales de différents tissus (notamment branchiaux et musculaires) chez des organismes exposés à l'uranium. En guise de synthèse, une fiche toxicologique de l'uranium est proposée, rappelant les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse (figurés en rouge), ceux dont l'analyse est toujours en cours (en vert) ainsi que les résultats obtenus par d'autres études (menées ou non sur l'uranium) et dont nous pensons qu'ils seraient susceptibles d'être induits par l'uranium (en bleu) (figure 53).

VOIE D'ENTREE : *Appareil branchial*

Accumulation

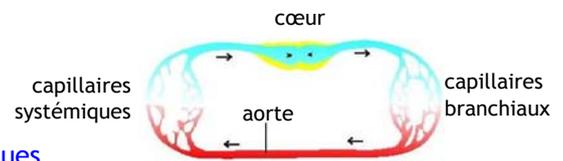
Altérations histologiques



DISTRIBUTION A TRAVERS L'ORGANISME : *Sang*

Dommages à l'ADN érythrocytaire

Perturbations des balances osmotiques, ioniques et acido-basiques



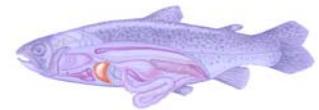
SITE MAJEUR D'ACCUMULATION : *Foie*

Accumulation

Altérations histologiques

Perturbation de la balance oxydative (↘ des activités SOD, CAT, GPX, ↘ de la quantité de GShtot)

Dommages à l'ADN hépatocytaire & Induction des systèmes de réparation



ATTEINTE DES SYSTEMES NERVEUX ET MUSCULAIRES :

Cerveau

Muscle

Passage de la barrière hémato-encéphalique

Altérations histologiques

Perturbation de la balance oxydative

Altération de la neurotransmission (↘ puis ↗ AChE)

Conséquences à long terme sur le tissu cérébral

Altération du comportement

Altérations histologiques

Perturbation de la transmission neuromusculaire

Altération de la nage, des interactions sociales (parades sexuelles), de l'alimentation, etc.



ATTEINTE DU SYSTEME REPRODUCTEUR : *Gonades*

Franchissement de la barrière hémato-testiculaire

Altérations histologiques

Dommages à l'ADN des cellules germinales

Conséquences sur la fitness des individus et donc sur la dynamique des populations



Figure 53. Synthèse des principaux résultats obtenues (en rouge), en cours d'analyse (en vert) ou proposés par d'autres auteurs et susceptibles de s'appliquer au cas de l'uranium (en bleu).

Ajoutons à ces observations que l'activité radiologique de l'élément peut, si elle est importante, influencer sur les cinétiques d'apparition de ces perturbations. Les dommages ont en effet été généralement observés de manière plus précoce lors de l'exposition à un mélange isotopique dont l'activité spécifique était importante. Néanmoins, la nature même des perturbations induites (inhibitions ou inductions enzymatiques, fragilisation de la structure de l'ADN, etc.) semble être indépendante des mécanismes (chimiques ou radiologiques) étant à leur origine. Cette remarque ne concerne néanmoins que les marqueurs biochimiques étudiés et non les manifestations histopathologiques. Dans ce cas, il est en effet apparu que les altérations structurales branchiales et musculaires ont été différentes selon l'activité radiologique mise en jeu.

En termes de perspectives sur lesquelles s'ouvrent ce travail, il apparaît important d'apporter, dans un premier temps, des éléments complémentaires permettant (i) d'affiner l'interprétation des résultats obtenus dans ce travail et (ii) d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche dans le domaine.

PERSPECTIVES

L'analyse des données issues des mesures de stress oxydant (activités des la SOD, de la CAT, de la GPx et quantité de GShtot), de neurotoxicité (activité de l'ACHé) et de génotoxicité (altération de l'intégrité de l'ADN) s'est avéré être un exercice très complexe, car nous ne disposons que d'une information limitée pour établir un "diagnostic" de la situation.

L'observation d'une baisse ou d'une augmentation d'activité enzymatique peut avoir de nombreuses origines (sous- ou surexpression génétique, altérations directes de la molécule considérée, interrelations au sein de systèmes biochimiques complexes, etc.). En outre, une absence de différence entre les mesures effectuées chez les organismes exposés à l'uranium et celles réalisées sur les témoins peut aussi bien être interprétée comme une absence totale d'effet mais peut également être révélatrice de l'activation de mécanismes de compensation induits à la suite de l'apparition de dommages. Le problème posé lors de l'interprétation d'un tel cas de figure (absence de différence entre témoins et exposés) n'est, de surcroît, pas anodin, notamment si l'on s'intéresse aux conséquences de cette apparente "absence" de réponse. En effet, si un effet toxique est réellement survenu (induit par la présence d'un contaminant) et si l'organisme a dû

allouer une partie de ses activités métaboliques à la mise en place des mécanismes de prévention, de réparation et/ou d'élimination des dommages, le bilan de l'exposition au contaminant pour l'organisme n'est pas nul (à la différence du cas de figure pour lequel aucune perturbation ne serait induite). Il est donc difficile d'établir, à la seule vue de nos résultats, un bilan exact des mécanismes sous-jacents à l'observation de nos résultats et donc du coût métabolique induit par une exposition à l'uranium.

Ainsi, il serait intéressant de mettre en place différentes études de génomique, transcriptomique et protéomique afin d'obtenir une image plus précise que celle dont nous disposons par le biais du suivi de la quantité de GShtot ou d'activités enzymatiques telles que celles de la SOD, de la CAT, de la GPx ou encore de l'ACHé. Toujours dans l'optique de mieux comprendre et expliquer nos résultats, une caractérisation précise des différentes isoformes de l'ACHé présentes au sein du tissu cérébral avant, pendant, et après une exposition à l'uranium pourrait nous permettre de mieux appréhender les conséquences à long terme des perturbations mises en évidence par notre présente étude au niveau du tissu cérébral. Enfin, afin de mieux comprendre les réponses obtenues lors du suivi de l'intégrité de l'ADN, il serait intéressant de préciser les types de dommages induits et notamment de mesurer les niveaux d'oxydation de la molécule d'ADN. Pour cela, il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expérimentations mettant en œuvre une nouvelle tentative de la version modifiée de l'essai des comètes en conditions alcalines visant à étudier les dommages oxydatifs causés à l'ADN, ou de façon plus directe, de pratiquer des dosages biochimiques de bases modifiées par oxydation telles que la 8-oxo-guanine. En outre, le développement et l'utilisation de la version neutre de l'essai des comètes pourrait permettre de caractériser de manière spécifique les cassures double brins, notamment dans le cadre de l'évaluation de la part relative des contributions chimiques et radiologiques dans la génotoxicité de l'uranium.

Il serait également intéressant de modifier les plans expérimentaux de manière à intégrer une phase de "dépurative", successive à l'exposition en elle-même. De cette manière, nous pourrions estimer la persistance relative des perturbations constatées lors de l'exposition à l'uranium.

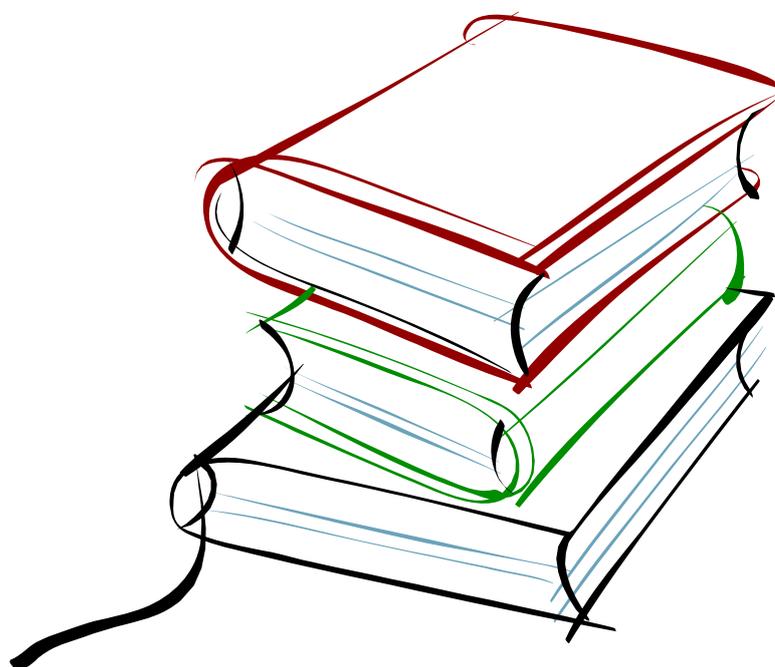
Nos résultats nous permettent également d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche à des échelles différentes de celles investiguées. Ainsi, aux considérations moléculaires et tissulaires étudiées dans le présent travail, font logiquement suite des aspects plus "intégrateurs".

L'unes des approches nouvelles sur lesquelles pourrait déboucher notre travail serait l'étude des conséquences comportementales d'une exposition à l'uranium. En effet, au travers de nos résultats nous avons montré qu'une altération du système cholinergique cérébral ainsi que de la structure musculaire surviennent à la suite d'une exposition à l'uranium. Or, l'implication du système cholinergique dans le comportement de l'individu a largement été démontrée (implication dans la mémorisation, l'anxiété, les interactions sociales mais aussi les comportements de fuite par exemple). Il serait donc très instructif de mettre en place des études visant à étudier les conséquences comportementales d'une exposition à l'uranium chez le poisson.

Enfin, nous ne pouvons qu'encourager des études portant sur les conséquences multigénérationnelles des perturbations individuelles observées suite à l'exposition à l'uranium. Par exemple, même si nous avons pu voir que l'intégrité du matériel génétique des cellules gonadiques était affectée à la suite d'une exposition à ce radioélément, seules des études menées sur la descendance des individus exposés nous permettraient de relier nos observations à de réelles conséquences populationnelles. De même, l'exposition de stades de vie plus précoces que celui auquel nous nous sommes intéressés (embryons, larves ou juvéniles par exemple), permettrait de voir si la viabilité, le développement et/ou la croissance peuvent être affectés. Au regard de nos résultats et de leur interprétation, nous pensons en effet que le matériel génétique d'organismes à des stades embryo-larvaires est susceptible d'être fortement altéré du fait notamment de leur contact accru avec le milieu extérieur. Ces altérations pourraient alors jouer un rôle crucial pour le développement de ces individus en devenir. Les conséquences (mortalité, tératogénicité, etc.) seraient donc très importantes pour la dynamique de la population. De même, notre étude de l'activité acétylcholinestérasique nous a montré que cette enzyme jouait un rôle important lors des premières étapes du développement d'un organisme. Or, l'uranium est capable de modifier cette molécule et ainsi d'altérer ses propriétés. Quelles seraient donc les conséquences de ces modifications pour les stades précoces ?

Pour conclure, nous pouvons donc dire que certaines avancées ont été faites vers l'établissement d'un profil toxicologique de l'uranium vis-à-vis des poissons. Néanmoins, de grandes questions restent posées, et non des moindres. Il reste encore donc du travail pour quelques thèses sur le sujet, en espérant que celle-ci puisse contribuer à poser quelques bases dans le domaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- [Abou-Donia](#) M.B., Dechkovskaia A.M., Goldstein L.B. et al., [2002](#), Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 72 (4): 881-890.
- [Abou-Seif](#) M.A., El-Naggar M.M., El-Far M. et al., [2003](#), Amelioration of radiation-induced oxidative stress and biochemical alteration by SOD model compounds in pre-treated gamma-irradiated rats, Clinica Chimica Acta, 337 (1-2): 23-33.
- [Adam](#) C., Larno V., Giraudo M. et al., [2007](#), Génotoxicité des radionucléides chez les organismes aquatiques - Etat de l'art et résultats préliminaires, ARET Actualités, (décembre 2006/janvier 2007): 75-84.
- [Adolff](#) J.P. et [Genet](#) M., [2001](#), L'uranium, un peu d'histoire (Chapitre 1), in EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 1-6.
- [Aigueperse](#) J., Bouvier C., Chambrette V. et al., [2001](#), Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes, Fontenay aux Roses, Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, p. 25.
- [Aït-Aïssa](#) S., Palluel O. et Porcher J.M., [2003](#), Biomarqueurs précoces d'écotoxicité, Rapport final BCRD, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, INERIS, Paris, p. 51.
- [Amici](#) A., Levine R.L., Tsai L. et al., [1989](#), Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions, Journal of Biological Chemistry, 264 (6): 3341-3346.
- [Anderson](#) D., Dobrzynska M.M., Yu T.W. et al., [1997](#), DNA integrity in human sperm, Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 17 (3): 97-102.

- [Antonio](#) M.T., Corredor L. et Leret M.L., 2003, Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium, Toxicology Letters, 143 (3): 331-340.
- [Aravindan](#) G.R., Bjordahl J., Jost L.K. et al., 1997, Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis, Experimental Cell Research, 236 (1): 231-237.
- [Arfsten](#) D.P., Bekkedal M., Wilfong E.R. et al., 2005a, Study of the reproductive effects in rats surgically implanted with depleted uranium for up to 90 days, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 68 (11-12): 967-997.
- [Arfsten](#) D.P., Schaeffer D.J., Johnson E.W. et al., 2005b, Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity, Environmental Research, 100 (2): 205-215.
- [Arfsten](#) D.P., Still K.R. et Ritchie G.D., 2001, A review of the effects of uranium and depleted uranium exposure on reproduction and fetal development, Toxicology and Industrial Health, 17 (5-10): 180-191.
- [Ashwood-Smith](#) M.J. et [Edwards](#) R.G., 1996, DNA repair by oocytes, Molecular Human Reproduction, 2 (1): 46-51.
- [ATSRD](#) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1999, Toxicological profile for uranium, Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, p. 379.
- [Au](#) D.W.T., 2004, The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review, Marine Pollution Bulletin, 48 (9-10): 817-834.
- [Azzam](#) E.I., De Toledo S.M., Gooding T. et al., 1998, Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles, Radiation Research, 150 (5): 497-504.
- [Azzam](#) E.I., De Toledo S.M., Raaphorst G.P. et al., 1996, Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in C3H 10T1/2 cells, Radiation Research, 146 (4): 369-373.

B

- Babo S. et Vasseur P., 1992, *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquatic Toxicology, 22 (1): 61-68.
- Bainy A.C.D., Saito E., Carvalho P.S.M. et al., 1996, Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site, Aquatic Toxicology, 34 (2): 151-162.
- Banerjee S. et Bhattacharya S., 1995, Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch), Ecotoxicology and Environmental Safety, 31 (1): 62-68.
- Barata C., Baird D.J. et Markich S.J., 1999, Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones: An approach using concentration-time-response surfaces, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 37 (3): 326-331.
- Barber D.S., Ehrich M.F. et Jortner B.S., 2005, The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 68 (2): 99-111.
- Barillet S., 2003, Evaluation des l'impact des polluants sur le génome d'organismes aquatiques: Comparaison de la cytométrie en flux et de l'essai des comètes dans le suivi de l'intégrité de l'ADN d'érythrocytes de poissons, Université de Metz, Metz, 56 p.
- Barnett T.B. et Metcalf R.G., 1949, The pathological anatomy of uranium poisoning, in C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., *Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Part I & II*: New York, McGraw-Hill Book Company, p. 207-235.
- Beatty K., Bieth J. et Travis J., 1980, Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin, Journal of Biological Chemistry, 255 (9): 3931-3934.

- Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J. et al., 2006, Modeling radiological dose in non-human species: principles, computerization, and application., Health Physics, 90 (5): 485-493.
- Beaugelin-Seiller K., Jasserand F., Garnier-Laplace J. et al., 2004, EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment: Environmental Studies Proceedings, p. 87-96.
- Becquerel A.H., 1896, Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents, Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 122: 501-503.
- Beers R.F. et Sizer I.W., 1952, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, Journal of Biological Chemistry, 195 (1): 133-140.
- Belyakov O.V., Malcolmson A.M., Folkard M. et al., 2001, Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts, British Journal of Cancer, 84 (5): 674-679.
- Bentley K.W., Stockwell D.R., Britt K.A. et al., 1985, Transient proteinuria and aminoaciduria in rodents following uranium intoxication, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 34 (3): 407-416.
- Berman H.A. et Leonard K., 1990, Ligand exclusion on acetylcholinesterase, Biochemistry, 29 (47): 10640-10649.
- Bernstein J.W. et Swanson S., 1989, Hematological parameters and parasite load in wild fish with elevated radionuclide levels, *in* J. A. Nriagu, ed., Aquatic Toxicology and Water Quality Management: New York, John Wiley & Sons, p. 247-265.
- Bettinelli M., Spezia S. et Minoia C., 2004, Analysis of uranium and isotopic ratio measurement in fish and marine invertebrates from the North Adriatic Sea by inductively coupled plasma mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18 (4): 465-468.
- Bird G.A. et Evenden W.G., 1996, Transfer of ^{60}Co , ^{65}Zn , ^{95}Tc , ^{134}Cs and ^{238}U from water to organic sediment, Water, Air and Soil Pollution, 86 (1-4): 251-261.
- Blakely W.F., Fuciarelli A.F., Wegher B.J. et al., 1990, Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid, Radiation Research, 121 (3): 338-343.

- Blantz R.C.**, 1975, The mechanism of acute renal failure after uranyl nitrate, Journal of Clinical Investigation, 55 (3): 621-635.
- Bleise A.**, Danesi P.R. et Burkart W., 2003, Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview, Journal of Environmental Radioactivity, 64 (2-3): 93-112.
- Bocquene G.** et **Galgani F.**, 2004, Les marqueurs biologiques des effets polluants : acétylcholinestérase.
- Bocquene G.**, Galgani F. et Walker C.H., 1997, Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité, *in* L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard & F. Ramade eds., ed., Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux: Paris, Masson, p. 209-240.
- Bonin B.** et **Blanc P.L.**, 2001, L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine (Chapitre 1), *in* EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 7-42.
- Bosque M.A.**, Domingo J.L., Llobet J.M. et al., 1993, Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate, Biological Trace Element Research, 36 (2): 109-118.
- Bosshard E.**, Zimmerli B. et Schlatter C., 1992, Uranium in the diet: Risk assessment of its nephro- and radiotoxicity, Chemosphere, 24 (3): 309-322.
- Bouaïcha N.**, 2003, Les radicaux libres, ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie) - Actualités, p. 5-7.
- Bowman F.J.** et **Foulkes E.C.**, 1970, Effects of uranium on rabbit renal tubules, Toxicology and Applied Pharmacology, 16 (2): 391-399.
- Bradford M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Analytical Biochemistry, 72 (1-2): 248-254.
- Braut-Boucher F.** et **Plantin-Carrenard E.**, 2003, Agression oxydante et régulation cellulaire, ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie) - Actualités, p. 14-19.

- Breton J., Sichel F. et Prévost V., 2003, Stress oxydant et génotoxicité, ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie) - Actualités, p. 20-25.
- Briner W. et Murray J., 2005, Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats, Neurotoxicology and Teratology, 27 (1): 135-144.
- Brown P.L. et Markich S.J., 2000, Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model, Aquatic Toxicology, 51 (2): 177-194.
- Bucheli T.D. et Fent K., 1995, Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 25 (3): 201-268.
- Buet A., Barillet S., Camilleri V. et al., 2005, Alterations of oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure, Radioprotection, 40 (suppl. 1): S151-S155.
- Buhl K.J. et Hamilton S.J., 1996, Toxicity of inorganic contaminants, individually and in environmental mixtures, to three endangered fishes (Colorado squawfish, bonytail, and razorback sucker), Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 30 (1): 84-92.
- Bussy C., 2005, Effets chimique et radiologique d'une ingestion chronique d'uranium sur le cerveau du rat., Université Paris 7 - Denis Diderot, 238 p.
- Bussy C., Lestaevel P., Dhieux B. et al., 2006, Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain, NeuroToxicology, 27 (2): 245-252.
- Bywater J.F., Banaczowski R. et Bailey M., 1991, Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from northern Australia, Environmental Toxicology and Chemistry, 10: 1449-1458.

C

- Cadenas E. et Sies H., 1985, Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity, Advances in Enzyme Regulation, 23: 217-237.

- Calmet D., Flüry-Hérard A., Jimonet C. et al., 2003, Toxicologie radiologique et chimique, Clefs CEA.
- Camp S., Zhang L., Marquez M. et al., 2005, Acetylcholinesterase (AChE) gene modification in transgenic animals: Functional consequences of selected exon and regulatory region deletion, Chemico-Biological Interactions, 157-158: 79-86.
- Campbell P.G.C., 1995, Interaction between trace metals and aquatic organisms : a critique of the Free-Ion Activity Model, in A. Tessier, and D. R. Turner, eds., Metal speciation and bioavailability in aquatic systems: New York, John Wiley and Sons, p. 45-102.
- Carafoli E., Tiozzo R., Pasquali-Ronchetti I. et al., 1971, A study of Ca²⁺ metabolism in kidney mitochondria during acute uranium intoxication, Laboratory Investigation, 25 (6): 516-527.
- CE (Communauté Européenne), 2001a, Directive du Conseil n° 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses - Annexe 5 - Partie C.14 - Poisson, Essai sur la croissance des juvéniles [Modifiée par la directive n° 2001/59/CE du 6 août 2001], Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE), p. 17.
- CE (Communauté Européenne), 2001b, Directive du Conseil n° 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses - Annexe 5 - Partie C.15 - Poisson, Essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin [Modifiée par la directive n° 2001/59/CE du 6 août 2001], Journal Officiel des Communautés Européennes (JOCE), p. 18.
- Chan K.M., Ku L.L., Chan P.C.Y. et al., 2006, Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions, Marine Environmental Research, 62 (suppl. 1): S83-S87.
- Chandra J., Samali A. et Orrenius S., 2000, Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, Free Radical Biology and Medicine, 29 (3-4): 323-333.

- Charron R.A., Fenwick J.C., Lean D.R. et al., 2000, Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, Photochemistry and Photobiology, 72 (3): 327-333.
- Chassard-Bouchaud C., 1982, Bioaccumulation of environmental uranium by aquatic organisms: A structural, ultrastructural and microanalytical study of experimental and *in situ* sampled species, Biologie Cellulaire, 45: 220.
- Chassard-Bouchaud C., 1983, Cellular and subcellular localization of uranium in the crab *Carcinus maenas*: A microanalytical study, Marine Pollution Bulletin, 14 (4): 133-136.
- Chassard-Bouchaud C., 1988, Metabolism and cytotoxicity of uranium in *Mytilus sp.*: a structural, ultrastructural and microanalytical study., Oceanis, 14 (1): 167-195.
- Chassard-Bouchaud C. et Hallegot P., 1984, Lysosomes and pollution, Biologie Cellulaire, 51: 15A.
- Chen J., Meyerhof D.P. et Tracy B.L., 2004, Model results of kidney burdens from uranium intakes, Health Physics, 86 (1): 3-11.
- Cheriyann V.D., Kurien C.J., Birajalaxmi D. et al., 1999, Genetic monitoring of the human population from high-level natural radiation areas of Kerala on the Southwest Coast of India. II. Incidence of numerical and structural chromosomal aberrations in the lymphocytes of newborns, Radiation Research, 152 (suppl. 6): S154-S158.
- Ciereszko A. et Dabrowski K., 2000, Effect of ascorbic acid supplement in vitro on rainbow trout sperm viability, Aquaculture International, 8 (1): 1-8.
- Ciereszko A., Dabrowski K., Lin F. et al., 1999, Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56 (2): 178-183.
- Ciereszko A., Wolfe T.D. et Dabrowski K., 2005, Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir, Aquatic Toxicology, 73 (2): 128-138.
- Clulow F.V., Dave N.K., Lim T.P. et al., 1998, Radionuclides (lead-210, polonium-210, thorium-230, and -232) and thorium and uranium in water, sediments, and fish from lakes near the city of Elliot Lake, Ontario, Canada, Environmental Pollution, 99 (2): 199-213.

- Coello W.F. et Khan M.A., 1996, Protection against heavy metal toxicity by mucus and scales in fish, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 30 (3): 319-326.
- Coen N., Mothersill C., Kadhim M. et al., 2001, Heavy metals of relevance to human health induced genomic instability, Journal of Pathology, 195 (3): 293-299.
- Cohen O., Erb C., Ginzberg D. et al., 2002, Neuronal overexpression of "readthrough" acetylcholinesterase is associated with antisense-suppressible behavioral impairments, Molecular Psychiatry, 7 (8): 874-885.
- Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S. et al., 2001, Comportement de l'uranium dans l'environnement (Chapitre 6), in EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 187-212.
- Cooley H.M., Evans R.E. et Klaverkamp J.F., 2000, Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*), Aquatic Toxicology, 48 (4): 495-515.
- Cooley H.M. et Klaverkamp J.F., 2000, Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*), Aquatic Toxicology, 48 (4): 477-494.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. et al., 1997a, Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, in Masson, ed., Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux: Paris, p. 125-148.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. et al., 1997b, Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques, in Masson, ed., Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux: Paris, p. 149-164.
- Cowart J.B. et Burnett W.C., 1994, The distribution of uranium and thorium decay-series radionuclides in the environment - A review, Journal of Environmental Quality, 23 (4): 651-662.
- Craft E., Abu-Qare A., Flaherty M. et al., 2004, Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects, Journal of Toxicology and Environmental Health Part B : Critical Reviews, 7 (4): 297-317.

Cummins R.J., Mothersill C., Seymour C.B. et al., 1999, The effect of microcolony size, at time of irradiation, on colony forming ability, International Journal of Radiation Biology, 75 (2): 225-232.

D

Dallinger R., Prosi F., Segner H. et al., 1987, Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research, Oecologia, V73 (1): 91-98.

Das K.C., Hanifa A. et Goswami T.D., 1986, The uranium content in the blood of some vertebrates, International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements, 12 (1-6): 789-792.

Davies K.J., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9895-9901.

Davies K.J. et Delsignore M.E., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9908-9913.

Davies K.J., Delsignore M.E. et Lin S.W., 1987a, Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9902-9907.

Davies K.J., Lin S.W. et Pacifici R.E., 1987b, Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9914-9920.

Davies M.J., 1996, Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage, Archives of Biochemistry and Biophysics, 336 (1): 163-172.

Davies M.J., 2003, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, Biochemical and Biophysical Research Communications, 305 (3): 761-770.

Davies M.J., 2005, The oxidative environment and protein damage, Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1703 (2): 93-109.

- Davies P.H., 1980, Acute toxicity to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) in soft water, Water pollution studies project F-33-R, Federal Aid in Fish and Wildlife Restoration, Fort Collins, CO, Colorado Division of Wildlife.
- de Almeida E.A., Miyamoto S., Bainy A.C.D. et al., 2004, Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals, Marine Pollution Bulletin, 49 (5-6): 386-392.
- de la Torre F.R., Ferrari L. et Salibian A., 2002, Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 131 (3): 271-280.
- de la Torre F.R., Salibian A. et Ferrari L., 2000, Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium, Environmental Pollution, 109 (2): 277-282.
- Deb S.C. et Santra S.C., 1997, Bioaccumulation of metals in fishes: An in vivo experimental study of a sewage fed ecosystem, Environmentalist, 17 (1): 27-32.
- DeLeve L.D. et Kaplowitz N., 1991, Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, Pharmacology and Therapeutics, 52 (3): 287-305.
- Dembélé K., Haubruge E. et Gaspar C., 1999, Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62 (6): 731-742.
- Denison F., 2004, Uranium(VI) speciation : modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models - Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve, Université de Provence Aix - Marseille I, 338 p.
- Depledge M.H., 1994, The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools, in M. C. Fossi, and C. Leonzio, eds., *Nondestructive biomarkers in vertebrates*: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, p. 261-285.
- Depledge M.H., Amaral-Mendes J.J., Daniel B. et al., 1993, The conceptual basis of the biomarker approach, in D. B. Peakall, and L. R. Shugart, eds., *Biomarkers. Research and application in the assessment of environmental health*: NATO Advanced Science Institutes Series, v. H 68: Berlin, Springer Verlag, p. 15-29.

- Devaux A., Pesonen M. et Monod G., 1997, Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes, Toxicology in Vitro, 11 (1-2): 71-73.
- Dewit T., Clulow V., Jackson J.S. et al., 2001, Uranium and uranium decay series radionuclide dynamics in bone of rats following chronic uranium ore dust inhalation, Health Physics, 81 (5): 502-513.
- Di Giulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J. et al., 1989, Biochemical responses in aquatic animals : A review of determinants of oxidative stress, Environmental Toxicology and Chemistry, 8: 1103-1123.
- Diamond G.L., 1989, Biological consequences of exposure to soluble forms of natural uranium, Radiation Protection Dosimetry, 26 (1-4): 23-33.
- Diaz Sylvester P.L., Lopez R., Ubios A.M. et al., 2002, Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation, Archives of Environmental Health, 57 (4): 320-325.
- Dietrich G.J., Szpyrka A., Wojtczak M. et al., 2005, Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, Theriogenology, 64 (8): 1809-1822.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M. et al., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement,, Free Radical Biology and Medicine, 32 (11): 1102-1115.
- Domingo J.L., 2001, Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review, Reproductive Toxicology, 15 (6): 603-609.
- Domingo J.L., Llobet J.M., Tomas J.M. et al., 1987, Acute toxicity of uranium in rats and mice, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 39 (1): 168-174.
- Domingo J.L., Ortega A., Paternain J.L. et al., 1989a, Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration, Archives of Environmental Health, 44 (6): 395-398.
- Domingo J.L., Paternain J.L., Llobet J.M. et al., 1989b, The developmental toxicity of uranium in mice, Toxicology, 55 (1-2): 143-152.

[Dounce A.L., 1949](#), The mechanism of action of uranium compounds in the animal body, *in* C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., *Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Part I & II*: New York, McGraw-Hill Book Company, p. 951-991.

[Dublineau I., Grison S., Baudelin C. et al., 2005](#), Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat, *International Journal of Radiation Biology*, 81 (6): 473-482.

[Dygert H., LaBelle C.W., Laskin S. et al., 1949](#), Toxicity following inhalation, *in* C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., *Pharmacology and toxicology of uranium compounds: New-York*, McGraw-Hill Book Co., p. 423-700.

E

[Eaton R.C. et Farley R.D., 1974](#), Spawning cycle and egg production of zebrafis *Brachydanio rerio* in the laboratory., *Copeia*, 1: 195-203.

[Ejnik J.W., Carmichael A.J., Hamilton M.M. et al., 2000](#), Determination of the isotopic composition of uranium in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Health Physics*, 78 (2): 143-146.

[Eller-Jessen K. et Crivello J.F., 1998](#), Subcutaneous NaAs³⁺ exposure increases metallothionein mRNA and protein expression in juvenile winter flounder, *Aquatic Toxicology*, 42 (4): 301-320.

[Ellman G.L., Courtney K., Andres V.J.R. et al., 1961](#), A new and rapid colorimetric determination of AChE activity., *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.

[Emery R.M., Klopfer D.C., Baker D.A. et al., 1981](#), Potential radiation dose from eating fish exposed to actinide contamination, *Health Physics*, 40 (4): 493-510.

[Environnement Canada, 2003](#), Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation - Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain), Gouvernement du Canada.

Ercal N., Gurer-Orhan H. et Aykin-Burns N., 2001, Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage, Current Topics in Medicinal Chemistry, 1 (6): 529-539.

Ervanne H., 2004, Oxidation state analysis of uranium with emphasis on chemical speciation in geological media: Academic Dissertation thesis, University of Helsinki, Helsinki, 61 p.

Evans D.H., 1987, The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants, Environmental Health Perspectives, Vol. 71: 47-58.

F

Farang A.M., Stansbury M.A., Hogstrand C. et al., 1995, The physiological impairment of free-ranging brown trout exposed to metals in the Clark Fork River, Montana, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52: 2038-2050.

Farchi N., Soreq H. et Hochner B., 2003, Chronic acetylcholinesterase overexpression induces multilevelled aberrations in mouse neuromuscular physiology, Journal of Physiology, 546 (1): 165-173.

Favier A., 2003, Le stress oxydant, L'actualité chimique: 108-115.

Feinendegen L.E., Bond V.P., Booz J. et al., 1988, Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects, International Journal of Radiation Biology, 53 (1): 23-37.

Feinendegen L.E., Muhlensiepen H., Bond V.P. et al., 1987, Intracellular stimulation of biochemical control mechanisms by low-dose, low-LET irradiation, Health Physics, 52 (5): 663-669.

Felip A., Piferrer F., Carrillo M. et al., 1999, The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), Heredity, 83 (4): 387-397.

Fisenne I.M., Perry P.M. et Harley N.H., 1988, Uranium in humans, Radiation Protection Dosimetry, 24 (1-4): 127-131.

Flamenbaum W., McNeil J.S., Kotchen T.A. et al., 1972, Experimental acute renal failure induced by uranyl nitrate in the dog, Circulation Research, 31 (5): 682-698.

- Flüry-Hérard A. et Ménétrier F., 2003, Les effets de l'irradiation sur les fonctions de reproduction - Radionucléides et gonades: l'exemple du plutonium, Clés CEA, p. 56-57.
- Folmar L.C., 1993, Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects, Environmental Toxicology and Chemistry, 12 (2): 337-375.
- Forbes V.E., Palmqvist A. et Bach L., 2006, The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology, Environmental Toxicology and Chemistry, 25 (1): 272-280.
- Fossi M.C. et Marsili L., 1997, The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals, Biomarkers, 2 (4): 205-216.
- Fulton M.H. et Key P.B., 2001, Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects, Environmental Toxicology and Chemistry, 20 (1): 37-45.

G

- Galaris D. et Evangelou A., 2002, The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 42 (1): 93-103.
- Galgani F., Bocquené G. et Burgeot T., 1996, Acetylcholinesterase and ethoxyresorufin-o-deethylase in the surgeonfish *Acanthurus bahianus* around Martinique Island (French West Indies), Biomarkers, 1 (3): 208-210.
- Galle P., 1974, Role of lysosomes and mitochondria in the handling of mineral compounds by the kidney, Journal of Microscopy, 19 (1): 17-24.
- Galle P., 1997, Uranium (Chapitre 13), in Masson, ed., Toxiques nucléaires (2ème édition): Paris, p. 185-206.
- Galle P., Berry J.P. et Galle C., 1992, Role of alveolar macrophages in precipitation of mineral elements inhaled as soluble aerosols, Environmental Health Perspectives, 97: 145-147.
- Galletti M., D'Annibale L., Pinto V. et al., 2003, Uranium daily intake and urinary excretion: a preliminary study in Italy, Health Physics, 85 (2): 228-235.

- Garaj-Vrhovac V. et Kopjar N., 2003, The alkaline comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation, Mutagenesis, 18 (3): 265-271.
- Garrison W.M., 1987, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins, Chemical Reviews, 87 (2): 381-398.
- Gazin V., Kerdine S., Grillon G. et al., 2004, Uranium induces TNF α secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line, Toxicology and Applied Pharmacology, 194 (1): 49-59.
- Gebicki S. et Gebicki J.M., 1999, Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides, Biochemical Journal, 338 (3): 629-636.
- Gharbi N. et Moussa F., 2003, Stress oxydatif et systèmes antioxydants, ARET (Association pour la Recherche en Toxicologie) - Actualités, p. 8-13.
- Gheusi G., Bluthe R.M., Goodall G. et al., 1994, Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats, Psychopharmacology, 114 (4): 644-650.
- Ghiassi-Nejad M., Mortazavi S.M.J., Cameron J.R. et al., 2002, Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: Preliminary biological studies, Health Physics, 82 (1): 87-93.
- Ghosh P. et Thomas P., 1995, Binding of metals to red drum vitellogenin and incorporation into oocytes, Marine Environmental Research, 39 (1-4): 165-168.
- Giari L., Manera M., Simoni E. et al., 2007, Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium, Chemosphere, 67 (6): 1171-1181.
- Gilman A.P., Moss M.A., Villeneuve D.C. et al., 1998, Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit, Toxicological Sciences, 41: 138-151.
- Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al., 1998, Uranyl nitrate: 91-day toxicity studies in the New Zealand white rabbit, Toxicological Sciences, 41: 129-137.
- Gilman A.P., Villeneuve D.C., Secours V.E. et al., 1998, Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the sprague-dawley rat, Toxicological Sciences, 41: 117-128.

- [Giraud](#) M., 2006, Développement et optimisation du test des comètes sur cellules primaires isolées de poisson zèbre (*Danio rerio*) : Application à l'étude des effets de l'uranium - Stage de recherche - Master 2, Université de Provence Aix - Marseille I, 30 p.
- [Gomaa](#) M.N.E., Abou-Arab A.A.K., Badawy A. et al., 1995, Distribution pattern of some heavy metals in Egyptian fish organs, Food Chemistry, 53 (4): 385-389.
- [Goodhead](#) D.T., 1993, Biological effects of high energy radiations, Radiation Protection Dosimetry, 48 (1): 111-114.
- [Grimes](#) S.R., 1986, Nuclear proteins in spermatogenesis, Comparative Biochemistry and Physiology part B - Comparative Biochemistry, 83 (3): 495-500.
- [Griswold](#) W.R. et [McIntosh](#) R.M., 1973, Increased urinary excretion of a basement membrane like glycoprotein in acute uranium nephropathy, Experientia, 29 (5): 575-576.
- [Grosovsky](#) A.J., 1999, Radiation-induced mutations in unirradiated DNA, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96 (10): 5346-5347.
- [Grue](#) C.E., Hart A.D.M. et Mineau P., 1991, Biology and the consequences of depressed cholinesterase activity in wildlife., in P. Mineau, ed., Cholinesterase-inhibiting pesticides. Impact on wildlife.: Amsterdam, Elsevier, p. 151-209.
- [Gueniot](#) B., Munier-Lamy C. et Berthelin J., 1988a, Geochemical behavior of uranium in soils, part I. Influence of pedogenetic processes on the distribution of uranium in aerated soils, Journal of Geochemical Exploration, 31 (1): 21-37.
- [Gueniot](#) B., Munier-Lamy C. et Berthelin J., 1988b, Geochemical behavior of uranium in soils, part II. Distribution of uranium in hydromorphic soils and soil sequences. Applications for surficial prospecting, Journal of Geochemical Exploration, 31 (1): 39-55.
- [Guglielmotti](#) M.B., Ubios A.M., De Rey B.M. et al., 1984, Effects of acute intoxication with uranyl nitrate on bone formation, Experientia, 40 (5): 474-476.
- [Gwiazda](#) R.H., Squibb K., McDiarmid M. et al., 2004, Detection of depleted uranium in urine of veterans from the 1991 Gulf War, Health Physics, 86 (1): 12-18.

H

- Hahn F.F., Guilmette R.A. et Hoover M.D., 2002, Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats, Environmental Health Perspectives, 110 (1): 51-59.
- Hahn O. et Strassmann F., 1939, Concerning the existence of alkaline earth metals resulting from neutron irradiation of uranium, Die naturwissenschaften 27: 11-15.
- Haines T.A. et Brumbaugh W.G., 1994, Metal concentration in the gill, gastrointestinal tract, and carcass of white suckers (*Catostomus commersoni*) in relation to lake acidity, Water, Air and Soil Pollution, 73 (1-4): 265-274.
- Haley D.P., Bulger R.E. et Dobyan D.C., 1982, The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney, Virchows Archiv Abteilung B Cell Pathology, 41 (1-2): 181-192.
- Hamer D.H., 1986, Metallothionein, Annual Review of Biochemistry, 55: 913-951.
- Hamilton E.I., 1971, The concentration and distribution of uranium in human skeletal tissues, Calcified tissue research, 7 (2): 150-162.
- Hamilton M.M., Ejniak J.W. et Carmichael A.J., 1997, Uranium reactions with hydrogen peroxide studied by EPR-spin trapping with DMPO, Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2, (12): 2491-2494.
- Hamilton S.J., 1995, Hazard assessment of inorganics to three endangered fish in the Green River, Utah, Ecotoxicology and Environmental Safety, 30 (2): 134-142.
- Hamilton S.J. et Buhl K.J., 1997, Hazard evaluation of inorganics, singly and in mixtures, to flannelmouth sucker *Catostomus latipinnis* in the San Juan River, New Mexico, Ecotoxicology and Environmental Safety, 38 (3): 296-308.
- Handy R.D., 1996, Dietary exposure to toxic metals in fish, in E. W. Taylor, ed., Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches: Cambridge, Cambridge University Press, p. 29-60.

- Hansen B.H., Rømme S., Garmo Ø.A. et al., 2006a, Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels, Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology, 143 (3): 263-274.
- Hansen B.H., Rømme S., Søfteland L.I.R. et al., 2006b, Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cu-exposure in brown trout (*Salmo trutta*), Chemosphere, 65 (10): 1707-1714.
- Harrison S.E., Klaverkamp J.F. et Hesslein R.H., 1990, Fates of metal radiotracers added to a whole lake: Accumulation in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*), Water, Air and Soil Pollution, 52 (3-4): 277-293.
- Hart D.R., McKee P.M., Burt A.J. et al., 1986, Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario, Journal of Great Lakes Research, 12 (3): 206-220.
- Hartwig A., Asmuss M., Blessing H. et al., 2002a, Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability, Food and Chemical Toxicology, 40 (8): 1179-1184.
- Hartwig A., Asmuss M., Ehleben I. et al., 2002b, Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: Molecular mechanisms, Environmental Health Perspectives, 110 (suppl. 5): 797-799.
- Hartwig A., Kruger I. et Beyersmann D., 1994a, Mechanisms in nickel genotoxicity: The significance of interactions with DNA repair, Toxicology Letters, 72 (1-3): 353-358.
- Hartwig A., Mullenders L.H.F., Schlepegrell R. et al., 1994b, Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells, Cancer Research, 54 (15): 4045-4051.
- Hartwig A. et Schwerdtle T., 2002, Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications, Toxicology Letters, 127 (1-3): 47-54.
- Haven F.L., 1949, Tolerance to uranium compounds, in C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Part I & II: New York, McGraw-Hill Book Company p. 729-758.

- Hawkins C.L. et Davies M.J., 2001, Generation and propagation of radical reactions on proteins, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1504 (2-3): 196-219.
- Hengé-Napoli M.H., Ansoborlo E., Claraz M. et al., 1996, Role of alveolar macrophages in the dissolution of two different industrial uranium oxides, Cellular and Molecular Biology, 42 (3): 413-420.
- Hengé-Napoli M.H., L'azou B., Bérard P. et al., 2001, Toxicité de l'uranium (Chapitre 8), *in* EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 239-260.
- Hengé-Napoli M.H., Zhang L., Gibert R. et al., 1998, Chemical transformation of uranium tetroxide particles in rat lungs after intratracheal deposit, Journal of Trace and Microprobe Techniques, 16 (2): 195-208.
- Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G.C. et al., 1992, Histopathologic biomarkers, *in* R. J. Huggett, R. A. Kimerly, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, eds., Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress: Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, p. 155-210.
- Hinton D.E., Couch J.A., Teh S.J. et al., 1988, Cytological changes during progression of neoplasia in selected fish species, Aquatic Toxicology, 11 (1-2): 77-112.
- Hinton D.E., Lantz R.C. et Hampton J.A., 1987, Normal versus abnormal structure: Considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants, Environmental Health Perspectives, Vol. 71: 139-146.
- Hinton D.E. et Lauren D.J., 1990, Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure, *in* J. F. McCarthy, and L. R. Shugart, eds., Biomarkers of Environmental Contamination: Boca Raton, Lewis Publishers, p. 17-57.
- Hodge H.C., 1973, A history of uranium poisoning (1824-1942), *in* H. C. Hodge, J. N. Stannard, and J. B. Hursh, eds., Handbook of experimental pharmacology, New Series XXXVI, Uranium, Plutonium, Transplutonic elements: New-York, Springer-Verlag, p. 5-69.
- Holdway D.A., 1992, Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish, The Science of The Total Environment, 125: 137-158.

- Hornung R.W., Deddens J.A. et Roscoe R.J., 1998, Modifiers of lung cancer risk in uranium miners from the Colorado Plateau, Health Physics, 74 (1): 12-21.
- Houpert P., Lestaevel P., Amourette C. et al., 2004, Effect of U and ¹³⁷Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 82 (2): 161-166.
- Houpert P., Lestaevel P., Bussy C. et al., 2005, Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat, NeuroToxicology, 26 (6): 1015-1020.
- Howland J.W., 1949, Studies on human exposures to uranium compounds, in C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Part I & II: New-York, McGraw-Hill Book Company, p. 993-1017.
- Hu Q. et Zhu S., 1990, Induction of chromosomal aberrations in male mouse germ cells by uranyl fluoride containing enriched uranium, Mutation Research, 244 (3): 209-214.
- Hughes C.M., Lewis S.E.M., McKelvey-Martin V.J. et al., 1996, A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay, Molecular Human Reproduction, 2 (8): 613-619.
- Hughes C.M., Lewis S.E.M., McKelvey-Martin V.J. et al., 1997, Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay, Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 374 (2): 261-268.
- Hursh J.B. et Spoor N.L., 1973, Uranium data on man, in H. C. Hodge, J. N. Stannard, and J. B. Hursh, eds., Uranium, Plutonium, Transplutonic Elements: Handbook of Experimental Pharmacology: Berlin, Springer-Verlag, p. 197-239.
- Hyne R.V., Padovan A., Parry D.L. et al., 1993, Increased fecundity of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* on a diet supplemented with a green alga, and its use in uranium toxicity tests, Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 44 (3): 389-399.
- Hyne R.V., Rippon G.D. et Ellender G., 1992, pH-Dependent uranium toxicity to freshwater hydra, The Science of The Total Environment, 125: 159-173.
- Hynes T.P., 1990, The impacts of the Cluff Lake uranium mine and mill effluents of northern Saskatchewan: M.Sc. thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, 214 pp p.

I

Imai H. et Nakagawa Y., 2003, Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, Free Radical Biology and Medicine, 34 (2): 145-169.

Irwin R.J., VanMouwerik M., Stevens L. et al., 1997, Environmental contaminants encyclopedia : uranium entry, Fort Collins, Colorado, National Park Service, Water Resources Division, p. 65.

ISO (International Organization for Standardization), 1996a, Norme ISO 7346-1 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 1 : Méthode statique.

ISO (International Organization for Standardization), 1996b, Norme ISO 7346-2 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 2 : Méthode semi-statique.

ISO (International Organization for Standardization), 1996c, Norme ISO 7346-3 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë létale des substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana (Téléostei, Cyprinidae)] - Partie 3 : Méthode avec renouvellement continu.

ISO (International Organization for Standardization), en projet, Norme ISO/DIS 15088 relative à la qualité de l'eau : Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des oeufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*).

J

- Jagoe C.H., Faivre A. et Newman M.C., 1996, Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II), Aquatic Toxicology, 34 (2): 163-183.
- Jaikrishan G., Andrews V.J., Thampi M.V. et al., 1999, Genetic monitoring of the human population from high-level natural radiation areas of Kerala on the southwest coast of India. I. Prevalence of congenital malformations in newborns, Radiation Research, 152 (suppl. 6): S154-S158.
- Jarup L., 2003, Hazards of heavy metal contamination, British Medical Bulletin, 68: 167-182.
- Jelka S., Milica K.F., Dragana P. et al., 2005, A study on oxidative stress and peripheral blood parameters of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition, Acta Veterinaria, 55 (4): 269-278.
- Jensen S.J.K., 2003, Oxidative stress and free radicals, Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 666-667: 387-392.
- Jeziarska B. et Witeska M., 2004, The effect of metals on fish gill functions - Gas and ion exchange (review), Fresenius Environmental Bulletin, 13 (12 A): 1370-1378.
- Joiner M.C., Lambin P., Malaise E.P. et al., 1996, Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance, Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 358 (2): 171-183.
- Joiner M.C., Lambin P. et Marples B., 1999, Adaptive response and induced resistance, Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, 322 (2-3): 167-175.
- Jones E.S., 1966, Microscopic and autoradiographic studies of distribution of uranium in the rat kidney, Health Physics, 12 (10): 1437-1451.
- Joshi S.R., Waite D.T. et Platford R.F., 1989, Vertical distribution of uranium mill tailings contaminants in Langley Bay, lake Athabasca sediments, The Science of the Total Environment, 87-88: 85-104.
- Jouhaud R., Biagiatti-Risbourg S., Arzac F. et al., 1999, Effets du platine chez *Brachydanio rerio* (Téléostéen, Cyprinidé). I. Toxicité aiguë: Bioaccumulation et histopathologie intestinales, Journal of Applied Ichthyology, 15 (1): 41-48.

Justyn J., Oliva O., Pivnicka K. et al., 1985, Accumulation of natural radionuclides and growth of selected fish species in contaminated waters, Vest Cs Spolec Zool, 49: 253-266.

K

Kadura S.N., Khrapunov S.N., Chabanny V.N. et al., 1983, Changes in chromatin basic proteins during male gametogenesis of grass carp, Comparative Biochemistry and Physiology part B - Comparative Biochemistry, 74 (2): 343-350.

Kalinich J.F. et McClain D.E., 2001, Staining of intracellular deposits of uranium in cultured murine macrophages, Biotechnic and Histochemistry, 76 (5-6): 247-252.

Kalinich J.F., Ramakrishnan N. et McClain D.E., 2004, Depleted uranium-induced immunotoxicity, *in* D. R. Livengoods, ed., Health effects of depleted uranium fragment, v. Special edition 98-3: Bethesda, MD : Armed Forces Radiobiology Research Institute, p. 15-17.

Kalinich J.F., Ramakrishnan N., Villa V. et al., 2002, Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages, Toxicology, 179 (1-2): 105-114.

Kang J.K., Sul D., Nam S.Y. et al., 2004, Effects of lead exposure on the expression of phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase mRNA in the rat brain, Toxicological Sciences, 82 (1): 228-236.

Karpas Z., Lorber A., Elish E. et al., 1998, Uptake of ingested uranium after low 'acute intake', Health Physics, 74 (3): 337-345.

Karpel R., Sternfeld M., Ginzberg D. et al., 1996, Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells, Journal of Neurochemistry, 66 (1): 114-123.

Kathren R.L., McInroy J.F., Moore R.H. et al., 1989, Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual, Health Physics, 57 (1): 17-21.

Kathren R.L. et Moore R.H., 1986, Acute accidental inhalation of U: A 38-year follow-up, Health Physics, 51 (5): 609-619.

- Kaufer D., Friedman A., Seidman S. et al., 1998, Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression, Nature, 393 (6683): 373-377.
- Kawanishi S., Hiraku Y., Murata M. et al., 2002, The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis,, Free Radical Biology and Medicine, 32 (9): 822-832.
- Kawanishi S., Hiraku Y. et Oikawa S., 2001, Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging, Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 488 (1): 65-76.
- Kehrer J.P., 1993, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Critical Reviews in Toxicology, 23 (1): 21-48.
- Khan R.A., 1999, Length-mass relationship, histopathology, and parasitism in winter flounder (*Pleurunectes americanus*) living near a PCB-contaminated naval facility in Newfoundland, Canadian Journal of Zoology, 77 (3): 381-388.
- Kille P., Kay J., Leaver M. et al., 1992, Induction of piscine metallothionein as a primary response to heavy metal pollutants: Applicability of new sensitive molecular probes, Aquatic Toxicology, 22 (4): 279-286.
- Kirby M.F., Morris S., Hurst M. et al., 2000, The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries, Marine Pollution Bulletin, 40 (9): 780-791.
- Klaproth M.H., 1789, Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehre, 2: 387-403.
- Knobel Y., Gleis M., Weise A. et al., 2006, Uranyl nitratotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97, Toxicological Sciences, 93 (2): 286-297.
- Koca Y.B., Koca S., Yildiz S. et al., 2005, Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Cine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution, Environmental Toxicology, 20 (6): 560-571.
- Kojima S., Matsuki O., Nomura T. et al., 1998, Induction of mRNAs for glutathione synthesis-related proteins in mouse liver by low doses of gamma-rays, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1381 (3): 312-318.

- Kondo T., Dale G.L. et Beutler E., 1980, Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77 (11): 6359-6362.
- Kono Y. et Fridovich I., 1982, Superoxide radical inhibits catalase, Journal of Biological Chemistry, 257 (10): 5751-5754.
- Kovalsky V.V., Vorotnitskaya I.E. et Lekarev V.S., 1967, Biogeochemical food chains of uranium in aquatic and terraneous organisms: Radioecological Concentration Processes, Proceedings of an International Symposium, p. 329-332.
- Kreimer D.I., 1994, A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials, Biochemistry, 33 (48): 14407-14418.
- Krunic A., Haveric S. et Ibrulj S., 2005, Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium, Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, 56 (3): 227-232.
- Kundt M., Ubios A.M. et Cabrini R.L., 2000, Effects of uranium poisoning on cultured preimplantation embryos, Biological Trace Element Research, 75 (1-3): 235-244.
- Kurttio P., Auvinen A., Salonen L. et al., 2002, Renal effects of uranium in drinking water, Environmental Health Perspectives, 110 (4): 337-342.
- Kurttio P., Komulainen H., Leino A. et al., 2005, Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water, Environmental Health Perspectives, 113 (1): 68-72.
- Kwon O.J., Lee S.M., Floyd R.A. et al., 1998, Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase, Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1387 (1-2): 249-256.

L

- La Touche Y.D., Willis D.L. et Dawydiak O.I., 1987, Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution, Health Physics, 53 (2): 147-162.

- Labrot F., 1996, Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité.: PhD thesis, Université Bordeaux I, Bordeaux, 259 p.
- Labrot F., Narbonne J.F., Ville P. et al., 1999, Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: comparison with the fish *Brachydanio rerio*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36 (2): 167-178.
- Lagadic L., Caquet T. et Amiard J.C., 1997, Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, in Masson, ed., Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux: Paris, p. 1-10.
- Lagadic L., Caquet T. et Ramade F., 1994, The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities, Ecotoxicology, 3 (3): 193-208.
- Lanno R.P., Hicks B. et Hilton J.W., 1987, Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper, Aquatic Toxicology, 10 (5-6): 251-263.
- Lapidot-Lifson Y., Prody C.A., Ginzberg D. et al., 1989, Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86 (12): 4715-4719.
- Laroche L., 2004, Transfert de l'uranium (+VI) en solution chez une plante supérieure : Spéciation en solution hydroponique, prise en charge par la plante, microlocalisation et effets biologiques induits: PhD thesis, Université de Provence Aix - Marseille I, 241 p.
- Lauren D.J. et McDonald D.G., 1985, Effets of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). Modulation by water hardness and pH, Journal of Comparative Physiology Part B, 155: 634-644.
- Leach L.J., Maynard E.A., Hodge H.C. et al., 1970, A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat, Health Physics, 18 (6): 599-612.

- [Leach](#) L.J., Yuile C.L. et Hodge H.C., 1973, A five year inhalation study with natural uranium dioxide (UO₂) dust. II. Postexposure retention and biologic effects in the monkey, dog and rat, Health Physics, 25 (3): 239-258.
- [Lee](#) R.F. et [Steinert](#) S., 2003, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 544 (1): 43-64.
- [Leggett](#) R.W., 1989, The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment, Health Physics, 57 (3): 365-383.
- [Leggett](#) R.W., 1994, Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium, Health Physics, 67 (6): 589-610.
- [Leggett](#) R.W. et [Harrison](#) J.D., 1995, Fractional absorption of ingested uranium in humans, Health Physics, 68 (4): 484-498.
- [Leggett](#) R.W. et [Pellmar](#) T.C., 2003, The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments, Journal of Environmental Radioactivity, 64 (2-3): 205-225.
- [Lehnert](#) B.E. et [Goodwin](#) E.H., 1997a, Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells, Cancer Research, 57 (11): 2164-2171.
- [Lehnert](#) B.E. et [Goodwin](#) E.H., 1997b, A new mechanism for DNA alterations induced by alpha particles such as those emitted by radon and radon progeny, Environmental Health Perspectives, 105 (Suppl. 5): 1095-1101.
- [Lemercier](#) V., Millot X., Ansoberlo E. et al., 2003, Study of uranium transfer across the blood-brain barrier, Radiation Protection Dosimetry, 105 (1-4): 243-245.
- [Lestaevel](#) P., Houpert P., Bussy C. et al., 2005, The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium, Toxicology, 212: 219-226.
- [Levine](#) R.L., 1983, Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue, Journal of Biological Chemistry, 258 (19): 11823-11827.

- Lew H., Pyke S. et Quintanilha A., 1985, Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats, Federation of European Biochemical Societies Letters, 185 (2): 262-266.
- Liber K. et George T., 2000 (citée par Environnement Canada, 2003), Toxicity of uranium to *Ceriodaphnia dubia* at different water hardnesses representative of northern Saskatchewan conditions - Rapport préparé pour COGEMA Ressources Inc., Saskatoon, Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Toxicity Centre, Université de la Saskatchewan.
- Lin R.H., Wu L.J., Lee C.H. et al., 1993, Cytogenetic toxicity of uranyl nitrate in Chinese hamster ovary cells, Mutation Research, 319 (3): 197-203.
- Little J.B., Nagasawa H., Pfenning T. et al., 1997, Radiation-induced genomic instability: Delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles, Radiation Research, 148 (4): 299-307.
- Livingstone D.R., 1993, Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 57 (3): 195-211.
- Livingstone D.R., 2001, Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, Marine Pollution Bulletin, 42 (8): 656-666.
- Lizon C. et Fritsch P., 1999, Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: An *in vitro* study, International Journal of Radiation Biology, 75 (11): 1459-1471.
- Llobet J.M., Sirvent J.J., Ortega A. et al., 1991, Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice, Fundamental and Applied Toxicology, 16 (4): 821-829.
- Lobel P.B., Belkhode S.P., Bajdik C. et al., 1992, General characteristics of the frequency distributions of element concentrations and of interelemental correlations in aquatic organisms, Marine Environmental Research, 33 (2): 111-126.
- Lobel P.B., Longerich H.P., Jackson S.E. et al., 1991, A major factor contributing to the high degree of unexplained variability of some elements concentrations in biological tissue: 27 elements in 5 organs of the mussel *Mytilus* as a model, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 21 (1): 118-125.

M

- [Maccubin](#) A.E., 1994, DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies, *in* D. C. Malins, and G. K. Ostrander, eds., *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*, Lewis Publishers, CRC press, p. 267-294.
- [Madic](#) C. et [Genet](#) M., 2001, Propriétés physiques et chimiques de l'uranium (Chapitre 2), *in* EDP Science, ed., *L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis*, p. 43-82.
- [Mahon](#) D.C., 1982, Uptake and translocation of naturally-occurring radionuclides of the uranium series, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 29 (6): 697-703.
- [Makinodan](#) T. et [James](#) S.J., 1990, T cell potentiation by low dose ionizing radiation: possible mechanisms, *Health Physics*, 59 (1): 29-34.
- [Malins](#) D.C., Krahn M.M. et Myers M.S., 1985, Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: Relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*), *Carcinogenesis*, 6 (10): 1463-1469.
- [Maracine](#) M. et [Segner](#) H., 1998, Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 120 (1): 83-88.
- [Marie](#) V., Gonzalez P., Baudrimont M. et al., 2006, Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*, *Biometals*, 19 (4): 399-407.
- [Markich](#) S., Brown P. et Jeffree R., 1996, The use of geochemical speciation modeling to predict the impact of uranium to freshwater biota., *Radiochimica Acta*, 74: 321-326.
- [Markich](#) S.J., Brown P.L., Jeffree R.A. et al., 2000, Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model, *Aquatic Toxicology*, 51 (2): 155-175.
- [Marnett](#) L.J., 2000, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21 (3): 361-370.

- [Martin](#) F., Earl R. et Tawn E.J., 1991, A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium, British Journal of Industrial Medicine, 48 (2): 98-102.
- [Martoriati](#) A., 1999, Organisation nucléaire des spermatozoïdes et méthodes d'évaluation des altérations du noyau - Synthèse bibliographique du DEA de biologie et productions animales option biologie aquacole - Université de Rennes I - Année universitaire 1998-1999, p. 32.
- [Matthiessen](#) P. et [Brafield](#) A.E., 1973, The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.), Journal of Fish Biology, 5 (5): 607-613.
- [Mayer](#) F.L., Versteeg D.J., McKee M.J. et al., 1992, Physiological nonspecific biomarkers, in R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, eds., Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress: Boca Raton, Lewis Publishers, p. 5-85.
- [Maynard](#) E.A., Downs W.L. et Hodge H.C., 1953, Oral toxicity of uranium compounds, in C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., Pharmacology and toxicology of uranium compounds: New-York, McGraw-Hill Book Co., p. 1121-1369
- [McCarthy](#) J.F., 1990, Concluding remarks: Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program., in J. F. McCarthy, and L. R. Shugart, eds., Biomarkers of Environmental Contamination: Boca Raton, FL, USA, Lewis, p. 429-440.
- [McCarthy](#) J.F. et [Shugart](#) L.R., 1990, Biological markers of environmental contamination, in J. F. McCarthy, and L. R. Shugart, eds., Biomarkers of environmental contamination: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, p. 3-16.
- [McClain](#) D.E., Benson K.A., Dalton T.K. et al., 2001, Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research, The Science of The Total Environment, 274 (1-3): 115-118.
- [McDiarmid](#) M.A., 2001, Depleted uranium and public health: Fifty years' study of occupational exposure provides little evidence of cancer, British Medical Journal, 322 (7279): 123-124.
- [McDiarmid](#) M.A., Engelhardt S., Oliver M. et al., 2004a, Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: A 10-year follow-up, Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 67 (4): 277-296.

- McDiarmid M.A., Engelhardt S.M. et Oliver M., 2001a, Urinary uranium concentrations in an enlarged Gulf War veteran cohort, Health Physics, 80 (3): 270-273.
- McDiarmid M.A., Jacobson-Kram D., Koloder K. et al., 1995, Increased frequencies of sister chromatid exchange in soldiers deployed to Kuwait, Mutagenesis, 10 (3): 263-265.
- McDiarmid M.A., Keogh J.P., Hooper F.J. et al., 2000, Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans, Environmental Research, 82 (2): 168-180.
- McDiarmid M.A., Squibb K., Engelhardt S. et al., 2001b, Surveillance of depleted uranium exposed Gulf War veterans: Health effects observed in an enlarged "friendly fire" cohort, Journal of Occupational and Environmental Medicine, 43 (12): 991-1000.
- McDiarmid M.A., Squibb K. et Engelhardt S.M., 2004b, Biologic monitoring for urinary uranium in Gulf War I veterans, Health Physics, 87 (1): 51-56.
- McKee P.M., Snodgrass W.J., Hart D.R. et al., 1987, Sedimentation rates and sediment core profiles of ^{238}U and ^{232}Th decay chain radionuclides in a lake affected by uranium mining and milling, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44 (2): 390-398.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P. et al., 1993, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review, Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 288 (1): 47-63.
- McKelvey-Martin V.J., Melia N., Walsh I.K. et al., 1997, Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2) human sperm and male infertility, Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 375 (2): 93-104.
- McKim J.M., Christensen G.M. et Hunt E.P., 1970, Changes in the blood of the brook trout *Salvelinus fontinalis* after short-term and long-term exposure to copper, Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 27: 1883-1889.
- McQueney M.S. et Markham G.D., 1995, Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition, Journal of Biological Chemistry, 270 (31): 18277-18284.

- [Meshorer E.](#), Biton I.E., Ben-Shaul Y. et al., [2005](#), Chronic cholinergic imbalances promote brain diffusion and transport abnormalities, The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 19 (8): 910-922.
- [Meshorer E.](#) et [Soreq H.](#), [2006](#), Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies, Trends in Neurosciences, 29 (4): 216-224.
- [Meszaros G.](#), Bognar G. et Koteles G.J., [2004](#), Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners, Journal of Occupational Health, 46 (4): 310-315.
- [Miller A.C.](#), Blakely W.F., Livengood D. et al., [1998b](#), Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride, Environmental Health Perspectives, 106 (8): 465-471.
- [Miller A.C.](#), Brooks K., Stewart M. et al., [2003](#), Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation, Journal of Environmental Radioactivity, 64 (2-3): 247-259.
- [Miller A.C.](#), Fuciarelli A.F., Jackson W.E. et al., [1998a](#), Urinary and serum mutagenicity studies with rats implanted with depleted uranium or tantalum pellets, Mutagenesis, 13 (6): 643-648.
- [Miller A.C.](#), Mog S., McKinney L. et al., [2001](#), Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: Induction of genotoxic effects, Carcinogenesis, 22 (1): 115-125.
- [Miller A.C.](#), Stewart M., Brooks K. et al., [2002a](#), Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay, Journal of Inorganic Biochemistry, 91 (1): 246-252.
- [Miller A.C.](#), Xu J., Stewart M. et al., [2002c](#), Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: Dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints, Radiation Protection Dosimetry, 99 (1-4): 275-278.
- [Miller A.C.](#), Xu J., Stewart M. et al., [2002b](#), Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions: Comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel, Military Medicine, 167 (2 suppl.): 120-122.

- Mineau P., 1991, Cholinesterase-inhibiting pesticides. Impact on wildlife.: Amsterdam, Elsevier, 379 p.
- Miossec L. et Bocquené G., 1986, Toxicité aiguë et effets sublétaux, après une courte exposition, de différents nonylphénols polyéthoxylés sur la civelle, Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes, 48 (1-2): 77-84.
- Mirto H., Barrouillet M.P., Hengé-Napoli M.H. et al., 1999b, Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells, Human and Experimental Toxicology, 18 (3): 180-187.
- Mirto H., Hengé-Napoli M.H., Gibert R. et al., 1999a, Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): Influence of uranium speciation, Toxicology Letters, 104 (3): 249-256.
- Mitchel R.E.J., Jackson J.S. et Heinmiller B., 1999, Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats, Health Physics, 76 (2): 145-155.
- Monleau M., 2005, Biocinétique et toxicologie de l'uranium chez le rat après inhalations aiguës et répétées: PhD thesis, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), 346 p.
- Monleau M., Bussy C., Lestaevel P. et al., 2005, Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations, Neuroscience Letters, 390 (1): 31-36.
- Monleau M., De Méo M., Paquet F. et al., 2006, Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats, Toxicological Sciences, 89 (1): 287-295.
- Morel F.M.M., 1983, Principles of aquatic chemistry: New York, Wiley-Intersciences, 301 p. p.
- Morrow P., Gelein R. et Beiter H., 1982, Inhalation and intravenous studies of UF₆/UO₂F₂ in dogs, Health Physics, 43 (6): 859-873.
- Mothersill C., Buckung C., Smith R.W. et al., 2006, Communication of radiation-induced stress of bystander signals between fish *in vivo*, Environmental Science and Technology, 40 (21): 6859-6864

- [Mothersill C. et Seymour C., 1997](#), Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells, International Journal of Radiation Biology, 71 (4): 421-427.
- [Mould R.F., 2001](#), Depleted uranium and radiation-induced lung cancer and leukaemia, British Journal of Radiology, 74 (884): 677-683.
- [Mughal M.S., Malkani N. et Jehan N., 2004](#), Histopathological changes in kidney and muscle of *Labeo rohita* due to cadmium intoxication, Biologia, 50 (1): 39-45.
- [Muller H.L., Taya A., Drosselmeyer E. et al., 1989](#), Cellular aspects of retention and transport of inhaled soluble and insoluble actinide compounds in the rat lung, The Science of the Total Environment, 83 (3): 239-251.
- [Munoz-Guerra S., Azorin F., Casas M.T. et al., 1982](#), Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*, Experimental Cell Research, 137 (1): 47-53.
- [Myers M.S., Olson O.P., Johnson L.L. et al., 1992](#), Hepatic lesions other than neoplasms in subadult flatfish from Puget Sound, Washington: Relationships with indices of contaminant exposure, Marine Environmental Research, 34 (1-4): 45-51.
- [Myers M.S., Stehr C.M., Olson O.P. et al., 1994](#), Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA, Environmental Health Perspectives, 102 (2): 200-215.

N

- [Nagasawa H. et Little J.B., 1992](#), Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles, Cancer Research, 52 (22): 6394-6396.
- [Nagasawa H. et Little J.B., 1999](#), Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation: Evidence for a bystander effect, Radiation Research, 152 (5): 552-557.

- Narayanan P.K., Goodwin E.H. et Lehnert B.E., 1997, Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells, Cancer Research, 57 (18): 3963-3971.
- Nathanson J.A. et Bloom F.E., 1976, Heavy metals and adenosine cyclic 3',5' monophosphate metabolism. Possible relevance to heavy metal toxicity, Molecular Pharmacology, 12 (3): 390-398.
- Neame P.A., Dean J.R. et Zytaruk B.G., 1982, Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada, Hydrobiologia, 91-92: 355-361.
- Nechay B.R., Thompson J.D. et Saunders J.P., 1980, Inhibition by uranyl nitrate of adenosine triphosphatases derived from animal and human tissues, Toxicology and Applied Pharmacology, 53 (3): 410-419.
- Newey H., Sanford P.A. et Smyth D.H., 1966, The effect of uranyl nitrate on intestinal transfer of hexoses, Journal of Physiology, 186 (3): 493-502.
- Newman M.C. et Jagoe C.H., 1994, Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments, *in* L. Hamelick, P. F. Bergman, H. L. Bergman, and W. H. Benson, eds., Bioavailability: physical, chemical and biological interactions. : Boca Raton, USA, Lewis Publishers, p. 39-61.
- Ni Shuilleabhain S., Mothersill C., Sheehan D. et al., 2006, Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride, Ecotoxicology and Environmental Safety, 65 (3): 332-341.
- Nieboer E. et Richardson D.H.S., 1980, The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions, Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical, 1 (1): 3-26.
- Nielsen P.A., 1993, Chemical carcinogenesis in the environment: Risk assessment for the environment, Pharmacology and Toxicology, Supplement, 72 (1): 46-50.
- Nitsch R.M., Rossner S., Albrecht C. et al., 1998, Muscarinic acetylcholine receptors activate the acetylcholinesterase gene promoter, Journal of Physiology, 92 (3-4): 257-264.

Niyogi S. et Wood C.M., 2003, Effects of chronic waterborne and dietary metal exposures on gill metal-binding: Implications for the biotic ligand model, Human and Ecological Risk Assessment, 9 (4): 813-846.

Norimura T., Nomoto S., Katsuki M. et al., 1996, p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis, Nature Medicine, 2 (5): 577-580.

NRC : Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987, Biological markers in environmental health research, Environmental Health Perspectives, 74: 3-9.

Nuccetelli C., Grandolfo M. et Risica S., 2005, Depleted uranium: possible health effects and experimental issues, Microchemical Journal - XI Italian Hungarian Symposium on Spectrochemistry, 79 (1-2): 331-335.

O

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004a, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 203 : Fish, acute toxicity test, *in* OECD, ed., p. 9.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004b, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 204 : Fish, prolonged toxicity test : 14 day study, *in* OECD, ed., p. 9.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004c, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 210 : Fish, early-life stage toxicity test, *in* OECD, ed., p. 18.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004d, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 212 : Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, *in* OECD, ed., p. 18.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004e, OECD guidelines for testing of chemicals, advance copy. Test 215 : Fish, juvenile growth test, *in* OECD, ed., p. 17.

- Olive P.L., 2002, The comet assay : an overview of techniques, in V. V. Didenko, ed., *Methods in molecular biology* (chapitre 14), v. 203: Totowa (New Jersey), Humana Press inc.
- Oliveira Ribeiro C.A., Pelletier E., Pfeiffer W.C. et al., 2000, Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish, *Environmental Research*, 83 (3): 286-292.
- Olojo E.A.A., Olurin K.B., Mbaka G. et al., 2005, Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead, *African Journal of Biotechnology*, 4 (1): 117-122.
- Olson K.R., Fromm P.O. et Frantz W.L., 1973, Ultrastructural changes of rainbow trout gills exposed to methyl mercury or mercuric chloride, *Federation Proceedings*, 32 (3): 261.
- Olsson P.E., Larsson A. et Haux C., 1996, Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout, *Marine Environmental Research*, 42 (1-4): 41-44.
- Orloff K.G., Mistry K., Charp P. et al., 2004, Human exposure to uranium in groundwater, *Environmental Research*, 94 (3): 319-326.
- Orsière T., Sari-Minodier I., Decome L. et al., 2005, De la génotoxicologie à la biosurveillance: 28èmes journées nationales de santé au travail dans le BTP : Cancérogènes et BTP, p. 25-28.
- Otto D.M. et Moon T.W., 1995, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout, *Pharmacology and Toxicology*, 77 (4): 281-287.
- Otto D.M. et Moon T.W., 1996, Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31 (1): 141-147.

P-Q

- Pagenkopf G.K., 1983, Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: Role of complexation, pH, and water hardness, Environmental Science and Technology, 17 (6): 342-347.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A. et al., 1986, A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts, Analytical Biochemistry, 154 (2): 536-541.
- Paquet F., Houpert P., Blanchardon E. et al., 2006, Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion, Health Physics, 90 (2): 139-147.
- Paquin P.R., Gorsuch J.W., Apte S. et al., 2002, The biotic ligand model: a historical overview, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 133 (1-2): 3-35.
- Paris-Palacios S., Biagianni-Risbourg S. et Vernet G., 2000, Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate, Aquatic Toxicology, 50 (1-2): 109-124.
- Parkhurst B.R., Elder R.G. et Meyer J.S., 1984, An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream, Environmental Toxicology and Chemistry, 3 (1): 113-124.
- Pasanen M., Lang S., Kojo A. et al., 1995, Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver, Environmental Research, 70 (2): 126-133.
- Pasquale L., Winiski A. et Oliva C., 1986, An experimental test of new theoretical models for the electrokinetic properties of biological membranes. The effect of UO_2^{++} and tetracaine on the electrophoretic mobility of bilayer membranes and human erythrocytes, Journal of General Physiology, 88 (6): 697-718.
- Passino D.R.M. et Smith S.B., 1987, Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in Great Lake fish, Environmental Toxicology and Chemistry, 6: 901-907.

- Paternain J.L., Domingo J.L., Ortega A. et al., 1989, The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice, Ecotoxicology and Environmental Safety, 17 (3): 291-296.
- Patocka J., Kassa J., Stetina R. et al., 2004, Toxicological Aspects of Depleted Uranium, Journal of Applied Biomedicine, 2 (1): 37-42.
- Pawert M., Muller E. et Triebkorn R., 1998, Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution, Tissue and Cell, 30 (6): 617-626.
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. et al., 1996, Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland, Marine Pollution Bulletin, 32 (2): 225-231.
- Peakall D., 1994, Biomarkers: the way forward in environmental assessment, Toxicology and Ecotoxicology News, 1: 55-60.
- Pearson R.G., 1963, Hard and Soft Acids and Bases, Journal of the American Chemical Society, 85 (22): 3533 - 3539
- Pelletier E. et Audet C., 1995, Tissue distribution and histopathological effects of dietary methylmercury in benthic grubby *Myoxocephalus aeneus*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 54 (5): 724-730.
- Pellmar T., Fuciarelli A., Ejnik J. et al., 1999a, Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets, Toxicological Sciences, 49 (1): 29-39.
- Pellmar T.C., Keyser D.O., Emery C. et al., 1999b, Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments, Neurotoxicology, 20 (5): 785-792.
- Pettersson H.B.L., Hallstadius L., Hedvall R. et al., 1988, Radioecology in the vicinity of prospected uranium mining sites in a subarctic environment, Journal of Environmental Radioactivity, 6 (1): 25-40.
- Pickett J.B., Specht W.L. et Keyes J.L., 1993, Acute and chronic toxicity of uranium compounds to *Ceriodaphnia dubia*, Savannah River, Aiken, South Carolina. Prepared for the Department of Energy under contract DE-AC09-89SR 18035 (WSRC-RP-92-995), p. 57.

- [Pollycove M.](#), 1998, Nonlinearity of radiation health effects, Environmental Health Perspectives, 106 (suppl. 1): 363-368.
- [Pollycove M.](#) et [Feinendegen L.E.](#), 2003, Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage, Human and Experimental Toxicology, 22 (6): 290-306.
- [Porcher J.M.](#), [Delahaye C.](#), [Hervin D.](#) et al., 2003, Caractérisation du développement embryonnaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aigüe sur les stades embryonnaire et adulte, INERIS, p. 18.
- [Poston T.M.](#), 1982, Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 28: 682-690.
- [Pouget J.P.](#), 2000, Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées: PhD thesis, Université Paris XI, Paris, 253 p.
- [Pourahmad J.](#), [Ghashang M.](#), [Ettahadi H.A.](#) et al., 2006, A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity, Environmental Toxicology, 21 (4): 349-354.
- [Powers D.A.](#), 1989, Fish as model systems, Science, 246: 352-358.
- [Prabhavathi P.A.](#), [Fatima S.K.](#), [Padmavathi P.](#) et al., 1995, Sister-chromatid exchanges in nuclear fuel workers, Mutation Research - Mutation Research Letters, 347 (1): 31-35.
- [Prabhavathi P.A.](#), [Fatima S.K.](#), [Srinivasa Rao M.](#) et al., 2000, Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 466 (1): 37-41.
- [Priest N.D.](#), 2001, Toxicity of depleted uranium, The Lancet, 357 (9252): 244-246.
- [Priest N.D.](#), [Howells G.R.](#), [Green D.](#) et al., 1982, Uranium in bone: Metabolic and autoradiographic studies in the rat, Human Toxicology, 1 (2): 97-114.
- [Pyke S.](#), [Lew H.](#) et [Quintanilha A.](#), 1986, Severe depletion in liver glutathione during physical exercise, Biochemical and Biophysical Research Communications, 139 (3): 926-931.

R

- [Radic Z.](#), [Kirchhoff P.D.](#), [Quinn D.M.](#) et al., [1997](#), Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase: Distinctions between active center ligands and fasciculin, Journal of Biological Chemistry, 272 (37): 23265-23277.
- [Ragnarsdottir K.V.](#) et [Charlet L.](#), [2000](#), Uranium behaviour in natural environments, *in* Mineral society of Great Britain & Ireland, ed., Environmental mineralogy : Microbial interactions, anthropogenic influences. Contaminated land and waste management, p. 333-377.
- [Ramade F.](#), [1998](#), Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau: Paris, Ediscience international, 786 p.
- [Ramana C.V.](#), [Boldogh I.](#), [Izumi T.](#) et al., [1998](#), Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (9): 5061-5066.
- [Rether B.](#), [Masfaraud J.F.](#), [Keith G.](#) et al., [1997](#), Biomarqueurs de génotoxicité chez les végétaux et les animaux, *in* Masson, ed., Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux: Paris, p. 185-208.
- [Ribera D.](#), [Labrot F.](#), [Tisnerat G.](#) et al., [1996](#), Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects, Reviews in Environmental Contamination and Toxicology, 146: 53-89.
- [Ripoll D.R.](#), [Faerman C.H.](#), [Axelsen P.H.](#) et al., [1993](#), An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (11): 5128-5132.
- [Ritz B.](#), [Morgenstern H.](#), [Crawford-Brown D.](#) et al., [2000](#), The effects of internal radiation exposure on cancer mortality in nuclear workers at rocketdyne/atomics international, Environmental Health Perspectives, 108 (8): 743-751.

- Roberts E., 1949, Uranyl nitrate, in C. Voegtlin, and H. C. Hodge, eds., Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Part I & II: New-York, McGraw-Hill Book Company, p. 561-585.
- Rodriguez-Yoldi M.J. et Ponz F., 1986, Uranyl action on sugar transport across rat jejunum, Revista Espanola de Fisiologia, 42 (3): 359-364.
- Roesijadi G., 1992, Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals, Aquatic Toxicology, 22 (2): 81-114.
- Rojas E., Lopez M.C. et Valverde M., 1999, Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722 (1-2): 225-254.
- Rokutan K., Thomas J.A., Sies H. et al., 1990, Role of specific protein S-thiolation under oxidative stress, Free Radical Biology and Medicine, 9: 104.
- Romani R., Antognelli C., Baldracchini F. et al., 2003, Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations, Chemico-Biological Interactions, 145 (3): 321-329.
- Roscoe R.J., 1997, An update of mortality from all causes among white uranium miners from the Colorado Plateau Study Group, American Journal of Industrial Medicine, 31 (2): 211-222.
- Rossi H.H. et Zaider M., 1997, Radiogenic lung cancer: The effects of low doses of low linear energy transfer (LET) radiation, Radiation and Environmental Biophysics, 36 (2): 85-88.
- Rouyer V., 2001, L'uranium, matière fissile et risque de criticité (Chapitre 4), in EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 115-144.
- Rowland R.E. et Farnham J.E., 1969, The deposition of uranium in bone, Health Physics, 17 (1): 139-144.
- Russell J.J., Kathren R.L. et Dietert S.E., 1996, A histological kidney study of uranium and non-uranium workers, Health Physics, 70 (4): 466-472.

S

- Salmon A., Erb C., Meshorer E. et al., 2005, Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses, Chemico-Biological Interactions, 157-158: 105-113.
- Salvi A., Carrupt P.-A., Tillement J.-P. et al., 2001, Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding, Biochemical Pharmacology, 61 (10): 1237-1242.
- Sapolsky R.M., 1998, The stress of Gulf War syndrome, Nature, 393 (6683): 308-309.
- Sato M. et Bremner I., 1993, Oxygen free radicals and metallothionein, Free Radical Biology and Medicine, 14 (3): 325-337.
- Sauer G.R. et Watabe N., 1984, Zinc uptake and its effect on calcification in the scales of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, Aquatic Toxicology, 5 (1): 51-66.
- Sauer G.R. et Watabe N., 1989, Temporal and metal-specific patterns in the accumulation of heavy metals by the scales of *Fundulus heteroclitus*, Aquatic Toxicology, 14 (3): 233-248.
- Schallreuter K.U., Elwary S.M., Gibbons N.C. et al., 2004, Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo, Biochemical and Biophysical Research Communications, 315 (2): 502-508.
- Schiedek D., Broeg K., Barsiene J. et al., 2006, Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea, Marine Pollution Bulletin, 53 (8-9): 387-405.
- Schmid E., Roos H., Rimpl G. et al., 1997, Chromosome aberration frequencies in human lymphocytes irradiated in a multi-layer array by protons with different LET, International Journal of Radiation Biology, 72 (6): 661-665.
- Schramm L., La M., Heidbreder E. et al., 2002, l-Arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation, Kidney International, 61 (4): 1423.
- Schreck C.B. et Lorz H.W., 1978, Stress resistance of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper, Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 35: 1124-1129.

- Schwartz J.H. et Flamenbaum W., 1976, Uranyl nitrate and HgCl₂ induced alterations in ion transport, Kidney International, 10 (suppl. 6): S123-127.
- Seidman S., Sternfeld M., Aziz-Aloya R.B. et al., 1995, Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 3'-terminal exons, Molecular and Cellular Biology, 15 (6): 2993-3002.
- Semaan M., Holdway D.A. et van Dam R.A., 2001, Comparative sensitivity of three populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to acute and chronic uranium exposure, Environmental Toxicology, 16 (5): 365-376.
- Shapira M., Tur-Kaspa I., Bosgraaf L. et al., 2000, A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases, Human Molecular Genetics, 9 (9): 1273-1281.
- Sheppard S.C., Sheppard M.I., Gallerand M.O. et al., 2005, Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium, Journal of Environmental Radioactivity, 79 (1): 55-83.
- Shugart L. et Theodorakis C., 1997, New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology, Biotherapy, 11 (2-3): 119-127.
- Shugart L.R., 1988, Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay, Aquatic Toxicology, 13 (1): 43-52.
- Shugart L.R., Bckham J., Jackim G. et al., 1992, DNA alterations, in R. J. Huggett, R. A. Kimerly, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, eds., Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress: Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, p. 155-210.
- Sies H., 1986, Biochemistry of oxidative stress, European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 23 (11): 1798.
- Sies H. et Akerboom T.P.M., 1984, Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues, Methods in Enzymology, 105: 445-451.
- Sies H., Gerstenecker C., Menzel H. et al., 1972, Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides, Federation of European Blochemlcal Societies Letters, 27 (1): 171-175.

- Singh N.P., Bennett D.D., Wrenn M.E. et al., 1987, Concentrations of alpha-emitting isotopes of U and Th in uranium miners' and millers' tissues, Health Physics, 53 (3): 261-265.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. et al., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Experimental Cell Research, 175 (1): 184-191.
- Skidmore J.F. et Tovell P.W.A., 1972, Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout, Water Research, 6 (3): 217-228.
- Sklan E.H., Berson A., Birikh K.R. et al., 2006, Acetylcholinesterase modulates stress-induced motor responses through catalytic and noncatalytic properties, Biological Psychiatry, 60 (7): 741-751.
- Sobocanec S., Balog T., Sverko V. et al., 2003, Sex-dependent antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in ageing mouse brain, Free Radical Research, 37 (7): 743.
- Soreq H. et Seidman S., 2001, Acetylcholinesterase - new roles for an old actor, Nature Reviews in Neuroscience, 2 (4): 294-302.
- Souidi M., Gueguen Y., Linard C. et al., 2005, *In vivo* effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat, Toxicology, 214 (1-2): 113-122.
- Spencer H., Osis D., Fisenne I.M. et al., 1990, Measured intake and excretion patterns of naturally occurring ^{234}U , ^{238}U , and calcium in humans, Radiation Research, 124 (1): 90-95.
- Spry D.J. et Wood C.M., 1984, Acid-base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during short term toxic zinc exposure, Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 154 (2): 149-158.
- Squibb K.S., Leggett R.W. et McDiarmid M.A., 2005, Prediction of renal concentrations of depleted uranium and radiation dose in gulf war veterans with embedded shrapnel, Health Physics, 89 (3): 267-273.
- Srivastava S.K. et Beutler E., 1969, The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate, Biochemical Journal, 114 (4): 833-837.

- Stadtman E.R., 1990, Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences, Free Radical Biology and Medicine, 9 (4): 315-325.
- Stark G., 2005, Functional consequences of oxidative membrane damage, The Journal of Membrane Biology, 205 (1): 1-16.
- Stearns D.M., Yazzie M., Bradley A.S. et al., 2005, Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells, Mutagenesis, 20 (6): 417-423.
- Stegeman J.J., Brouwer M., Richard T.D.G. et al., 1992, Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in R. J. Huggett, R. A. Kimerly, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, eds., Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress: Chelsea, MI, USA, Lewis Publishers, p. 235-335.
- Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P. et al., 2003, Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants, Marine Environmental Research, 55 (2): 137-159.
- Sterba G., 1962, Cyprinidae, in Vista Book, ed., Freshwater fishes in the world: London, p. 231-332.
- Sternfeld M., Shoham S., Klein O. et al., 2000, Excess "read-through" acetylcholinesterase attenuates but the "synaptic" variant intensifies neurodeterioration correlates, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (15): 8647-8652.
- Stevens W., Bruenger F.W. et Atherton D.R., 1980, The distribution and retention of hexavalent ²³³U in the beagle, Radiation Research, 83 (1): 109-126.
- Stohs S.J. et Bagchi D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, Free Radical Biology and Medicine, 18 (2): 321-336.
- Stouff P., 2002, Cours de physiologie digestive, in <http://pst.cher-alice.fr/svtiufm/mange.htm#cours>, ed.
- Suter G.W., 1993, Ecological risk assessment: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, 538 p.

- Swanson S.M., 1982, Levels and effects of radionuclides in aquatic fauna of the Beaverlodge Area (Saskatchewan), in S. Publication, ed., No. C-806-5-E-82, Saskatoon, Saskatchewan Research Council, p. 187.
- Swanson S.M., 1983, Levels of ^{226}Ra , ^{210}Pb and total U in fish near a Saskatchewan uranium mine and mill, Health Physics, 45 (1): 67-80.
- Swanson S.M., 1985, Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system, Health Physics, 49 (5): 747-770.
- Szabo A., Nemcsok J., Asztalos B. et al., 1992, The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization, Ecotoxicology and Environmental Safety, 23 (1): 39-45.
- Sztajnkrzyer M.D. et Otten E.J., 2004, Chemical and radiological toxicity of depleted uranium, Military Medicine, 169 (3): 212-216.

T

- Taqi Khan M.M. et Martell A.E., 1969, Kinetics of metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid. IV. Uranyl ion catalyzed oxidation, Journal of the American Chemical Society, 91 (17): 4668-4672.
- Tarzwell C.M. et Henderson C., 1960, Toxicity of less common metals to fish, Industrial Wastes, 5: 52-67.
- Tasat D.R. et de Rey B.M., 1987, Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages, Environmental Research, 44 (1): 71-81.
- Taulan M., 2004, Conséquences moléculaires des expositions aigüe et chronique à l'uranium sur le transcriptome murin: PhD thesis, Université de Montpellier I, Montpellier, 190 p.
- Teh S.J., Adams S.M. et Hinton D.E., 1997, Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress, Aquatic Toxicology, 37 (1): 51-70.

- Thomas J.A., 1999, Oxidative stress - Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress.
- Thomas P. et Juedes M.J., 1992, Influence of lead on the glutathione status of Atlantic croaker tissues, Aquatic Toxicology, 23 (1): 11-30.
- Thomas P. et Wofford H.W., 1984, Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.), Toxicology and Applied Pharmacology, 76 (1): 172-182.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upatham E.S. et al., 2003, Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure, Environmental Pollution, 121 (3): 307-320.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D. et al., 2000, Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, Environmental and Molecular Mutagenesis, 35 (3): 206-221.
- Tirmarche M., Baysson H. et Telle-Lamberton M., 2004, Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies, Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique, 52 (1): 81-90.
- Tokarskaya Z.B., Okladnikova N.D., Belyaeva Z.D. et al., 1997, Multifactorial analysis of lung cancer dose-response relationships for workers at the Mayak nuclear enterprise, Health Physics, 73 (6): 899-905.
- Touil N., Aka P.V., Buchet J.P. et al., 2002, Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair, Mutagenesis, 17 (3): 223-232.
- Tracy B.L., Quinn J.M., Lahey J. et al., 1992, Absorption and retention of uranium from drinking water by rats and rabbits, Health Physics, 62 (1): 65-73.
- Trapp K.E., 1986, Acute toxicity of uranium to waterfleas (*Daphnia pulex*) and bluegill (*Lepomis macrochirus*), Environmental & Chemical Sciences. Savannah River, Aiken, South Carolina. (Report ESC-SR-30), p. 57.

Tyrakowski T., 1979a, Disturbances in electrolyte transport in UO_2^{++} ion intoxication. Model studies on the preliminary stage of toxic acute renal failure. I. The effect of uranyl acetate on epithelial tissue *in vitro*, Acta Medica Polona, 20 (4): 297-306.

Tyrakowski T., 1979b, Disturbances in electrolyte transport in UO_2^{++} ion intoxication - model studies on the preliminary stage of toxic acute renal failure. II. The effect of uranyl acetate on the kidney *in vivo*, Acta Medica Polona, 20 (4): 307-316.

Tyrakowski T., 1979c, Disturbances in electrolyte transport in UO_2^{++} ion intoxication - model studies on the preliminary stage of toxic acute renal failure. III. Disturbances in Na^+ and K^+ ion excretion and decrease in glomerular filtration rate following uranyl acetate intoxication, Acta Medica Polona, 20 (4): 317-329.

U

Ubios A.M., Braun E.M. et Cabrini R.L., 1994, Lethality due to uranium poisoning is prevented by ethane-1-hydroxy-1,1- biphosphonate (EHBP), Health Physics, 66 (5): 540-544.

Ubios A.M., Guglielmotti M.B., Steimetz T. et al., 1991, Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling, Environmental Research, 54 (1): 17-23.

Ullrich R.L. et Ponnaiya B., 1998, Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis, International Journal of Radiation Biology, 74 (6): 747-754.

US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, Fish life-cycle test guideline - Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p. 133.

US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2003, Revised draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption, U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460, p. 142.

V

- Van der Lee J., 1998, Thermodynamic and mathematical concepts of CHES, Fontainebleau, Ecole des Mines de Paris, p. 103.
- van der Oost R., Beyer J. et Vermeulen N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, Environmental Toxicology and Pharmacology, 13 (2): 57-149.
- Van Gestel C.A.M. et Van Brummelen T.C., 1996, Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms, Ecotoxicology, 5 (4): 217-225.
- Viala M., 2001, Utilisation industrielle de l'uranium (Chapitre 3), in EDP Science, ed., L'uranium de l'environnement à l'Homme: Collection IPSN: Les Ulis, p. 83-114.
- Vidaud C., Dedieu A., Basset C. et al., 2005, Screening of human serum proteins for uranium binding, Chemical Research in Toxicology, 18 (6): 946-953.
- Vinot H. et Larpent J.P., 1984, Water pollution by uranium ore treatment works, Hydrobiologia, 112 (2): 125-129.
- Voegtlin C. et Hodge H.C., 1949, Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Parts I & II: New York, McGraw-Hill Book Company, , 1-1084 p.
- Voegtlin C. et Hodge H.C., 1953, Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Parts III & IV: New York, McGraw-Hill Book Company, , 1087-2466 p.

W

- Waite D.T., Joshi S.R. et Sommerstad H., 1988, The effect of uranium mine tailings on radionuclide concentrations in Langley Bay, Saskatchewan, Canada, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 17 (3): 373-380.
- Waite D.T., Joshi S.R., Sommerstad H. et al., 1990, A toxicological examination of whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and northern pike (*Esox lucius*) exposed to uranium mine tailings, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 19 (4): 578-582.
- Walinder G., 1989, Metabolism and sites of effects of uranium after Incorporation along different routes in mice, rabbits and piglets, Radiation Protection Dosimetry, 26 (1-4): 89-95.

- Wang D., Ueng J.P. et Huang B.Q., 2004, Structural changes in the muscular tissue of thornfish (*Terapon jarbua*, Forsskal) under TBT (tributyltin) exposure, 31 (3): 225-234.
- Ward W.S., 1993, Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa, Biology of Reproduction, 48 (6): 1193-1201.
- Weisbart M., 1973, The distribution and tissue retention of mercury-203 in the goldfish (*Carassius auratus*), Canadian Journal of Zoology, 51 (2): 143-150.
- Weiss C.M., 1958, The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of freshwater fish and its inactivation *in vivo*, Ecology, 39: 194-198.
- WHO (World Health Organization), 2001, Depleted uranium : Sources, exposure and health effects.
- WHO (World Health Organization), 2004, Radiological quality of drinking water (Chapter 9), Guidelines for drinking water quality, third edition.: Geneva, World Health Organization, p. 197-209.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993, Environmental Health Criteria 155 - Biomarkers and risk assessment : Concepts and principles, Geneva, World Health Organization.
- Wikipedia contributors, 2006, Uranium, Wikipedia, The Free Encyclopedia.
- Wilson A. et Salamatian L., 2003, Les radicaux libres : Une question d'équilibre, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, p. 37.
- Winslow J.T. et Camacho F., 1995, Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice, Psychopharmacology, 121 (2): 164-172.
- Winston G.W. et Di Giulio R.T., 1991, Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, Aquatic Toxicology, 19 (2): 137-161.
- Winzer K., Winston G.W., Becker W. et al., 2001, Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.), Aquatic Toxicology, 52 (2): 143-155.
- Wolff S., Afzal V., Wiencke J.K. et al., 1988, Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens

that induce double-strand breaks in DNA, International Journal of Radiation Biology, 53 (1): 39-47.

Wolff S.P. et Dean R.T., 1986, Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis, Biochemical Journal, 234 (2): 399-403.

Wrenn M.E., Durbin P.W. et Howard B., 1985, Metabolism of ingested U and Ra, Health Physics, 48 (5): 601-633.

Wrenn M.E., Durbin P.W., Willis D.L. et al., 1987, The potential toxicity of uranium in water, Journal of the American Water Works Association, 79 (4): 177.

X-Y

Yang Z.H., Fan B.X., Lu Y. et al., 2002, Malignant transformation of human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) induced by depleted uranium, Chinese Journal of Cancer (Ai zheng), 21 (9): 944-948.

Yazzie M., Gamble S.L., Civitello E.R. et al., 2003, Uranyl acetate causes DNA single strand breaks *in vitro* in the presence of ascorbate (vitamin C), Chemical Research in Toxicology, 16 (4): 524-530.

Z

Zaire R., Notter M., Riedel W. et al., 1997, Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners, Radiation Research, 147 (5): 579-584.

Zamora L.M., Tracy B.L., Zielinski J.M. et al., 1998, Chronic ingestion of uranium in drinking water: A study of kidney bioeffects in humans, Toxicological Sciences, 43 (1): 68-77.

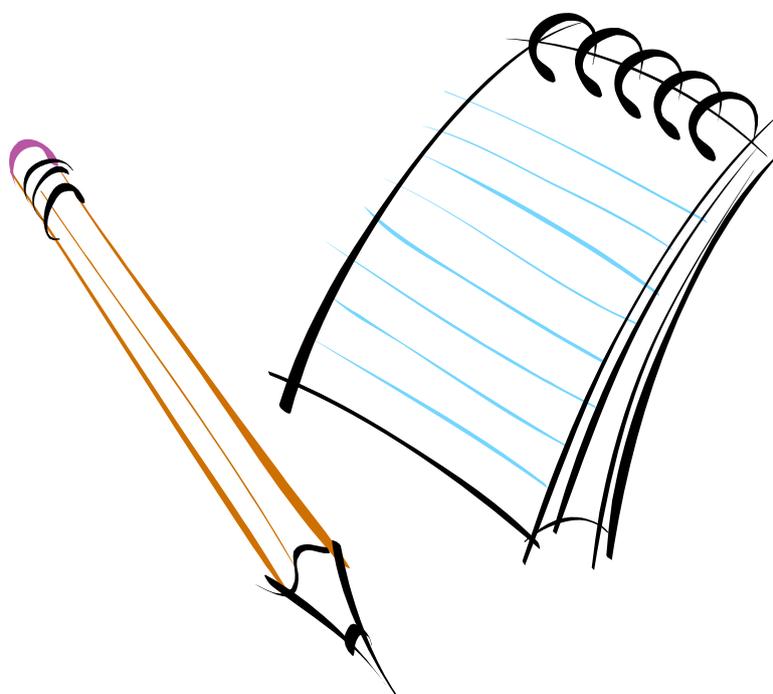
Zamora M.L., Zielinski J.M., Meyerhof D.P. et al., 2002, Gastrointestinal absorption of uranium in humans, Health Physics, 83 (1): 35-45.

Zhou B., Liu W., Siu W.H.L. et al., 2006, Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress, Aquatic Toxicology, 77 (2): 136-142.

Zhou H., Randers-Pehrson G., Waldren C.A. et al., 2000, Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (5): 2099-2104.

Zimmerman G. et Soreq H., 2006, Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission, Cell and Tissue Research, 326 (2): 655-669.

ANNEXES



Préparation de l'eau synthétique à partir des différents sels

CaCl ₂ .2H ₂ O	(MM = 147,0148)	0,04263 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	(MM= 203,3034)	0,01931 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	(MM= 246,4754)	0,02465 g/L
NaCl	(MM= 58,4428)	0,00847 g/L
NaNO ₃	(MM= 84,9947)	0,02890 g/L
Na ₂ CO ₃	(MM= 105,9885)	0,00079 g/L
KNO ₃	(MM= 101,1029)	0,01618 g/L

Rapport d'analyse des espèces en solution par le modèle CHESS

CHESS General Report

Current version : 3.0, release 4, patchlevel 2

81 species were considered for the equilibrium calculations

38 solids were considered for the equilibrium calculations

Final equilibrium of the main solution		Fugacity of relevant gases	
pH	6,5	H ₂ O(g)	0,033572
ionic strength	0,00223835	CO ₂ (g)	0,000316
temperature	26 °C	HCl(g)	1,5921.10 ⁻¹⁶
electrical imbalance	1,87.10 ⁻⁷ eq/L		
carbonate alkalinity	1,5.10 ⁻⁵ eq/L		
solvent activity	1		
solvent mass	1000 g		
total dissolved solids	1,11.10 ⁻⁴ kg/kg		
solution mass	1000,1 g		
solution density	977,61 g/L		
Cumulative aqueous conc. (g/L)		Saturation indices (down to -3) of solids	
H ⁺	0,00001038	mineral UO ₃ .2H ₂ O(c)	-0,741
Ca ²⁺	0,01162	mineral UO ₂ (OH) ₂ (B)	-0,857
Mg ²⁺	0,004739	mineral UO ₃ .0.9H ₂ O(α)	-0,9274
Na ⁺	0,01149	mineral CaUO ₄ (c)	-2,438
K ⁺	0,006256		
Cl ⁻	0,03244		
SO ₄ ²⁻	0,009606		
NO ₃ ⁻	0,03103		
UO ₂ ²⁺	0,00002		
HCO ₃ ⁻	0,001532		

Rapport d'analyse des espèces en solution par le modèle CHESS (suite et fin)

Aqueous sp.	mol/L	g/L	Aqueous sp. (suite)	mol/L	g/L
Cl ⁻	9,14.10 ⁻⁴	3,24.10 ⁻²	UO ₂ SO ₄ (aq)	1,21.10 ⁻¹⁰	4,42.10 ⁻⁸
Na ⁺	5,00.10 ⁻⁴	1,15.10 ⁻²	Na ₂ SO ₄ (aq)	1,16.10 ⁻¹⁰	1,64.10 ⁻⁸
NO ₃ ⁻	4,99.10 ⁻⁴	3,10.10 ⁻²	(UO ₂) ₃ (OH) ₅ ⁺	1,10.10 ⁻¹⁰	9,86.10 ⁻⁸
Ca ²⁺	2,85.10 ⁻⁴	1,14.10 ⁻²	Ca(NO ₃) ₂ (aq)	9,05.10 ⁻¹¹	1,49.10 ⁻⁸
Mg ²⁺	1,92.10 ⁻⁴	4,68.10 ⁻³	CaCl ₂ (aq)	5,34.10 ⁻¹¹	5,93.10 ⁻⁹
K ⁺	1,60.10 ⁻⁴	6,25.10 ⁻³	(UO ₂) ₂ (OH) ₂ ²⁺	2,88.10 ⁻¹¹	1,66.10 ⁻⁸
SO ₄ ²⁻	9,36.10 ⁻⁵	8,99.10 ⁻³	K ₂ SO ₄ (aq)	1,67.10 ⁻¹¹	2,91.10 ⁻⁹
HCO ₃ ⁻	1,50.10 ⁻⁵	9,16.10 ⁻⁴	NaCO ₃ ⁻	1,02.10 ⁻¹¹	8,50.10 ⁻¹⁰
CO ₂ (aq)	9,97.10 ⁻⁶	4,39.10 ⁻⁴	NaOH(aq)	6,15.10 ⁻¹²	2,46.10 ⁻¹⁰
CaSO ₄ (aq)	3,80.10 ⁻⁶	5,17.10 ⁻⁴	HNO ₃ (aq)	3,36.10 ⁻¹²	2,12.10 ⁻¹⁰
MgSO ₄ (aq)	2,26.10 ⁻⁶	2,72.10 ⁻⁴	(UO ₂) ₃ (OH) ₇ ⁻	2,83.10 ⁻¹²	2,63.10 ⁻¹⁰
CaNO ₃ ⁺	4,08.10 ⁻⁷	4,17.10 ⁻⁵	KOH(aq)	1,95.10 ⁻¹²	1,10.10 ⁻¹⁰
H ⁺	3,26.10 ⁻⁷	3,28.10 ⁻⁷	UO ₂ Cl ⁺	1,50.10 ⁻¹²	4,58.10 ⁻¹⁰
MgCl ⁺	2,99.10 ⁻⁷	1,79.10 ⁻⁵	UO ₂ NO ₃ ⁺	1,09.10 ⁻¹²	3,63.10 ⁻¹⁰
CaCl ⁺	2,88.10 ⁻⁷	2,18.10 ⁻⁵	(UO ₂) ₄ (OH) ₇ ⁺	5,91.10 ⁻¹³	7,09.10 ⁻¹⁰
NaSO ₄ ⁻	2,51.10 ⁻⁷	2,99.10 ⁻⁵	Ca ₂ UO ₂ (CO ₃) ₃ (aq)	4,18.10 ⁻¹³	2,22.10 ⁻¹⁰
KSO ₄ ⁻	9,66.10 ⁻⁸	1,31.10 ⁻⁵	(UO ₂) ₃ (OH) ₈ ²⁻	3,55.10 ⁻¹³	3,35.10 ⁻¹⁰
NaCl(aq)	8,46.10 ⁻⁸	4,95.10 ⁻⁶	NaHSO ₄ (aq)	2,27.10 ⁻¹³	2,73.10 ⁻¹¹
CaHCO ₃ ⁺	5,14.10 ⁻⁸	5,20.10 ⁻⁶	(UO ₂) ₃ (OH) ₄ ²⁺	1,99.10 ⁻¹³	1,75.10 ⁻¹⁰
KCl(aq)	4,67.10 ⁻⁸	3,48.10 ⁻⁶	UO ₂ (SO ₄) ₂ ²⁻	1,15.10 ⁻¹³	5,34.10 ⁻¹¹
NaNO ₃ (aq)	4,09.10 ⁻⁸	3,48.10 ⁻⁶	UO ₂ (CO ₃) ₃ ⁴⁻	1,01.10 ⁻¹³	4,56.10 ⁻¹¹
OH ⁻	3,51.10 ⁻⁸	5,97.10 ⁻⁷	CaUO ₂ (CO ₃) ₃ ²⁻	8,06.10 ⁻¹⁴	3,95.10 ⁻¹¹
MgHCO ₃ ⁺	2,89.10 ⁻⁸	2,46.10 ⁻⁶	(UO ₂) ₂ (OH) ₂ (SO ₄) ₂ ²⁻	1,78.10 ⁻¹⁴	1,37.10 ⁻¹¹
UO ₂ (OH) ₂ (aq)	1,90.10 ⁻⁸	5,79.10 ⁻⁶	(UO ₂) ₂ OH ³⁺	1,18.10 ⁻¹⁴	6,59.10 ⁻¹²
UO ₂ OH ⁺	1,65.10 ⁻⁸	4,74.10 ⁻⁶	(UO ₂) ₃ O(OH) ₂ (HCO ₃) ⁺	4,22.10 ⁻¹⁶	3,98.10 ⁻¹³
(UO ₂) ₂ CO ₃ (OH) ₃ ⁻	1,19.10 ⁻⁸	7,75.10 ⁻⁶	KHSO ₄ (aq)	1,87.10 ⁻¹⁶	2,55.10 ⁻¹⁴
UO ₂ CO ₃ (aq)	1,14.10 ⁻⁸	3,75.10 ⁻⁶	HCl(aq)	1,81.10 ⁻¹⁶	6,61.10 ⁻¹⁵
NaHCO ₃ (aq)	6,65.10 ⁻⁹	5,59.10 ⁻⁷	UO ₂ Cl ₂ (aq)	6,84.10 ⁻¹⁷	2,33.10 ⁻¹⁴
CO ₃ ²⁻	2,65.10 ⁻⁹	1,59.10 ⁻⁷	Ca(OH) ₂ (aq)	2,27.10 ⁻¹⁷	1,68.10 ⁻¹⁵
HSO ₄ ⁻	2,49.10 ⁻⁹	2,42.10 ⁻⁷	UO ₂ (OH) ₄ ²⁻	7,77.10 ⁻¹⁸	2,63.10 ⁻¹⁵
CaCO ₃ (aq)	1,69.10 ⁻⁹	1,69.10 ⁻⁷	UO ₂ (SO ₄) ₃ ⁴⁻	4,83.10 ⁻¹⁹	2,69.10 ⁻¹⁶
UO ₂ ²⁺	1,32.10 ⁻⁹	3,56.10 ⁻⁷	H ₂ SO ₄ (aq)	5,26.10 ⁻²⁰	5,16.10 ⁻¹⁸
MgOH ⁺	1,00.10 ⁻⁹	4,15.10 ⁻⁸	(UO ₂) ₃ (OH) ₄ (SO ₄) ₄ ⁶⁻	3,06.10 ⁻²³	3,87.10 ⁻²⁰
UO ₂ (OH) ₃ ⁻	8,96.10 ⁻¹⁰	2,88.10 ⁻⁷	(UO ₂) ₃ (OH) ₁₀ ⁴⁻	1,18.10 ⁻²⁴	1,15.10 ⁻²¹
UO ₂ (CO ₃) ₂ ²⁻	5,83.10 ⁻¹⁰	2,27.10 ⁻⁷	(UO ₂) ₃ (CO ₃) ₆ ⁶⁻	9,15.10 ⁻²⁵	1,07.10 ⁻²¹
MgCO ₃ (aq)	4,09.10 ⁻¹⁰	3,45.10 ⁻⁸	(UO ₂) ₄ (OH) ₇ (SO ₄) ₄ ⁷⁻	2,04.10 ⁻²⁵	3,23.10 ⁻²²
CaOH ⁺	1,58.10 ⁻¹⁰	9,02.10 ⁻⁹			

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant chez les organismes mâles

Sexe	Acclimatation (semaines)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
♂	2	2,0	1 565,6	2 111 300	2 280,1	49,0
♂	2	3,7	1 968,3	1 067 100	2 620,0	51,4
♂	2	2,7	9 771,6	1 473 800	3 129,8	60,6
♂	2	3,4	11 524,2	1 588 700	2 823,9	52,2
♂	2	4,8	8 705,7	1 740 100	2 484,0	43,4
♂	2	5,1	10 832,9	1 496 800	1 974,3	42,2
♂	2	5,5	7 551,0	1 967 800	2 620,0	30,7
♂	2	5,1	4 075,8	1 829 500	2 823,9	35,7
♂	2	5,3	7 885,3	1 881 000	2 382,0	49,5
♂	2	4,2	3 110,8	2 037 700	2 755,9	49,4
♂	3	3,9	11 406,0	1 861 600	3 197,8	40,4
♂	3	3,1	12 209,5	1 497 300	3 902,5	50,5
♂	3	4,1	11 359,1	1 340 400	2 925,9	40,6
♂	3	3,1	11 429,6	1 523 200	2 620,0	37,0
♂	3	4,5	7 535,5	1 803 300	2 484,0	35,4
♂	3	6,0	7 442,8	1 407 700	3 197,8	38,4
♂	3	6,4	9 691,4	1 737 100	2 789,9	40,5
♂	3	5,0	5 519,1	1 716 700	2 552,0	43,1
♂	3	5,1	9 811,9	2 029 400	3 669,0	41,8
♂	3	4,5	9 532,7	1 970 600	3 027,9	63,8
♂	4	3,0	7 852,7	1 645 200	2 688,0	49,4
♂	4	4,2	5 727,9	2 071 800	2 925,9	36,9
♂	4	3,4	4 371,8	2 048 400	2 620,0	33,9
♂	4	2,9	5 496,4	1 797 300	4 229,5	52,8
♂	4	4,2	3 169,1	1 251 600	3 715,7	53,0
♂	4	3,8	4 229,9	2 074 100	2 450,0	47,4
♂	4	3,4	8 669,9	1 829 100	2 575,8	59,5
♂	4	3,2	5 541,9	1 953 600	2 855,5	48,4
♂	4	4,2	6 769,3	1 888 200	3 415,0	33,9
♂	4	4,2	8 687,9	2 066 900	2 482,7	22,6

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant chez les organismes femelles

Sexe	Acclimatation (semaines)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
♀	2	2,6	4 092,6	1 446 800	2 575,8	43,6
♀	2	3,2	4 718,4	1 171 600	3 275,2	51,0
♀	2	4,2	3 535,2	1 338 400	2 482,7	37,6
♀	2	5,0	3 289,0	2 278 700	3 135,3	41,8
♀	2	6,7	8 634,2	2 000 100	2 063,2	34,6
♀	2	8,4	7 836,6	1 600 500	2 622,5	39,7
♀	2	8,7	4 273,7	1 793 700	2 063,2	45,0
♀	2	2,7	4 101,1	1 312 200	1 783,3	43,8
♀	2	3,6	4 380,8	1 805 500	3 275,2	44,3
♀	3	2,9	4 318,0	1 235 200	2 948,8	40,8
♀	3	3,5	6 194,8	2 415 800	3 181,8	41,4
♀	3	4,6	4 797,0	2 409 100	3 275,2	37,3
♀	3	5,5	4 997,6	1 599 100	2 995,5	35,4
♀	3	7,2	4 174,9	1 410 100	3 088,7	49,1
♀	3	4,6	10 235,2	1 087 800	2 902,2	42,6
♀	3	6,2	11 212,8	1 868 600	3 834,5	54,8
♀	3	4,5	13 248,6	1 623 900	2 855,5	56,4
♀	3	3,6	10 839,4	1 498 200	3 741,3	61,9
♀	3	6,3	8 594,9	1 191 500	3 694,7	55,5
♀	4	4,2	6 237,2	1 152 800	1 876,7	59,3
♀	4	5,9	5 089,7	1 038 500	3 368,3	46,9
♀	4	3,2	5 169,8	1 909 900	3 881,2	54,2
♀	4	4,7	13 179,8	1 404 600	3 342,0	54,2
♀	4	6,4	10 208,4	1 824 100	3 342,0	44,2
♀	4	6,0	11 212,8	1 737 200	4 182,8	42,7
♀	4	4,4	8 845,1	1 512 200	3 295,2	56,5
♀	4	7,5	9 221,7	1 191 700	3 108,3	44,9
♀	4	5,6	7 350,4	1 309 400	3 762,3	49,8
♀	4	6,8	4 099,3	963 680	3 388,7	51,9

Activité de la superoxyde dismutase

Paramètre	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
Acclimatation	non	acceptées	ANOVA	$p = 9,0 \cdot 10^{-3}$	Tukey HSD	3 ≠ 2 ($p = 6,6 \cdot 10^{-3}$)
Sexe				$p = 0,531$		
Interaction				$p = 5,9 \cdot 10^{-2}$		

Activité de la catalase

Paramètre	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
Acclimatation	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,907$		
Sexe				$p = 2,7 \cdot 10^{-2}$		
Interaction				$p = 0,119$		

Activité de la glutathion peroxydase

Paramètre	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
Acclimatation	non	acceptées	ANOVA	$p = 6,5 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	3 ≠ 2 ($p = 2,9 \cdot 10^{-3}$) 4 ≠ 2 ($p = 1,6 \cdot 10^{-3}$)
Sexe				$p = 0,143$		
Interaction				$p = 0,529$		

Quantité de glutathion total

Paramètre	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédastcité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
Acclimatation	non	acceptées	ANOVA	p = 0,607		
Sexe				p = 0,265		
Interaction				p = 0,121		

Valeurs nominales et mesurées de la concentration en uranium appauvri

dans l'eau d'exposition au cours de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart type (n = 3, 5, 8, 14, 26 et 44 pour 0,5 - 1,5 - 3 - 5 - 10 et 20 jours d'exposition respectivement).

Conditions expérimentales		Valeurs mesurées					
		0,5 j	1,5 j	3 j	5 j	10 j	20 j
Témoins	$\mu\text{g/L}$	0	0	0	0	0	0
20	$\mu\text{g/L}$	25,8 \pm 11,8	25,0 \pm 8,5	22,8 \pm 7,7	24,5 \pm 10,2	27,8 \pm 9,4	27,7 \pm 8,6
100	$\mu\text{g/L}$	151,8 \pm 37,0	131,5 \pm 38,5	116,0 \pm 38,8	111,0 \pm 38,6	110,4 \pm 32,9	119,8 \pm 35,8
500	$\mu\text{g/L}$	494,2 \pm 112,7	466,8 \pm 109,9	463,0 \pm 164,6	467,4 \pm 178,6	499,2 \pm 152,4	536,4 \pm 153,7

Suivi de la bioaccumulation ($\mu\text{g/g}$ poids frais)

	[U _{appauvri}] ($\mu\text{g/L}$)	0,5 j	1,5 j	3 j	5 j	10 j	20 j
T	0	< limite de détection					
A	20	-	0,48	2,05	1,38	5,32	27,99
		n.d.	n.d.	0,68	0,51	0,63	41,09
		0,19	n.d.	0,96	1,44	2,32	79,28
		n.d.	0,30	0,92	0,48	0,71	13,17
		n.d.	1,22	0,90	1,59	n.d.	11,51
		n.d.	4,96	1,43	0,11	0,96	28,35
		n.d.	n.d.	0,94	1,77	1,07	35,20
		n.d.	2,22	1,24	1,12	0,89	1,35
		n.d.	0,38	1,90	0,94	4,04	23,60
		n.d.	0,25	4,04	0,94	1,04	24,69
B	100	2,12	0,15	11,02	0,74	15,69	84,05
		0,28	5,29	2,59	2,29	47,08	22,90
		3,98	1,74	13,90	2,34	11,55	6,76
		0,98	1,02	4,74	6,93	23,75	65,83
		2,66	9,60	1,44	7,59	21,94	29,55
		3,54	0,42	8,41	1,34	11,51	69,90
		4,32	0,55	1,30	5,73	-	15,01
		1,12	0,40	1,88	1,07	0,84	16,57
		2,80	1,32	10,87	10,96	17,73	84,97
		0,74	6,23	55,47	18,81	26,57	35,16
C	500	15,01	15,77	11,83	14,25	39,55	32,73
		6,88	17,15	20,28	8,71	24,61	92,23
		33,73	7,35	9,28	31,36	22,27	44,93
		1,27	2,41	24,27	9,75	21,18	45,76
		3,43	13,65	17,66	19,43	27,42	19,86
		3,19	24,06	7,11	20,16	42,48	16,89
		8,60	28,80	24,94	26,68	29,18	9,20
		22,98	23,66	28,29	25,49	9,29	19,06
		4,81	45,62	31,43	92,20	45,96	45,46
		17,84	10,31	19,58	39,61	56,21	171,48

Bioaccumulation

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 1,1 \cdot 10^{-7}$	Wilcoxon	B ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) B ≠ A ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) C ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) C ≠ A ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) C ≠ B ($p = 5,8 \cdot 10^{-3}$)
1,5	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 6,6 \cdot 10^{-7}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 4,4 \cdot 10^{-3}$) B ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) B ≠ A ($p = 6,4 \cdot 10^{-2}$) C ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$) C ≠ A ($p = 7,2 \cdot 10^{-4}$) C ≠ B ($p = 5,2 \cdot 10^{-4}$)
3	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 2,9 \cdot 10^{-7}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) B ≠ A ($p = 4,2 \cdot 10^{-3}$) C ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) C ≠ A ($p = 6,5 \cdot 10^{-5}$) C ≠ B ($p = 1,5 \cdot 10^{-2}$)
5	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 1,7 \cdot 10^{-7}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) B ≠ A ($p = 8,9 \cdot 10^{-3}$) C ≠ T ($p = 3,2 \cdot 10^{-4}$) C ≠ A ($p = 6,5 \cdot 10^{-5}$) C ≠ B ($p = 4,1 \cdot 10^{-4}$)

Bioaccumulation (*suite et fin*)

10	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 1,1 \cdot 10^{-6}$	Wilcoxon	<p>A ≠ T ($p = 4,3 \cdot 10^{-3}$)</p> <p>B ≠ T ($p = 6,9 \cdot 10^{-4}$)</p> <p>B ≠ A ($p = 2,9 \cdot 10^{-3}$)</p> <p>C ≠ T ($p = 4,4 \cdot 10^{-4}$)</p> <p>C ≠ A ($p = 6,5 \cdot 10^{-5}$)</p> <p>C ≠ B ($p = 6,5 \cdot 10^{-2}$)</p>
20	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 3,9 \cdot 10^{-5}$	Wilcoxon	<p>A ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$)</p> <p>B ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$)</p> <p>C ≠ T ($p = 3,8 \cdot 10^{-4}$)</p>

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à t_0

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	2,7	4 238,5	758 020	735,2	46,8
		10,6	3 893,2	1 086 600	192,0	25,2
		9,9	3 921,7	1 317 600	190,7	15,0
		6,9	3 213,6	1 646 200	303,2	32,5
		14,5	2 853,0	1 364 800	137,7	31,9

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 0,5 jour

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	9,2	3 883,7	899 330	224,8	32,5
		10,6	4 280,0	1 007 900	198,4	6,8
		9,5	4 077,0	1 143 000	213,3	32,7
		7,9	3 637,3	1 257 400	273,8	40,5
		10,6	3 550,1	1 208 900	192,0	30,1
A	20	4,7	4 939,2	1 576 000	337,9	12,7
		9,3	4 449,5	928 550	228,8	33,4
		14,0	4 671,0	522 340	139,9	33,3
		14,3	3 763,1	712 960	135,1	22,0
		7,6	4 856,0	1 169 500	221,5	31,1
B	100	4,3	4 963,2	730 480	452,1	18,7
		10,4	4 671,0	551 470	200,9	27,6
		10,8	4 363,8	840 810	169,0	21,8
		6,7	4 762,5	773 200	335,1	29,3
		6,1	3 959,9	1 194 900	361,0	32,0
C	500	11,9	3 818,3	262 400	156,4	7,4
		8,4	4 438,6	515 840	261,7	15,8
		11,4	4 067,2	422 350	183,8	17,8
		8,7	3 541,4	710 130	253,1	17,2
		8,8	3 098,7	457 330	251,0	10,7

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 1,5 jour

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	9,0	2 902,2	711 290	230,9	34,7
		2,7	5 713,9	797 410		60,1
		6,4	4 797,3	570 470	262,3	48,1
		12,3	3 174,8	815 080	148,6	35,2
		11,4	2 490,2	672 330	96,7	27,1
A	20	6,0	4 207,8	757 380		33,4
		13,2	2 332,6	1 029 600	128,7	29,8
		7,1	3 002,4	632 580		46,5
		12,2	3 308,6	421 960	157,3	28,3
		6,7	4 581,0	734 190	267,4	36,5
B	100	16,9	3 129,0	603 420	93,9	17,5
		12,9	2 894,9	693 490	45,4	30,3
		9,3	2 698,1	664 420	84,2	30,6
		8,6	2 484,6	693 490	172,0	32,8
		7,7	3 009,7	713 830	225,0	34,9
C	500	10,7	2 980,6	602 920	172,9	36,5
		5,7	2 478,3	603 420	68,2	31,2
		8,8	9 200,2	560 240	206,5	28,3
		13,4	7 016,4	464 000	138,5	28,6
		7,6	7 081,6	408 010	50,9	30,6

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 3 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	9,1	10 502,7	829 930	192,1	47,4
		7,4	10 931,8	986 830	159,9	53,7
		8,9	11 554,7	915 420	187,3	41,0
		14,5	7 578,0	1 377 400	127,8	43,5
		7,5	11 554,7	1 125 000	0,0	61,9
A	20	7,2	7 839,0	551 200	105,8	42,3
		4,9	7 325,4	732 230	185,3	40,7
		5,9	10 374,2	778 290	321,2	38,6
		14,1	11 204,2	896 210	133,4	34,0
		8,7	10 931,8	638 510	239,5	40,1
B	100	8,3	11 308,3	565 400	240,4	42,2
		11,7	11 806,4	778 290	158,1	37,5
		12,4	9 004,0	579 830	156,3	40,2
		14,2	8 034,6	683 780	142,0	33,3
		8,7	7 485,0	762 860	231,3	37,3
C	500	6,8	9 228,7	389 750	283,0	50,0
		9,7	9 143,7	455 580	186,2	38,3
		9,2	9 115,8	629 360	225,5	36,9
		10,0	9 004,0	629 070	179,7	32,5
		10,3	8 866,4	856 570	193,2	40,2

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 5 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	11,7	9 031,9	1 016 900	148,6	38,3
		13,2	6 699,8	1 045 500	160,4	33,6
		13,4	5 978,3	897 410	151,1	34,9
		12,6	8 948,8	1 526 500	168,1	46,5
		7,6	9 665,0	1 007 800	280,2	58,7
A	20	7,2	9 031,9	799 640	284,2	38,3
		15,7	7 416,4	723 000	126,7	33,6
		14,2	6 260,9	856 960	143,7	48,3
		15,6	7 213,5	758 930	118,1	33,2
		17,8	6 108,5	631 640	114,0	28,6
B	100	10,3	5 204,7	792 440	213,3	31,5
		2,7	9 429,7	1 509 900	660,4	54,5
		12,8	8 134,0	651 960	164,5	39,1
		14,9	7 601,2	634 670	123,0	
		10,8	7 147,3	696 790	180,9	42,4
C	500	9,1	6 597,5	549 430		44,9
		6,6	6 617,7	730 320	246,5	58,0
		7,4	5 996,8	849 760	280,8	46,8
		14,2	5 796,9	490 970	147,0	30,2
		12,6	2 909,3	599 880	162,1	40,2

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 10 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	17,7	1 863,0	491 190	111,0	31,2
		9,7	8 510,5	912 600	208,8	42,7
		15,1	10 161,9	819 810	125,2	40,8
		11,5	8 706,3	780 900	186,1	49,3
		12,0	9 194,7	728 790	172,2	46,3
A	20	5,6	8 510,5	849 760	368,1	48,1
		8,2	4 148,2	1 067 300	259,1	43,9
		10,7	2 856,8	634 300	197,3	50,0
		7,5	2 125,7	890 750	276,1	41,6
		10,0	9 754,5	710 210	216,2	46,3
B	100	10,9	9 236,3	744 260	194,9	47,7
		7,1	9 888,6	436 390	306,6	55,1
		11,6	8 058,4	591 100	188,7	39,8
		9,6	6 023,4	780 900	201,0	38,6
		11,5	5 474,4	483 270	190,1	40,0
C	500	14,6	3 652,2	411 900	150,7	39,4
		13,6	2 077,9	466 930	159,3	37,0
		9,9	8 666,6	805 450	219,6	32,0
		16,0	9 405,7	790 620	131,3	32,0
		16,6	9 152,8	515 370	131,9	25,1

Activité de la superoxyde dismutase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	non	acceptées	ANOVA	p = 1,7.10 ⁻²	Tukey HSD	C ≠ A (p = 6,1.10 ⁻²) C ≠ B (p = 5,7.10 ⁻²)
1,5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,388		
3	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,593		
5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,123		
10	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,741		

Activité de la catalase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	non	acceptées	ANOVA	p = 8,7.10 ⁻³	Tukey HSD	C ≠ T (p = 7,5.10 ⁻³) C ≠ A (p = 3,3.10 ⁻²)
1,5	non	acceptées	ANOVA	p = 0,115		
3	non	acceptées	ANOVA	p = 2,3.10 ⁻³	Tukey HSD	A ≠ T (p = 2,7.10 ⁻²) B ≠ T (p = 1,1.10 ⁻²) C ≠ T (p = 2,2.10 ⁻³)
5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 1,8.10 ⁻²	Wilcoxon	A ≠ T (p = 4,8.10 ⁻²) C ≠ T (p = 4,8.10 ⁻²)
10	non	acceptées	ANOVA	p = 0.118		

Activité de la glutathion peroxydase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,574		
1,5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,425		
3	non	acceptées	ANOVA	p = 0,291		
5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,285		
10	non	acceptées	ANOVA	p = 1,2.10 ⁻²	Tukey HSD	A ≠ T (p = 2,4.10 ⁻²) C ≠ A (p = 2,1.10 ⁻²)

Quantité de glutathion total

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 6,9.10 ⁻²	Wilcoxon	C ≠ B (p = 4,8.10 ⁻²)
1,5	non	-	Kruskal-Wallis	p = 0,415		
3	oui	acceptées	ANOVA	p = 3,4.10 ⁻²	Tukey HSD	A ≠ T (p = 9,0.10 ⁻²) B ≠ T (p = 4,3.10 ⁻²) C ≠ T (p = 7,8.10 ⁻²)
5	oui	acceptées	ANOVA	p = 0,617		
10	non	acceptées	ANOVA	p = 1,5.10 ⁻²	Tukey HSD	C ≠ A (p = 1,5.10 ⁻²) C ≠ B (p = 3,9.10 ⁻²)

Suivi de l'activité de l'acétylcholinestérase

		0,5 j						1,5 j			
Conditions		T	A	B	C	Conditions		T	A	B	C
[U _{total}] (µg/L)		0	20	100	500	[U _{total}] (µg/L)		0	20	100	500
Charge protéique (g/L)		1,7	1,7	1,9	2,4	Charge protéique (g/L)		1,8	1,3	1,9	2,2
		1,6	1,4	2,2	1,9			1,8	1,9	1,8	2,0
		1,9	1,6	2,0	2,0			2,4	2,3	2,1	2,3
		2,1	2,4	2,7	2,4			2,0	2,0	1,9	2,2
		1,7	1,8	2,2	2,6			1,5	2,1	1,9	1,8
AChE (U/g de protéines totales)		2 742,8	1 926,1	2 053,1	1 782,3	AChE (U/g de protéines totales)		3 819,4	2 848,3	2 454,1	2 389,0
		1 857,7	1 980,2	1 895,6	1 922,7			3 849,1	2 526,2	1 991,8	2 444,9
		1 773,9	1 685,8	1 849,1	2 517,0			2 949,4	2 670,5	2 635,3	2 509,0
		2 259,4	2 429,5	2 208,1	1 842,0			3 766,7	2 130,9	2 408,6	2 187,6
		2 275,5	2 167,1	2 238,0	2 223,0			4 518,4	2 395,7	2 235,4	2 400,1

		3 j						5 j			
Conditions		T	A	B	C	Conditions		T	A	B	C
[U _{total}] (µg/L)		0	20	100	500	[U _{total}] (µg/L)		0	20	100	500
Charge protéique (g/L)		2,2	2,1	2,1	2,1	Charge protéique (g/L)		1,9	2,4	1,5	1,4
		1,9	2,3	2,1	1,8			1,9	2,4	2,2	2,0
		2,0	2,4	1,7	1,7			1,9	2,0	2,1	1,7
		2,1	2,4	1,8	2,2			2,1	2,3	2,4	1,6
		2,4	2,3	2,0	2,3			2,1	2,0	2,2	2,2
AChE (U/g de protéines totales)		3 614,3	2 750,0	2 100,6	2 691,4	AChE (U/g de protéines totales)		1 192,0	1 444,5	2 772,0	3 289,1
		2 783,3	1 855,2	2 408,4	2 756,9			1 082,9	1 241,8	2 135,7	2 803,3
		3 489,1	2 295,4	2 473,2	2 814,4			1 294,8	1 709,5	2 772,2	3 289,3
		3 122,7	2 618,2	1 797,4	2 462,5			1 072,4	1 589,1	2 186,8	3 811,8
		2 981,2	1 989,6	2 095,9	3 121,5			1 199,4	1 489,4	2 047,2	3 406,5

Suivi de l'activité de l'acétylcholinestérase (*suite et fin*)

Conditions	10 j			
	T	A	B	C
[U _{total}] (µg/L)	0	20	100	500
Charge protéique (g/L)	2,0	2,0	1,9	2,1
	2,0	2,0	1,8	1,8
	2,2	2,0	2,0	2,2
	2,7	2,0	2,0	2,0
	2,2	2,4	2,0	2,6
AChE (U/g de protéines totales)	2 081,5	2 628,2	3 304,5	2 455,5
	1 967,4	2 472,5	2 701,3	2 000,5
	2 304,3	2 515,7	3 397,1	2 205,1
	2 001,5	2 461,7	2 911,6	2 188,0
	2 256,9	2 371,7	3 111,2	2 051,7

Activité de l'acétylcholinestérase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
			ANOVA	p		
0,5	non	acceptées	ANOVA	p = 0,855		
1,5	non	acceptées	ANOVA	p = 9,8.10 ⁻⁶	Tukey HSD	A ≠ T (p = 1,2.10 ⁻⁴) B ≠ T (p = 2,7.10 ⁻⁵) C ≠ T (p = 3,9.10 ⁻⁵)
3	non	acceptées	ANOVA	p = 3,8.10 ⁻⁴	Tukey HSD	A ≠ T (p = 1,9.10 ⁻³) B ≠ T (p = 5,5.10 ⁻⁴) C ≠ B (p = 4,1.10 ⁻²)
5	oui	acceptées	ANOVA	p = 6,8.10 ⁻¹⁰	Tukey HSD	A ≠ T (p = 1,0.10 ⁻²) B ≠ T (p = 1,0.10 ⁻⁷) B ≠ A (p = 4,9.10 ⁻⁵) C ≠ T (p < 1,0.10 ⁻⁸) C ≠ A (p = 1,0.10 ⁻⁷) C ≠ B (p = 3,4.10 ⁻³)
10	oui	acceptées	ANOVA	p = 2,2.10 ⁻⁶	Tukey HSD	A ≠ T (p = 9,9.10 ⁻³) B ≠ T (p = 3,7.10 ⁻⁶) B ≠ A (p = 3,4.10 ⁻³) C ≠ A (p = 3,4.10 ⁻²) C ≠ B (p = 1,0.10 ⁻⁵)

Suivi de la génotoxicité par l'essai des comètes (paramètre d'analyse : longueur de la queue des comètes) et par la cytométrie de flux (paramètre d'analyse : diamètre des nucléoïdes)

		0,5 j						1,5 j			
Conditions	T	A	B	C	Conditions	T	A	B	C		
[U _{total}] (µg/L)	0	20	100	500	[U _{total}] (µg/L)	0	20	100	500		
Longueur de la queue (µm)	-	-	-	-	Longueur de la queue (µm)	-	-	-	-		
Diamètre du nucléoïde (u.a.)	197,8	218,0	200,7	366,9	Diamètre du nucléoïde (u.a.)	239,5	169,4	237,7	217,3		
	261,8	303,4	279,8	296,6		220,0	186,6	271,2	223,6		
		255,3	270,8	380,4		220,3	284,1	225,3	177,9		
			251,3	360,5		179,6	282,8	252,4			
			271,2	387,2		218,4	189,1	230,1			
			223,9	277,1		223,4	203,6	244,7			
			300,8	360,8		267,0					
				337,8							
		3 j						5 j			
Conditions	T	A	B	C	Conditions	T	A	B	C		
[U _{total}] (µg/L)	0	20	100	500	[U _{total}] (µg/L)	0	20	100	500		
Longueur de la queue (µm)	25,32			37,91	Longueur de la queue (µm)	55,14	46,81	24,35	26,57		
	58,97			42,85		46,28	55,44	40,91	28,96		
	45,59			48,14		55,58	31,48	35,15	41,86		
	48,48			38,02		62,24	41,36	41,17	40,43		
	30,43			42,95		59,50	43,43	37,23	33,66		
	38,83			67,65		63,22	31,07	43,69	36,50		
	28,55			59,83		45,06	28,04	35,38	35,72		
	42,67			47,28		55,69	25,18	39,18	35,37		
	47,97			47,04		49,38	43,13	59,49	38,49		
	34,76					27,99	42,48		34,24		
Diamètre du nucléoïde (u.a.)	202,8	248,6	233,8	285,2	Diamètre du nucléoïde (u.a.)	211,5	194,4	214,0	256,4		
	265,3	229,6	203,8	228,8		216,8	206,0	259,2	265,2		
		240,0	226,4	241,6		248,0	240,0	226,3	193,2		
			289,1	348,6		190,7	179,0	204,0	180,4		
			220,9	210,4		180,1	213,4	245,8	219,0		
			208,9	211,9		282,1	185,9	328,1			
							217,0	188,1			
							192,5				

Suivi de la génotoxicité par l'essai des comètes (paramètre d'analyse : longueur de la queue des comètes) et par la cytométrie de flux (paramètre d'analyse : diamètre des nucléoïdes) *(suite et fin)*

		10 j						20 j			
Conditions		T	A	B	C	Conditions		T	A	B	C
[U _{total}]	(µg/L)	0	20	100	500	[U _{total}]	(µg/L)	0	20	100	500
Longueur de la queue (µm)		41,15	35,28	38,60	61,71			26,03	25,26	35,10	52,64
		36,20	41,54	57,31	30,71			28,60	56,36	31,83	66,22
		35,95	40,73	44,55	33,04			30,12	27,03	33,58	71,41
		32,50	38,78	41,71	32,06			37,71	32,21	57,10	71,52
		50,44	39,04	36,71	34,01			21,82	57,31	34,54	39,11
		32,16	41,68	34,84	35,50			35,76	57,31	26,20	40,82
		42,42	33,84	59,74	25,65			28,65	47,94	32,48	43,96
		41,43	34,42	41,78	24,87			27,67	23,39	39,87	38,25
		30,32	27,64	42,23	34,10			33,70	32,54	29,11	64,67
		31,04	32,86	32,95	34,20			17,18	37,04	41,15	44,50
Diamètre du nucléoïde (u.a.)		155,7	218,1	243,3	252,1			207,7	322,5	380,3	326,0
		152,0	350,4	242,1	232,1			324,4	312,3	303,5	234,4
		250,7	226,5	235,0	328,8			206,1	332,7	358,7	294,3
		218,2	200,2	353,6	240,7			230,8	276,2	232,4	302,7
			288,1	191,4	315,6				330,8	366,9	
			320,0	293,1	258,2				233,5	353,3	
			372,7	342,4	358,3				346,7		
			300,9	342,4	207,8				287,4		
					214,5				403,6		

Dommmages à l'ADN par le test des comètes

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
5	non	acceptées	ANOVA	$p = 8,6 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 9,9 \cdot 10^{-3}$) B ≠ T ($p = 2,0 \cdot 10^{-2}$) C ≠ T ($p = 7,5 \cdot 10^{-4}$)
10	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,112$		
20	oui	acceptées	ANOVA	$p = 2,0 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 8,7 \cdot 10^{-2}$) C ≠ T ($p = 7,7 \cdot 10^{-5}$) C ≠ A ($p = 6,2 \cdot 10^{-2}$) C ≠ B ($p = 2,4 \cdot 10^{-2}$)

Dommmages à l'ADN par la cytométrie en flux

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0,5	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,152$		
1,5	oui	acceptées	ANOVA	$p = 5,2 \cdot 10^{-3}$	Tukey HSD	B ≠ T ($p = 8,5 \cdot 10^{-2}$) C ≠ A ($p = 8,3 \cdot 10^{-2}$) C ≠ B ($p = 7,9 \cdot 10^{-3}$)
3	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 0,703$		
5	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 2,8 \cdot 10^{-3}$	Wilcoxon	C ≠ A ($p = 4,2 \cdot 10^{-3}$) C ≠ B ($p = 2,0 \cdot 10^{-2}$)
10	non	acceptées	ANOVA	$p = 1,1 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	C ≠ T ($p = 6,5 \cdot 10^{-4}$) C ≠ A ($p = 1,8 \cdot 10^{-3}$) C ≠ B ($p = 2,3 \cdot 10^{-4}$)
20	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 5,9 \cdot 10^{-2}$	Wilcoxon	n.s.

Valeurs nominales et mesurées de la concentration et de l'activité radiologique de l'uranium total présent dans l'eau d'exposition au cours de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart type (n = 22, 57 et 88 pour 3, 10 et 20 jours d'exposition respectivement).

Conditions expérimentales		Valeurs nominales	Valeurs mesurées		
			3 j	10 j	20 j
Témoins	$\mu\text{g/L}$	0	0	0	0
	Bq/L	0	0	0	0
A	$\mu\text{g/L}$	100	119,9 \pm 27,1	107,5 \pm 29,5	102,4 \pm 26,9
	Bq/L	1,5	1,8 \pm 0.4	1,6 \pm 0.4	1,5 \pm 0.4
B	$\mu\text{g/L}$	100	109,4 \pm 14,9	99,9 \pm 24,8	94,4 \pm 22,7
	Bq/L	2 375	2 583,7 \pm 351,5	2 357,9 \pm 584,4	2 229,1 \pm 537,0

Suivi de la bioaccumulation, estimation de la dose radiologique délivrée aux tissus

Conditions	3 j			10 j			20 j		
	T	A	B	T	A	B	T	A	B
[U _{total}] (µg/L)	0	100		0	100		0	100	
Activité (Bq/L)	0	0	2 375	0	0	2 375	0	0	2 375
Bioaccumulation (µg/g poids frais)	n.d.	7,67	1,28	n.d.	9,30	4,48	n.d.	109,89	36,60
	n.d.	4,60	2,43	n.d.	6,09	28,48	n.d.	31,93	7,42
	n.d.	10,09	4,87	n.d.	8,85	9,18	n.d.	14,82	10,95
	n.d.	14,03	0,57	n.d.	14,43	2,34	n.d.	26,55	8,53
	n.d.	10,32	8,47	n.d.	2,99	2,54	n.d.	6,11	6,62
	n.d.	10,35	5,18	n.d.	14,84	3,33	n.d.	8,11	
	n.d.	6,49	3,74	n.d.	9,24	11,03	n.d.	3,12	
	n.d.	3,11	3,56	n.d.	4,38	9,24	n.d.	6,28	
	n.d.	3,53	0,91	n.d.	5,06	16,12	n.d.	9,71	
	n.d.	3,24	3,23	n.d.	7,03	1,26	n.d.	3,77	
Activité radiologique (Bq/g poids frais)	-	0,12	30,43	-	0,14	106,52	-	1,70	869,64
	-	0,07	57,69	-	0,09	676,59	-	0,49	176,40
	-	0,16	115,80	-	0,14	218,06	-	0,23	260,13
	-	0,22	13,60	-	0,22	55,71	-	0,41	202,70
	-	0,16	201,19	-	0,05	60,41	-	0,09	157,23
	-	0,16	123,07	-	0,23	79,22	-	0,13	
	-	0,10	88,88	-	0,14	262,15	-	0,05	
	-	0,05	84,48	-	0,07	219,43	-	0,10	
	-	0,05	21,58	-	0,08	382,93	-	0,15	
	-	0,05	76,76	-	0,11	29,94	-	0,06	

Bioaccumulation

<i>t</i>	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
3	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 1,4 \cdot 10^{-5}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 1,9 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 1,9 \cdot 10^{-4}$) B ≠ A ($p = 2,9 \cdot 10^{-2}$)
10	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 4,1 \cdot 10^{-5}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 1,9 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 1,9 \cdot 10^{-4}$)
20	-	-	Kruskal-Wallis	$p = 9,4 \cdot 10^{-5}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 1,9 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 7,1 \cdot 10^{-4}$)

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à t_0

	[U _{total}] (µg/L)	Activité (Bq/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	0	2,8	33 626,9	337 400	1 645,0	38,4
			3,5	35 076,4	208 220	2 283,3	38,4
			2,6	33 702,0	609 720	1 433,3	39,9
			4,7	31 191,7	633 640	1 325,0	24,7
			4,0	35 480,8	466 880	4 666,7	43,9
			2,9	32 678,5	441 660	2 035,0	39,2
			5,9	30 758,1	532 020	1 901,7	33,6
			3,6	34 222,3	383 300	1 788,3	34,6
			4,1	31 763,3	276 320	1 046,7	34,1
			4,6	30 404,4	252 600	1 041,7	31,5
A	100	0	3,7	30 711,3	355 200	1 245,0	27,9
			2,5	35 101,3	387 480	3 291,7	39,4
			5,2	32 404,5	424 080	2 388,3	26,4
			2,9	31 282,1	446 440	1 228,3	30,4
			4,9	31 087,5	634 100	1 666,7	29,0
			7,6	34 324,9	190 640	2 273,3	32,6
			5,1	31 873,1	554 940	1 811,7	22,7
			4,1	32 595,7	358 440	1 805,0	31,1
			7,2	33 662,7	264 940	2 966,7	42,7
			4,7	34 616,9	205 940	1 640,0	30,5
B	100	2 375	4,6	33 453,4	795 040	1 496,7	31,5
			3,7	34 191,1	252 640	1 923,3	43,8
			2,9	33 446,6	371 500	2 155,0	39,2
			3,4	34 560,7	539 600	3 531,7	48,0
			3,2	34 616,9	392 080	3 046,7	55,4
			2,7	34 258,3	306 620	2 296,7	51,5
			4,6	36 661,6	315 380	2 801,7	52,6
			4,2	31 214,5	293 280	1 958,3	43,9
			4,9	32 548,9	312 060	2 175,0	37,3
			5,6	30 777,8	201 760	1 131,7	34,3

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 3 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Activité (Bq/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	0	1,9	32 720,4	499 100	3 410,0	38,4
			3,1	34 302,5	359 400	2 838,3	47,5
			2,6	34 682,3	460 800	3 778,3	49,0
			4,0	32 349,3	507 580	3 225,0	36,7
			3,6	33 987,5	426 360	2 840,0	37,7
			5,0	34 153,1	210 240	3 628,3	41,9
			7,7	31 944,3	618 020	3 560,0	39,2
			4,1	33 122,1	612 060	4 056,7	38,0
			3,4	33 007,3	819 100	4 485,0	42,2
			3,3	33 861,3	419 240	4 855,0	55,2
A	100	0	2,8	34 085,4	546 360	3 486,7	42,4
			6,0	31 976,0	849 420	2 135,0	31,8
			3,1	34 692,6	784 860	5 545,0	46,7
			3,6	33 017,1	576 760	4 146,7	40,6
			3,4	34 166,6	439 920	4 230,0	47,5
			4,3	33 161,6	534 120	3 248,3	42,6
			5,3	33 994,2	448 380	3 720,0	40,2
			7,0	34 435,4	439 100	4 700,0	37,4
			4,0	34 920,5	111 380	4 073,3	28,0
			5,1	29 381,7		1 940,0	39,6
B	100	2 375	3,9	30 367,8	531 500	1 611,7	30,3
			3,8	31 955,2	377 460	2 591,7	35,4
			4,0	31 875,5	688 560	2 335,0	33,9
			4,0	34 015,1	518 880	3 670,0	32,0
			3,9	32 582,7	272 880	3 898,3	27,1
			5,4	29 215,7	985 260	2 153,3	31,6
			7,9	24 347,0	489 780	1 063,3	25,6
			5,6	31 630,6	138 540	2 975,0	28,2
			4,3	32 535,0	461 940	2 828,3	32,7
			4,9	31 510,5	216 440	2 911,7	32,2

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 10 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Activité (Bq/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GSHtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	0	2,6	33 100,1	630 660	483,3	42,4
			3,1	34 000,3	657 140	1 280,0	46,9
			3,7	32 831,5	617 100	1 223,3	46,4
			3,0	32 220,2	667 220	215,0	43,2
			2,6	32 992,4	459 960	1 298,3	48,7
			5,6	33 706,1	340 480	1 373,3	42,9
			4,6	30 229,6	709 600	165,0	37,6
			5,6	31 730,4	619 760	1 031,7	58,4
			4,5	33 501,6	652 580	1 248,3	51,2
			3,0	30 846,6	668 620	358,3	45,8
A	100	0	3,4	33 472,5	656 440	1 325,0	62,5
			2,5	33 530,8	561 700	1 285,0	60,8
			3,1	33 432,6	683 020	1 136,7	42,0
			4,9	31 568,8	279 800	503,3	40,1
			4,5	32 501,4	695 620	1 080,0	40,9
			6,1	29 786,4	420 300	1 180,0	45,5
			9,6	24 096,9	470 800	240,0	26,8
			4,4	31 502,6	493 700	1 238,3	42,4
			4,4	30 175,3	385 160	138,3	42,1
			4,6	29 436,3	419 760	1 105,0	55,4
B	100	2 375	3,6	32 386,3	345 100	1 243,3	49,3
			3,4	27 931,8	117 360	153,3	33,3
			3,9	32 595,2	698 080	1 320,0	44,9
			4,7	32 225,0	264 860	1 638,3	74,6
			2,0	34 115,0	204 500	520,0	76,7
			2,3	33 659,9	141 940	741,7	84,4
			4,9	28 567,4	158 360	506,7	41,5
			6,3	28 501,9	184 960	165,0	48,3
			4,8	28 044,3	271 160	331,7	39,1
			3,4	32 655,1	275 580	1 475,0	59,7

Suivi des marqueurs hépatiques de stress oxydant à 20 jours

	[U _{total}] (µg/L)	Activité (Bq/L)	Charge protéique (g/L)	SOD (U/g de protéines totales)	CAT (U/g de protéines totales)	GPx (U/g de protéines totales)	GShtot (µmole/g de protéines totales)
T	0	0	2,7	32 367,7	394 660	1 408,3	71,7
			5,4	32 064,5	620 140	1 348,3	56,5
			3,7	31 279,2	618 560	1 096,7	50,2
			4,3	31 553,3	827 780	1 893,3	64,9
			1,7	32 880,8	520 080	1 390,0	84,7
			2,5	33 325,4	982 620	1 496,7	85,4
			3,0	30 957,7	748 400	918,3	67,0
			1,6	33 498,0	391 140	1 843,3	108,1
			3,5	32 673,8	1 109 840	1 728,3	69,7
			3,2	31 910,2	1 171 080	1 655,0	65,8
A	100	0	3,2	26 950,1	544 440	923,3	59,6
			3,3	25 187,3	538 660	1 451,7	63,5
			3,2	28 962,2	398 480	2 188,3	81,0
			2,8	28 556,1	111 860	1 518,3	88,6
			3,6	27 071,0	241 920	1 555,0	91,0
			2,6	28 727,5	359 060	1 965,0	124,7
			3,4	28 987,5	149 340	1 926,7	82,2
			3,4	29 413,4	447 040	2 135,0	89,1
			5,3	27 891,8	631 640	2 078,3	67,9
			2,9	25 554,4	554 380	1 523,3	74,4
B	100	2 375	3,0	26 739,5	416 840	1 035,0	54,7
			2,5	27 358,8	625 060	1 010,0	64,6
			4,4	26 723,9	188 260	1 418,3	78,5
			3,6	30 563,6	427 960	1 735,0	51,0
			3,6	28 556,1	105 880	1 580,0	74,0
			3,6	30 206,9	613 640	1 465,0	78,8
			3,6	29 591,8	77 640	2 383,3	104,5
			3,1	29 805,8	700 280	2 185,0	86,3
			4,6	24 494,4	1 093 180	1 365,0	47,8
			4,0	27 662,6	393 420	1 873,3	88,5

Activité de la superoxyde dismutase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,531$		
3	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 4,4 \cdot 10^{-3}$	Wilcoxon	B ≠ T ($p = 8,6 \cdot 10^{-3}$) B ≠ A ($p = 1,0 \cdot 10^{-2}$)
10	non	-	Kruskal-Wallis	$P = 0,284$		
20	non	acceptées	ANOVA	$p = 2,5 \cdot 10^{-7}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 8,0 \cdot 10^{-7}$) B ≠ T ($p = 4,3 \cdot 10^{-6}$)

Activité de la catalase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,850$		
3	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,839$		
10	non	acceptées	ANOVA	$p = 4,3 \cdot 10^{-5}$	Tukey HSD	B ≠ T ($p = 4,0 \cdot 10^{-5}$) B ≠ A ($p = 2,1 \cdot 10^{-3}$)
20	oui	acceptées	ANOVA	$p = 1,9 \cdot 10^{-2}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 2,3 \cdot 10^{-2}$) B ≠ T ($p = 6,4 \cdot 10^{-2}$)

Activité de la glutathion peroxydase

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,664$		
3	non	acceptées	ANOVA	$p = 1,4 \cdot 10^{-2}$	Tukey HSD	B \neq T ($p = 3,3 \cdot 10^{-2}$) B \neq A ($p = 2,4 \cdot 10^{-2}$)
10	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 0,998$		
20	oui	acceptées	ANOVA	$p = 0,387$		

Quantité de glutathion total

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,122$		
3	non	acceptées	ANOVA	$p = 9,3 \cdot 10^{-5}$	Tukey HSD	B \neq T ($p = 9,7 \cdot 10^{-5}$) B \neq A ($p = 2,5 \cdot 10^{-3}$)
10	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 0,476$		
20	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,394$		

Suivi de l'activité AChE à t_0

Suivi de l'activité AChE à 3 jours

Conditions	T	A	B
[U _{total}] (µg/L)	0	100	
Activité (Bq/L)	0	0	2 375
Charge protéique (g/L)	1,2	1,4	1,0
	1,0	1,2	1,2
	1,1	1,3	1,2
	1,3	1,1	1,5
	1,1	1,2	1,0
	0,9	0,8	1,0
	1,0	1,4	1,0
	0,9	1,5	1,2
	0,9	1,3	0,9
	0,8	1,2	1,1
AChE (U/g de protéines totales)	3 857,3	6 640,7	5 975,5
	4 930,2	5 912,8	4 932,6
	4 598,1	6 425,1	5 213,4
	4 575,8	8 185,6	4 941,8
	5 008,2	4 362,6	6 676,2
	4 440,0	8 450,2	6 708,4
	3 736,8	6 430,5	5 671,7
	3 624,9	5 690,5	5 799,9
	4 468,5	4 636,0	6 330,8
	4 345,2	5 309,4	5 331,9

Conditions	T	A	B
[U _{total}] (µg/L)	0	100	
Activité (Bq/L)	0	0	2 375
Charge protéique (g/L)	1,1	1,1	1,0
	1,2	0,8	1,2
	1,2	1,3	0,9
	1,1	1,2	1,2
	1,1	1,0	1,1
	1,3	0,9	1,0
	1,4	1,1	1,1
	1,5	1,4	1,2
	1,0	0,9	1,0
	1,3	0,8	1,5
AChE (U/g de protéines totales)	4 989,8	9 699,9	5 863,1
	5 801,1	10 802,7	6 868,1
	5 255,0	6 820,8	6 983,9
	5 044,5	7 067,4	6 319,4
	5 060,4	7 012,0	6 233,8
	4 623,1	7 547,6	6 791,8
	4 180,6	6 090,6	5 813,4
	4 712,8	5 183,5	5 806,9
	6 756,5	7 199,4	7 404,4
	6 556,5	7 995,2	5 823,2

Suivi de l'activité AChE à 10 jours

Conditions	T	A	B
[U _{total}] (µg/L)	0	100	
Activité (Bq/L)	0	0	2 375
Charge protéique (g/L)	1,4	1,3	1,4
	1,0	0,8	1,8
	1,3	1,6	1,0
	1,0	0,8	1,4
	1,2	1,1	0,6
	1,2	1,3	1,2
	1,2	1,0	1,4
	1,3	1,3	0,8
	1,2	0,9	1,1
	1,1	1,3	1,5
AChE (U/g de protéines totales)	3 171,1	4 279,3	6 492,9
	4 026,2	6 230,7	4 520,0
	4 514,4	4 710,7	6 227,5
	3 523,0	5 514,1	6 062,5
	3 184,6	4 065,2	9 667,1
	3 599,9	3 755,0	7 116,7
	3 548,4	7 018,6	7 124,5
	2 878,8	6 689,7	8 002,3
	3 679,8	6 502,0	5 882,7
	4 546,1	5 107,2	5 950,4

Suivi de l'activité AChE à 20 jours

Conditions	T	A	B
[U _{total}] (µg/L)	0	100	
Activité (Bq/L)	0	0	2 375
Charge protéique (g/L)	1,3	1,9	1,3
	1,4	1,2	1,2
	1,3	1,5	0,8
	1,4	1,1	0,9
	1,5	1,3	1,0
	1,5	1,0	1,4
	0,9	1,1	1,7
	1,1	1,2	1,5
	1,2	1,7	1,4
	1,9	1,3	1,4
AChE (U/g de protéines totales)	7 113,3	6 434,7	7 989,8
	4 274,3	10 184,0	6 924,8
	6 114,5	7 834,5	10 615,6
	4 160,2	9 676,2	6 719,6
	4 047,4	6 810,1	8 673,0
	5 076,9	8 499,8	7 174,9
	5 690,6	8 277,0	6 738,0
	3 819,4	7 344,1	6 707,9
	6 020,6	8 867,5	7 067,7
	4 174,2	7 054,0	9 870,9

Activité de l'acétylcholinestérase (tests réalisés pour chacun des temps d'exposition de manière à révéler les différences entre les groupes d'individus)

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
0	oui	acceptées	ANOVA	$p = 3,9 \cdot 10^{-5}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 7,9 \cdot 10^{-5}$) B ≠ T ($p = 4,1 \cdot 10^{-4}$)
3	oui	acceptées	ANOVA	$p = 1,4 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 9,6 \cdot 10^{-5}$) B ≠ T ($p = 1,1 \cdot 10^{-2}$)
10	oui	acceptées	ANOVA	$p = 6,6 \cdot 10^{-7}$	Tukey HSD	A ≠ T ($p = 2,8 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 5,0 \cdot 10^{-7}$) B ≠ A ($p = 5,5 \cdot 10^{-2}$)
20	non	-	Kruskal-Wallis	$p = 2,5 \cdot 10^{-4}$	Wilcoxon	A ≠ T ($p = 2,3 \cdot 10^{-4}$) B ≠ T ($p = 4,1 \cdot 10^{-4}$)

Activité de l'acétylcholinestérase (tests réalisés pour chacun des groupes d'individus de manière à révéler les différences entre les temps d'exposition)

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
T	non	-	Kruskal-Wallis	$p < 1,0 \cdot 10^{-3}$	Wilcoxon	10 ≠ 0 ($p = 1,0 \cdot 10^{-2}$) 10 ≠ 3 ($p = 2,8 \cdot 10^{-4}$) 10 ≠ 20 ($p = 3,2 \cdot 10^{-3}$)
A	non	-	Kruskal-Wallis	$p < 1,0 \cdot 10^{-3}$	Wilcoxon	20 ≠ 0 ($p = 5,1 \cdot 10^{-3}$) 20 ≠ 10 ($p = 5,1 \cdot 10^{-4}$)
B	non	-	Kruskal-Wallis	$p < 1,0 \cdot 10^{-3}$	Wilcoxon	20 ≠ 0 ($p = 1,8 \cdot 10^{-4}$) 20 ≠ 3 ($p = 1,0 \cdot 10^{-2}$) 20 ≠ 10 ($p = 5,9 \cdot 10^{-2}$)

Valeurs nominales et mesurées de la concentration et de l'activité radiologique de l'uranium total présent dans l'eau d'exposition au cours de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart type (n = 28, 64 et 132 pour 3, 10 et 20 jours d'exposition respectivement).

Conditions expérimentales		Valeurs nominales	Valeurs mesurées		
			3 j	10 j	20 j
Témoins	$\mu\text{g/L}$	0	0	0	0
	Bq/L	0	0	0	0
A	$\mu\text{g/L}$	20	24,4 \pm 10,9	22,3 \pm 9,4	26,6 \pm 12,1
	Bq/L	0	0	0	0
B	$\mu\text{g/L}$	20	28,7 \pm 9,6	29,5 \pm 10,0	35,7 \pm 12,9
	Bq/L	237,5	341,0 \pm 114,4	350,3 \pm 118,8	423,9 \pm 152,7
C	$\mu\text{g/L}$	20	20,6 \pm 9,6	21,8 \pm 8,5	28,0 \pm 12,1
	Bq/L	2 375	2 441,0 \pm 1136,6	2 593,5 \pm 1010,7	3 326,4 \pm 1431,5
D	$\mu\text{g/L}$	20	29,8 \pm 13,6	27,9 \pm 11,7	37,7 \pm 15,1
	Bq/L	7 150	10 626,7 \pm 4,850,4	9 947,7 \pm 4,189,0	13 464,4 \pm 5,396,2
E	$\mu\text{g/L}$	100	115,7 \pm 28,6	106,4 \pm 26,5	115,6 \pm 27,4
	Bq/L	0	0	0	0
F	$\mu\text{g/L}$	100	107,3 \pm 29,8	93,0 \pm 31,6	109,5 \pm 38,1
	Bq/L	2 375	2,548,3 \pm 708,4	2,208,0 \pm 750,1	2,599,7 \pm 906,0
G	$\mu\text{g/L}$	100	98,8 \pm 30,9	84,7 \pm 32,4	89,8 \pm 37,9
	Bq/L	7 150	7 055,7 \pm 2,205,4	6 050,6 \pm 2,315,1	6 414,2 \pm 2,704,4

Suivi de la génotoxicité à 3 jours par l'essai des comètes (paramètre : longueur de la queue des comètes) et par la cytométrie de flux (paramètre : diamètre des nucléoïdes)

Conditions		T	A	B	C	D	E	F	G	
[U _{total}] (µg/L)	0	20				100				
Activité (Bq/L)	0	0	237,5	2 375	7 150	0	2 375	7 150		
Erythrocytes	Longueur de la queue (µm)	43,0	39,4	18,3	31,8	46,3	51,3	41,8	35,4	
		46,9	45,0	24,1	46,8	45,0	38,1	53,3	35,1	
		30,4	36,8	43,8	33,7	29,7	39,3	42,8	28,2	
		34,1	25,1	28,0	40,7	30,3	52,1	48,9	54,1	
		32,6	28,9	37,0	37,8	47,1	48,8	34,2	36,3	
		37,0	23,4	26,6	53,2	40,5	39,2	39,7	33,1	
		14,4	30,4	43,9	36,7	34,2	37,2	28,1	32,2	
	Diamètre du nucléoïde (u.a.)			30,6	20,4	35,2	38,3	52,2	50,9	
					35,4	34,8		49,4	56,1	
					39,5			32,2		
		88,8	85,5	49,3	61,5	69,4	47,2	77,3	68,1	
		64,6	71,8	49,5	58,5	63,6	56,3	54,3	71,6	
		77,7	73,7	80,6	77,6	72,8	50,3	68,7	51,8	
		52,5	81,9	47,1	67,2	86,6	54,9	64,6	57,0	
Hépatocytes	Longueur de la queue (µm)	59,1	72,0	50,4	66,0	48,2	55,3	49,9	58,6	
		70,7	74,2	66,7	69,7	65,9	91,7	70,5	64,5	
		75,5	75,8	94,7	144,0	49,8	82,5	61,8	44,0	
		97,9	59,5	45,9	68,0	52,4	89,2	53,0		
				66,9	64,7		61,2	66,0		
			54,8			103,3				
Cellules gonadiques	Longueur de la queue (µm)	35,7	18,6	30,3	45,0	39,0	36,9	55,0	31,2	
		24,1	21,1	41,1	57,5	38,4	34,8	35,8	44,7	
		28,2	36,0	29,5	35,8	47,6	37,4	48,0	34,3	
		30,3	34,2	34,1	29,7	34,0	37,6	54,6	23,6	
		35,1	22,1	34,7	38,6	40,7	26,3	50,6	49,8	
		-	-	-	-	-	-	-		

Suivi de la génotoxicité à 10 jours par l'essai des comètes (paramètre : longueur de la queue des comètes) et par la cytométrie de flux (paramètre : diamètre des nucléoïdes)

Conditions		T	A	B	C	D	E	F	G
[U _{total}] (µg/L)		0	20			100			
Activité (Bq/L)		0	0	237,5	2 375	7 150	0	2 375	7 150
Erythrocytes	Longueur de la queue (µm)	41,4	22,0	72,8	65,0	56,5	40,8	46,8	46,5
		44,3	26,1	58,2	60,4	55,6	42,3	30,4	56,7
		33,3	45,5	57,9	46,0	49,4	44,9	56,8	52,5
		37,7	27,7	55,0	51,9	40,0	49,1	61,5	47,1
		39,6	46,3	40,1	47,4	38,6	54,3	58,7	40,2
		45,7	60,7	39,4	44,1	44,0	51,2	52,0	
		34,1	52,8	53,8	52,6	38,8	52,5	49,7	41,4
	Diamètre du nucléoïde (u.a.)	68,3	47,5	52,3	52,0	90,8	58,4	84,8	61,0
		48,2	49,4	57,2	47,8	85,6	71,5	85,8	70,5
		49,2	61,2	46,4	50,6	79,2	73,2	68,8	65,2
		52,3	64,6	48,9	82,6	82,8	57,6	66,7	72,7
		63,3	49,3	64,0	47,9	71,6	63,4	57,9	76,7
		53,2	50,0	71,1	56,0	81,5	63,0	61,2	
		54,7	46,7	49,4	53,2	60,9	63,6	71,1	78,1
Hépatocytes	Longueur de la queue (µm)	39,5	24,6	25,7	36,8	38,8	31,2	22,6	34,4
		39,3	33,5	28,9	42,5	25,0	24,0	22,5	28,3
		45,4	44,8	40,6	35,5	36,8	40,8	20,6	23,7
		51,1	29,2	39,4	29,6	20,8	41,6	25,5	36,6
		36,0	25,1	32,4	29,9	22,6	21,8	19,2	48,1
Cellules gonadiques	Longueur de la queue (µm)	48,8	39,3	47,9	41,8	29,5	38,2	39,4	33,3
		36,7	43,5	37,8	40,8	35,5	46,9	42,8	29,5
		33,8	49,0	30,9	38,4	41,8	35,8	37,5	39,9
		33,4	36,6	46,4	35,1	29,3	42,4	20,5	51,4
		43,3	48,3	45,3	37,3	35,8	49,4		46,3

Suivi de la génotoxicité à 20 jours par l'essai des comètes (paramètre : longueur de la queue des comètes) et par la cytométrie de flux (paramètre : diamètre des nucléoïdes)

Conditions		T	A	B	C	D	E	F	G	
[U _{total}] (µg/L)	0	20					100			
Activité (Bq/L)	0	0	237,5	2 375	7 150	0	2 375	7 150		
Erythrocytes	Longueur de la queue (µm)	26,2	32,4	28,9	43,4	39,5	45,7	37,2	47,0	
		51,3	32,8	37,3	42,9	45,9	42,1	44,4	45,7	
		65,8	51,7	31,0	40,3	49,7	48,1	33,0	40,9	
		50,4	42,2	56,9	38,6	34,2	56,9	41,6	40,4	
		76,4	43,3	37,5	22,7		52,8	46,3	34,6	
		40,0	51,2	30,8	57,7		50,5	44,4	29,4	
		40,3	31,3	38,8	47,8		44,9	49,7	30,0	
		40,5	39,6	53,8	54,5		40,3	32,3	41,2	
		41,8	45,7	37,7	36,3		43,9	50,2	53,9	
	35,0			40,0				44,7		
	Diamètre du nucléoïde (u.a.)	54,7	61,4	61,7	64,8	55,3	69,9	70,0	64,0	
		64,2	62,0	60,3	76,9	59,7	59,5	64,6	51,7	
		61,3	64,6	59,5	73,5	55,4	63,3	68,9	58,2	
		71,7	63,7	76,8	58,5	50,7	60,7	57,5	89,0	
		65,5	62,0	62,3	63,7		58,3	59,0	51,1	
		70,8	58,8	68,4	71,7		58,5	68,5	62,6	
		60,1	62,5	65,1	84,2		59,2	54,7	56,5	
		69,6	64,5	62,8	61,6		58,0	59,6	57,1	
58,1		60,9	61,0	60,6			58,2	57,2		
64,0						48,0	64,6			
Hépatocytes	Longueur de la queue (µm)	24,3	35,1	26,9	39,5	31,8	25,0	32,8	33,4	
		45,3	41,0	38,4	48,9	37,9	24,9	33,8	24,8	
		38,9	30,6	50,3	36,8	39,9	35,1	24,1	26,9	
		31,5	31,0	40,5	42,5	23,3	42,0	28,6	17,2	
		26,5	28,4	37,9			19,8		20,0	
Cellules gonadiques	Longueur de la queue (µm)	19,6	26,9	20,0	15,2	29,8	34,1	36,8	31,2	
		25,1	17,8	23,7	27,9	34,1	27,8	37,2	28,8	
		23,7	27,3	34,9	24,1	38,1	34,5	33,2	26,6	
		22,5	17,7	32,0	26,0	42,2	28,4	28,2	23,8	
		22,8	27,1	20,7	22,6		29,2	31,5	29,1	

Domages à l'ADN dans le sang par l'essai des comètes

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
			ANOVA	p		
3	non	acceptées	ANOVA	p = 8,9.10 ⁻³	Tukey HSD	E ≠ A (p = 8,6.10 ⁻²) E ≠ B (p = 3,3.10 ⁻²) F ≠ A (p = 1,0.10 ⁻¹) F ≠ B (p = 4,2.10 ⁻²)
					Dunnett	E ≠ T (p = 9,0.10 ⁻²) F ≠ T (p = 1,0.10 ⁻¹)
10	non	acceptées	ANOVA	p = 4,7.10 ⁻²	Tukey HSD	B ≠ T (p = 9,3.10 ⁻²)
					Dunnett	B ≠ T (p = 3,1.10 ⁻²) C ≠ T (p = 0,6.10 ⁻²)
20	oui	acceptées	ANOVA	p = 0,387		

Dommmages à l'ADN dans le sang par la cytométrie en flux

<i>t</i>	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
3	oui	acceptées	ANOVA	$p = 0,102$		
10	oui	acceptées	ANOVA	$p = 1,4.10^{-6}$	Tukey HSD	D ≠ T ($p = 7,6.10^{-4}$) D ≠ A ($p = 5,1.10^{-5}$) D ≠ B ($p = 5,8.10^{-4}$) D ≠ C ($p = 4,2.10^{-4}$) E ≠ A ($p = 8,3.10^{-2}$) F ≠ T ($p = 1,9.10^{-2}$) F ≠ A ($p = 1,5.10^{-3}$) F ≠ B ($p = 1,5.10^{-2}$) F ≠ C ($p = 1,1.10^{-2}$) G ≠ A ($p = 1,8.10^{-2}$) G ≠ B ($p = 9,6.10^{-2}$) G ≠ C ($p = 7,7.10^{-2}$)
					Dunnett	D ≠ T ($p < 1,0.10^{-4}$) F ≠ T ($p = 5,0.10^{-3}$) G ≠ T ($p = 3,9.10^{-2}$)
20	non	acceptées	ANOVA	$p = 2,6.10^{-2}$	Tukey HSD	D ≠ C ($p = 1,7.10^{-2}$)
					Dunnett	D ≠ T ($p = 5,3.10^{-2}$)

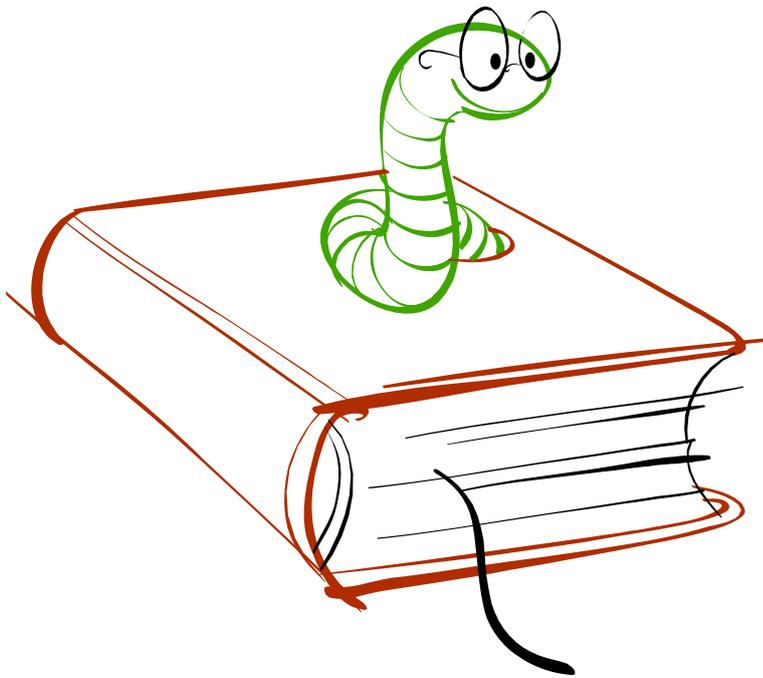
Domages à l'ADN dans le foie par l'essai des comètes

t	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
			ANOVA	p		
3	non	acceptées	ANOVA	p = 1,9.10 ⁻³	Tukey HSD	F ≠ T (p = 1,1.10 ⁻²) F ≠ A (p = 9,2.10 ⁻⁴) F ≠ B (p = 6,0.10 ⁻²) F ≠ E (p = 8,2.10 ⁻²) C ≠ A (p = 5,7.10 ⁻²)
10	oui	acceptées	ANOVA	p = 5,9.10 ⁻³	Tukey HSD	D ≠ T (p = 1,1.10 ⁻¹) F ≠ T (p = 1,3.10 ⁻³) F ≠ B (p = 9,2.10 ⁻²) F ≠ C (p = 4,1.10 ⁻²) F ≠ E (p = 8,1.10 ⁻²)
					Dunnett	D ≠ T (p = 3,7.10 ⁻²) F ≠ T (p < 1,0.10 ⁻³)
20	oui	acceptées	ANOVA	p = 2,8.10 ⁻²	Tukey HSD	G ≠ B (p = 6,1.10 ⁻²) G ≠ C (p = 2,0.10 ⁻²)

Domages à l'ADN dans les gonades par l'essai des comètes

<i>t</i>	Transformation Box-Cox	Normalité Homoscédasticité	Comparaisons de moyennes		Tests post-hoc	
10	non	acceptées	ANOVA	$p = 0,362$		
20	non	acceptées	ANOVA	$p = 2,0 \cdot 10^{-4}$	Tukey HSD	D ≠ T ($p = 2,3 \cdot 10^{-3}$)
						D ≠ A ($p = 4,0 \cdot 10^{-3}$)
						D ≠ B ($p = 4,7 \cdot 10^{-2}$)
						D ≠ C ($p = 3,4 \cdot 10^{-3}$)
						F ≠ T ($p = 1,3 \cdot 10^{-2}$)
						F ≠ A ($p = 2,3 \cdot 10^{-2}$)
						F ≠ C ($p = 2,0 \cdot 10^{-2}$)
					Dunnett	D ≠ T ($p = 1,0 \cdot 10^{-3}$)
						E ≠ T ($p = 4,0 \cdot 10^{-2}$)
						F ≠ T ($p = 4,0 \cdot 10^{-3}$)

GLOSSAIRE



GLOSSAIRE

A

Actinides : Famille d'éléments chimiques plus lourds que l'Actinium (numéro atomique 89). Quatre actinides existent à l'état naturel : l'Actinium (89), le Thorium (90), le Protactinium (91) et l'Uranium (92).

Anatomopathologie : (syn. anatomie pathologique) Science qui a pour objet l'étude des lésions anatomiques. Etude des altération des organes et des tissus.

Apoptose : (mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire) Processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation: les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des qui permettront sa phagocytose.

B

Becquerel (Bq) : Unité de mesure, légale et internationale, utilisée pour la radioactivité. Le Becquerel (Bq) est égal à une désintégration d'un noyau radioactif par seconde.

Bioaccumulation : Processus par lequel les substances chimiques sont emmagasinées par les organismes aquatiques directement à partir de l'eau ou via la consommation de nourriture contenant ces substances.

Biocénose : Ensemble des êtres vivants d'un biotope ou d'une station donnée. (La biocénose et le biotope constituent un écosystème)

Bioconcentration : Accumulation par l'organisme aquatique de substances à une concentration supérieure à celle mesurée dans l'eau. Cette accumulation est estimée au travers d'un facteur appelé "facteur de bioconcentration", égal au rapport de la concentration de cette substance dans les tissus de l'organisme divisé par sa concentration dans l'eau.

Biodisponible : Fraction de la quantité totale d'un produit chimique dans l'environnement qui peut être absorbée par des organismes. Cet environnement peut être constitué d'eau, de sédiments, de particules en suspension ou d'aliments.

Biomarqueur : Mesure de changements observables à différents niveaux d'organisation biologique permettant de révéler l'exposition à une substance chimique à caractère polluant et/ou les effets biologiques induits.

Biotope : Milieu biologique offrant à une biocénose des conditions de vie relativement stable (biotope terrestre, marin, etc.)

C

Cellule germinale : Cellule reproductrice (gamète)

Cellule somatique : Cellule non reproductrice.

CE_x (concentration efficace) : Concentration estimée d'une substance ayant un effet particulier (par exemple immobilisation, réduction de la croissance) chez un pourcentage x des organismes soumis à l'essai. La durée de l'essai doit être précisée. Le plus souvent, la valeur donnée est celle de la concentration ayant entraîné l'effet considéré chez 50 % des individus, on parle alors de CE₅₀.

CL_x (concentration létale) : Concentration estimée d'une substance létale pour un pourcentage x des organismes soumis à l'essai, pendant une période de temps précisée. Le plus souvent, la valeur donnée est celle de la concentration ayant entraîné la mort de 50 % des individus, on parle alors de CL₅₀.

Cognition : Terme générique regroupant les divers processus mentaux allant de l'analyse perceptive à la commande motrice (en passant par la mémorisation, le raisonnement, la

décision, le langage...). Elle regroupe donc les fonctions par lesquelles les organismes construisent une représentation opératoire de la réalité à partir de leurs perceptions, susceptible en particulier de nourrir leurs raisonnements et guider leurs actions. Sciences cognitives : ensemble des sciences qui concernent la connaissance et ses processus (psychologie, linguistique, neurobiologie, logique, etc.).

Colloïde : Système constitué de fines particules en suspension au sein d'un fluide, caractérisé par des granules de dimension moyenne comprise entre 2 et 200 nm).

D

Degré (ou état) d'oxydation : Valeur de la charge fictive portée par un atome si toutes les liaisons polarisées dans lesquelles il est impliqué étaient de nature purement ionique. Il indique le nombre d'électrons que cet atome a donnés ou reçus par rapport à son état neutre.

Descendant (Nucléide de filiation) : Tout nucléide qui provient d'un autre nucléide par désintégration radioactive.

Désintégration radioactive : Réduction progressive du nombre d'atomes instables (radionucléides) d'une substance causée par la désintégration spontanée des noyaux ou leur transformation en atomes différents, accompagnée de l'émission de particules et (ou) de photons.

Dose absorbée : Quantité d'énergie absorbée par unité de masse de matière organique ou inorganique. C'est une grandeur directement mesurable exprimée en Gray (Gy) (1 Gy = 1 J/kg)

Dose radiologique : Energie absorbée par unité de masse d'un tissu biologique exposé à un rayonnement ionisant, mesurée en grays (Gy).

Dureté d'une eau : Concentration de tous les cations métalliques, à l'exception des cations de métaux alcalins, présents dans l'eau. En général, la dureté est une mesure de la concentration des ions calcium (Ca^{2+}) et (Mg^{2+}) magnésium dans l'eau; elle s'exprime

souvent en milligrammes de carbonate de calcium par litre d'eau. Il existe cependant une unité spécifique à la mesure de la dureté totale d'une eau : le titre hydrotimétrique (TH). Ce titre hydrotimétrique mesure de la dureté totale d'une eau, exprimée en degrés (°TH), relative à la quantité d'ions calcium et d'ions magnésium contenue dans un litre d'eau. Le calcul de ce titre est le suivant :

$$\text{TH} = \frac{\frac{[\text{Ca}^{2+}] \text{ en g/L}}{M_{\text{Ca}} \text{ en g/mol}} + \frac{[\text{Mg}^{2+}] \text{ en g/L}}{M_{\text{Mg}} \text{ en g/mol}}}{10^{-4}}$$

E

Ecosystème : Système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents (biotope) et leur environnement (biocénose).

Ecotoxicologie : Science qui étudie l'origine, l'émission et l'introduction de polluants naturels ou artificiels dans la biosphère, leur devenir et leurs actions sur les écosystèmes. Elle inclut ainsi la toxicologie de l'environnement, la toxicologie industrielle, la toxicologie alimentaire ou la toxicologie nucléaire.

Équilibre séculaire : Équilibre atteint entre un nucléide précurseur et un nucléide de filiation où le nucléide de filiation se désintègre au même taux qu'il est produit. La durée de vie du nucléide de filiation doit être beaucoup plus courte que celle du précurseur. L'équilibre séculaire est atteint après une période correspondante à de 6 à 10 demi-vies du nucléide de filiation. Voir Désintégration radioactive.

Épissage : Chez les organismes eucaryotes, les gènes codant pour des protéines sont constitués d'une suite d'exons (séquences non codantes) et d'introns (séquences codantes) alternés. Lors de la transcription un pré-ARNm est synthétisé, celui-ci va être épissé pour donner lieu à l'ARNm dit mature. L'épissage est un processus qui se produit dans le noyau de la cellule et

qui consiste en l'excision des introns et en la ligature des exons. L'ARNm mature, constitué des seuls exons, est alors exporté vers le cytoplasme pour être traduit en protéine.

Espèces réactives de l'oxygène (ERO) : Intermédiaires réactifs du métabolisme de l'oxygène, radicalaires ou non-radicalaires (par exemple le peroxyde d'hydrogène H₂O₂).

Espèces radicalaires : cf. radicaux libres.

F

Facteur de transfert trophique : Rapport combinant le taux de concentration (sans unité) et le taux d'ingestion de l'organisme (kg/j) et servant à prévoir la fraction du radionucléide dans la nourriture qui s'accumule dans l'organisme chaque jour (j/kg).

Fissile : Se dit d'un nucléide dont les noyaux sont susceptibles de subir une fission sous l'effet de neutrons de toutes énergies, aussi faibles soient-elles. La fission fait référence à la division d'un noyau lourd en deux fragments dont les masses sont du même ordre de grandeur, qui s'accompagne de l'émission de neutrons, de rayons γ et d'une quantité d'énergie élevée.

Fitness : Mesure de la capacité des individus à transmettre leurs gènes à la génération suivante (donc à produire des descendants matures), relativement aux autres individus de la même population et au même moment. Cette notion inclut donc notamment celles de survie et de reproduction.

Fraction S9 : Surnageant d'homogénat résultant de la précipitation des noyaux et des mitochondries par centrifugation à des vitesses permettant d'obtenir des forces centrifuges de 9 000 à 20 000 g.

G

Gray (Gy) : Unité du système international qui correspond à l'énergie transmise à la matière par unité de masse l(joule par kg) lors de l'absorption d'une dose de rayonnements ionisants.

Groupe VI (classification de Mendeleïev) : Le groupe 6 du tableau périodique des éléments contient les éléments chimiques suivant: chrome (Cr), molybdène (Mo), Tungstène (W),

seaborgium (Sg), néodyme (Nd) et uranium (U). Le nom “groupe 6” est le nouveau nom UICPA pour ce groupe. Il était connu avant sous le nom “groupe VIA” dans le système européen ou groupe “VIB” dans le système américain.

H

Halieutique : Science de l’exploitation des ressources vivantes aquatiques. Elle représente le pendant aux milieux aquatiques de ce qu’est l’agronomie aux milieux terrestres. Elle s’intéresse aux différents modes d’exploitation et de gestion (pêche, aquaculture) des espèces vivantes (végétales ou animales) exercés dans tous les milieux aquatiques (mer et eau douce).

Hématopoïétique : Relatif à l’hématopoïèse qui regroupe l’ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines.

Homéostasie : Maintien, chez les organismes vivants, de l’équilibre normal des réactions chimiques et des constituants principaux de l’organisme d’un individu. Par extension, l’homéostasie fait également référence à la stabilisation des constantes physiologiques d’un organisme.

I-J

Isotopes : Nucléides ayant le même nombre de protons au sein de leur noyau et, de ce fait, le même numéro atomique mais ayant un nombre de neutrons différents et donc une masse atomique différente). Les isotopes d’un même élément se comportent de manière identique d’un point de vue chimique et possèdent des propriétés physiques comparables (point de fusion, point d’ébullition, volatilité) excepté concernant leurs caractéristiques radioactives (période radioactive, activité spécifique, mode de décroissance, etc.) qui sont spécifiques d’un isotope donné.

K-L-M-N

Métaux lourds : La notion de métaux lourds est actuellement une notion relativement floue, sans définition scientifique, technique ou juridique qui soit unanimement reconnue. Certains auteurs indiquent ainsi que “l’appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n’a ni fondement scientifique, ni application juridique”. Dans le cadre de ce glossaire, nous retiendrons donc la définition proposée par Ramade (1998) selon laquelle cette expression désigne l’ensemble des métaux toxiques de forte masse atomique (plomb, mercure, zinc, cadmium, etc.).

Nécrose : Une de deux formes principales de mort cellulaire (l’autre étant l’apoptose, ou mort cellulaire programmée) observée lors d’accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. La nécrose est accompagnée habituellement d’une réponse inflammatoire qui consiste en la présence d’exsudat et de cellules spécialisées du système hématopoïétique comme les lymphocytes et les macrophages. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique.

Néoplasique : Relatif à la néoplasie, croissance anormale (plus ou moins organisée et différenciée) d’un tissu ou d’un organe, formant généralement une masse distincte de celui-ci. Une néoplasie peut être bénigne ou maligne (cancer).

Neurite : Prolongement cytoplasmique neuronal en cours d’élongation qui donnera à terme soit un axone soit une dendrite.

Neutron : Particule subatomique. Comme son nom l’indique, le neutron est neutre et n’a donc pas de charge électrique (ni positive, ni négative). Les neutrons, avec les protons, sont les constituants du noyau de l’atome. Pour un atome, on note Z le nombre de protons (que l’on appelle nombre atomique ou numéro atomique), A le nombre de protons + neutrons. Le nombre de neutrons est donc N ou $A-Z$.

Nucléon : Terme générique désignant les composants du noyau atomique (i.e. les protons et les neutrons). Le nombre de nucléons par atome est généralement noté “ A ”, et appelé “nombre de masse”.

O-P-Q

Pathologie : Science qui a pour objet l'étude des maladie, des effets qu'elles provoquent (lésions, troubles). ON peut ainsi parler de pathologie animale, de pathologie végétale, de pathologie moléculaire, de pathologie mentale, etc..

Potentiel d'oxydo-réduction (Eh) : Mesure des réactions d'oxydation et de réduction en fonction de la perte ou du gain d'électrons. Les éléments qui donnent les électrons sont les oxydants tandis que ceux qui les reçoivent sont les réducteurs.

Protéine : Les protéines sont définies par une structure primaire (leur séquence en acides aminés), une structure secondaire (enroulements ou repliements de certains segments de cette chaîne par le biais de liaisons hydrogènes), une structure tertiaire (contorsions irrégulières de la chaîne via des liaisons hydrogènes, ioniques, des ponts disulfures ou encore des effets hydrophobes) et enfin, une structure quaternaire (appariement possible de plusieurs sous-unités polypeptidiques pour former une protéine fonctionnelle).

Proton : Particule constitutive du noyau atomique, de charge électrique positive égale numérique à celle de l'électron, mais de masse 1840 fois plus grande (voisine de celle du neutron).

R

Radiations ionisantes : Rayonnements électromagnétiques ou particuliers possédant une énergie associée supérieure à 10 électron-volt (eV). En-deça de cette valeur en énergie, les radiations sont dites "non ionisantes" et on y classe notamment les rayonnements ultra-violets ou encore les champs électromagnétiques de très basse fréquence.

Radicaux libres (ou espèces radicalaires) : Atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (par exemple : le radical superoxyde O_2^\bullet , ou le radical hydroxyle OH^\bullet). La présence d'un électron célibataire (noté par un point) confère à ces molécules la plupart du temps une grande instabilité (elles ne respectent pas la règle de l'octet), ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux

composés dans des processus le plus souvent non spécifiques. Leur durée de vie en solution est donc très courte.

Radioactivité : Propriété de certains éléments chimiques dont les noyaux se désintègrent spontanément pour former d'autres éléments en émettant des rayonnement ionisants.

Radioélément : Élément radioactif naturel ou artificiel.

Radionucléide : Atome à noyau instable (p. ex., uranium-238) dont la désintégration est accompagnée de l'émission d'un rayonnement électromagnétique.

Rayonnement alpha (α) : Emission de particules alpha (noyaux d'hélium 4, fortement ionisant mais très peu pénétrant) à partir du noyau d'un atome instable (radionucléide). Les particules ne transférant leur énergie que sur une très courte distance et ne pouvant pénétrer la couche externe de la peau, le rayonnement alpha constitue un danger d'irradiation interne.

Rayonnement bêta (β): Emission d'électrons ou de positrons à partir du noyau d'un atome instable (radionucléide). Les particules bêta peuvent pénétrer un ou deux cm de tissus biologiques. Elles constituent un danger d'irradiation interne et externe.

Rayonnement gamma (γ): Emission de photons (rayonnement électromagnétique), porteurs d'énergie mais sans charge, par un atome instable (radionucléide). Le rayonnement gamma est le plus pénétrant des rayonnements.

S-T

Spéciation (chimique) : distribution d'un élément parmi des espèces chimiques déterminées (formes libres, complexes, etc.)

Synaptogénèse : Formation des synapses neuroneurales ou neuromusculaires.

Systémique : Qui se rapporte (ou affecte) un système dans son ensemble. Relatif, par exemple, à la circulation sanguine générale.

Tissus mous : Tissu servant à supporter les structures et les organes du corps comme les muscles, les vaisseaux sanguins ou les tissus adipeux. Un sarcome des tissus mous est une forme de cancer qui prend naissance dans ce type de tissus.

Toxicité : Particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme encore dénommée toxicité chronique, résultant de l'exposition permanente à de faibles concentration d'un toxique.

Toxicité aiguë : Caractère d'un produit chimique qui va avoir des effets néfastes sur la santé de l'animal ou de l'homme après une seule exposition de courte durée à ce produit. Cette toxicité est évaluée par le biais de tests de courte durée comparativement à la durée de vie de l'organisme soumis à l'essai (p. ex., généralement moins de quatre jours pour les poissons).

Toxicité chronique : Caractère d'un produit chimique qui va avoir des effets néfastes sur la santé de l'animal ou de l'homme après plusieurs expositions et à long terme. Cette toxicité est évaluée par le biais de tests couvrant une partie appréciable de la vie de l'organisme soumis à l'essai (p. ex., 10 % ou plus) et permettant d'examiner les effets sur certains paramètres tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction et la survie.

Toxicocinétique : Etude du devenir des substances toxiques (endogènes ou exogènes), dans les organismes vivants, du moment de leur pénétration jusqu'au moment de leur élimination (absorption, transport, répartition et rétention dans l'organisme, excrétion). Cette étude tient compte de la vitesse et de la concentration avec lesquelles elles apparaissent dans l'organisme.

Toxicogénomique (études de) : Suivi des modulations de l'expression de certains gènes sous l'effet d'une contamination. Si le génome est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné, en revanche les gènes, eux, peuvent avoir une expression génique spécifique différenciée dans le temps (propre à un stade du développement), dans l'espace

(propre à un type cellulaire, tissulaire ou d'un organe) et/ou caractéristique d'un état donné (normal, pathologique ou en réponse à un stimulus particulier). L'étude de l'expression génique consiste alors à caractériser et quantifier les produits d'expression de l'ADN (correspondant aux ARN messagers (ARNm) qui constituent le transcriptome). Ceci permet donc d'identifier dans un tissu, dans un état et à un moment donné du développement, les séquences actives et donc à révéler ainsi le niveau d'expression des gènes dont elles sont issues.

Toxicologie environnementale : Science qui étudie les effets toxiques sur les organismes vivants, les voies de transfert et les interactions avec l'environnement des agents polluants d'origine anthropique.

Transfert d'énergie linéique (TEL) : Taux de perte d'énergie par unité de longueur de trajectoire.

U-V-W

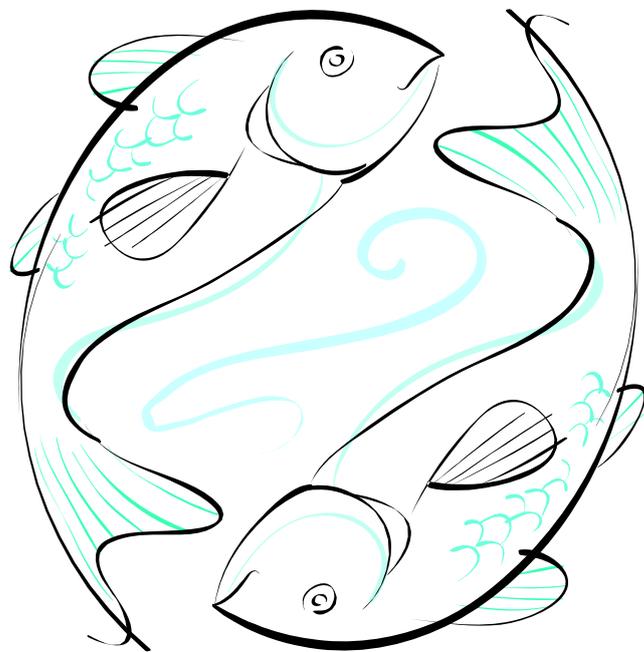
Voie directe : Expression relative au milieu environnant (l'eau dans le cas d'organismes aquatiques). Une contamination par voie directe consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée à partir du milieu environnant cet organisme.

Voie trophique : Expression relative à la chaîne alimentaire. Une contamination par voie trophique consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée par le biais de la chaîne alimentaire.

X-Y-Z

Xénobiotique : Substance chimique étrangère à l'organisme (xénos = étranger ; bios = vie) et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme même à faible concentration.

INDEX DES ESPECES CITEES



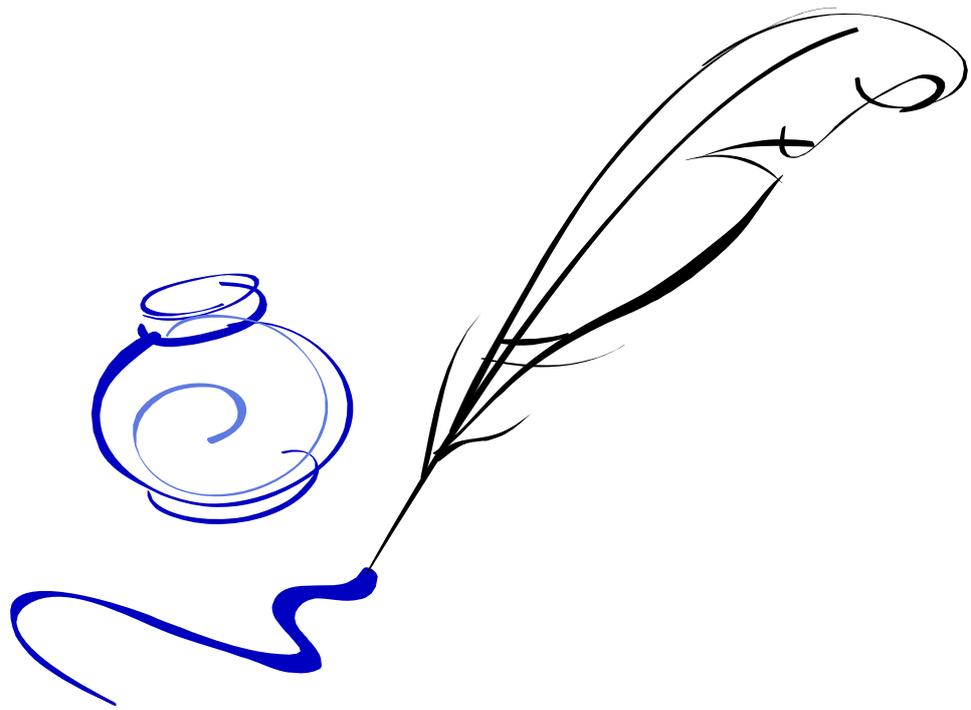
INDEX DES ESPECES CITEES

Espèce citée		Groupe taxonomique		Nom vernaculaire	
		Classe	Ordre	français	anglais
<i>Ambassis macleayi</i>		Actinoptérygien	Perciforme		<i>Reticulated perchlet</i>
<i>Anabas testudineus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Perche grimpeuse	<i>Climbing perch</i>
<i>Anguilla anguilla</i>		Actinoptérygien	Anguilliforme	Anguille européenne	<i>European eel</i>
<i>Apis mellifera</i>		Insecte	Hyménoptère	Abeille	<i>European honey bee</i>
<i>Barbatula barbatula</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Loche franche	<i>Stone loach</i>
<i>Carassius auratus</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Poisson rouge	<i>Common goldfish</i>
<i>Catostomus catostomus</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Meunier rouge	<i>Longnose sucker</i>
<i>Catostomus commersoni</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Meunier noir	<i>White sucker</i>
<i>Ceriodaphnia dubia</i>		Branchiopode	Cladocère	Daphnie	
<i>Chironomus tentans</i>		Insecte	Diptère	Chironome	
<i>Clarias gariepinus</i>		Actinoptérygien	Siluriforme	Poisson-chat africain	<i>African catfish</i>
<i>Corbicula fluminea</i>		Bivalve	Vénéridé	Clam asiatique	<i>Asian clam</i>
<i>Coregonus clupeaformis</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Corégone	<i>Lake whitefish</i>
<i>Couesius plumbeus</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Mené de lac	<i>Lake chub</i>
<i>Craterocephalus marianae</i>		Actinoptérygien	Athériniforme		<i>Magela hardyhead</i>
<i>Ctenopharyngodon idella</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Amour blanc	<i>Grass carp</i>
<i>Cyprinus carpio</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Carpe commune	<i>Common carp</i>
<i>Danio rerio</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Poisson zèbre	<i>Zebrafish</i>
<i>Daphnia pulex</i>		Branchiopode	Cladocère	Daphnie	
<i>Dicentrarchus labrax</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Loup de mer (bar)	<i>European sea bass</i>
<i>Eisenia fetida</i>		Oligochète	Haplotaxidés	Vers du fumier	<i>Redworm</i>

Espèce citée		Groupe taxonomique		Nom vernaculaire	
		Classe	Ordre	français	anglais
<i>Gambusia holbrooki</i>		Actinoptérygien	Cyprinodontiformes	Gambusie	<i>Mosquitofish</i>
<i>Gasterosteus aculeatus</i>		Actinoptérygien	Gastérostéiformes	Epinoche à 3 épines	<i>3-spined stickleback</i>
<i>Gila elegans</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme		<i>Bonytail chub</i>
<i>Hyalella azteca</i>		Malacostracé	Amphipode	Hyallèle	
<i>Ictalurus nebulosus</i>		Actinoptérygien	Siluriforme	Barbotte Brune	<i>Brown Bullhead</i>
<i>Labeo rohita</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Labéo roho	<i>Roho labeo</i>
<i>Lates calcarifer</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Loup tropical	<i>Barramundi</i>
<i>Lepomis auritus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Crapet rouge	<i>Redbreast sunfish</i>
<i>Lepomis gibbosus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Crapet (perche) soleil	<i>Pumpkinseed</i>
<i>Lepomis macrochirus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Crapet arlequin	<i>Bluegill sunfish</i>
<i>Macrozoarces americanus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Loquette d'Amérique	<i>Ocean pout</i>
<i>Mallotus villosus</i>		Actinoptérygien	Osmériformes	Capelan	<i>Capelin</i>
<i>Melanotaenia nigrans</i>		Actinoptérygien	Athériniforme		<i>Redtailed rainbowfish</i>
<i>Melanotaenia splendida</i>		Actinoptérygien	Athériniforme		<i>Chequered rainbowfish</i>
<i>Merluccius merluccius</i>		Actinoptérygien	Gadiformes	Merlu	<i>European hake</i>
<i>Micropterus salmoides</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Perche truitee	<i>Large mouth black- bass</i>
<i>Mogurnda mogurnda</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Dormeur moucheté	<i>Australian gudgeon</i>
<i>Mullus sp.</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Rouget	
<i>Mytilus edulis</i>		Bivalve	Mytilidé	Moule bleue	<i>Blue mussel</i>
<i>Notropis hudsonius</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Queue à tâche noire	<i>Spottail shiner</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Truite arc-en-ciel	<i>Rainbow trout</i>
<i>Ophiocephalus punctatus</i>		Actinoptérygien	Perciforme		<i>Green snakehead</i>
<i>Pagellus centrodontus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Dorade rose	<i>Red sea bream</i>
<i>Pimephales promelas</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Mené tête-de-boule	<i>Fathead minnow</i>
<i>Petromyzon marinus</i>		Cephalaspidomorphe	Petromyzontiforme	Lamproie marine	<i>Sea lamprey</i>

Espèce citée		Groupe taxonomique		Nom vernaculaire	
		Classe	Ordre	français	anglais
<i>Placopecten magellanicus</i>		Bivalve	Ostréoidés	Pétoncle géant	<i>Giant scallop</i>
<i>Platichthys flesus</i>		Actinoptérygien	Pleuronectiformes	Flet	<i>European flounder</i>
<i>Pleuronectes americanus</i>		Actinoptérygien	Pleuronectiformes	Plie rouge	<i>Winter flounder</i>
<i>Pomatoschistus minutus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Petit gobie de sable	<i>Sand goby</i>
<i>Pseudomugil tenellus</i>		Elasmobranchie	Hétérodontiforme		<i>Delicate blue-eye</i>
<i>Ptychocheilus lucius</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme	Poisson squaw	<i>Colorado squawfish</i>
<i>Salmo alpinus</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Ombre chevalier	<i>Arctic char</i>
<i>Salmo gairdneri</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Truite arc-en-ciel	<i>Rainbow trout</i>
<i>Salmo salar</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Saumon d'Atlantique	<i>Atlantic salmon</i>
<i>Salmo trutta</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Truite commune	<i>Brown trout</i>
<i>Salvelinus alpinus</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Ombre chevalier	<i>Arctic char</i>
<i>Salvelinus fontinalis</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Ombre de fontaine	<i>Brook trout</i>
<i>Salvelinus namaycush</i>		Actinoptérygien	Salmoniforme	Truite de lac	<i>Lake trout</i>
<i>Sparus auratus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Dorade royale	<i>Gilthead bream</i>
<i>Terapon jarbua</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Violon jarbua	<i>Crescent perch</i>
<i>Torpedo californica</i>		Elasmobranches	Torpédiniforme	Torpille	<i>Pacific electric ray</i>
<i>Trichomycterus zonatus</i>		Actinoptérygien	Siluriforme	Poisson-chat	<i>Catfish</i>
<i>Vesunio angasi</i>		Bivalve	Unionoidés		
<i>Xyrauchen texanus</i>		Actinoptérygien	Cypriniforme		<i>Razorback sucker</i>
<i>Zoarces viviparus</i>		Actinoptérygien	Perciforme	Loquette d'Europe	<i>Viviparous eelpout</i>

PUBLICATIONS



Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*?

First experimental results

S. Barillet¹, A. Buet¹, C. Adam¹ and A. Devaux²

¹Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology, IRSN (Institute for Radioprotection and Nuclear Safety), DEI/SECRE/LRE, Cadarache, Bd. 186, BP. 3, 13115 St-Paul-Lez-Durance Cedex, France, e-mail: sabrina.barillet@irsn.fr

²Environnemental Science Laboratory (LSE), ENTPE, 69518 Vaulx en Velin Cedex and INRA, EFPA department, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Abstract. Zebrafish were exposed to different concentrations of waterborne uranium (0, 20, 100 and 500 µg U.L⁻¹) and were sacrificed for blood sampling after different exposure periods (12h, 36h, 72h, 5, 10 and 20 days) in order to assess DNA integrity in erythrocytes, using the comet assay and flow cytometry. Concurrently, uranium bioaccumulation was studied in the remaining tissues to understand the potential genotoxic biomarker responses. Both genotoxic assays revealed significant effect of waterborne uranium on DNA integrity of fish erythrocytes. However, comet assay only succeeded in detecting such an effect after a 20-day exposure whereas flow cytometry analysis showed a uranium concentration effect for any exposure duration. Regarding uranium bioaccumulation, significant effects of both uranium concentration and exposure duration have been highlighted in this experiment.

1. INTRODUCTION

Within the Envirohom research program launched by IRSN in 2001, key advances have been obtained regarding uranium bioaccumulation and underlying mechanisms understanding in various biological models mainly at the individual level. However, considering different scales of biological effects (from early to delayed ones, from low to high level of organization) is crucial to provide ecologically relevant indicators. Organisms counteract stress induced by pollutant exposure through a wide range of physiological responses being both dose and time dependent. Effects at higher hierarchical levels are always preceded by early changes in biological processes, from subtle biochemical disturbances to impaired physiological functions, increased susceptibility to other stresses, reduced life-span.

In regard to chemotoxic and radiotoxic uranium properties, genotoxicity seems to be a relevant endpoint among the subsequent primary subcellular damages. Indeed, uranium is categorized as a heavy metal with a radiotoxic potential, it is the heaviest naturally occurring element and its typical concentration range in surface waters is 3.10⁻² to 2 µg/L [1]. Considering uranium chemical characteristics, as any heavy metal, this radioelement is a potent genotoxic compound *via* the formation of oxidative DNA damages due to the redox chemistry of transition metals and their ability to activate oxygen species in the course of redox reactions [2][3]. In the same way, its radiological properties being characterized by ionising radiations (mainly *via* the emission of α particles) can enhance this free radical production [4]. Thereby there is a need of knowledge of the understanding of U-living organisms interactions to provide useful tools for predicting possible genotoxic effects of environmental uranium exposure.

Fish are useful sentinels to detect environmental hazards, and as efficient and cost-effective model systems they have been selected for mechanistic toxicology and risk assessment studies for many decades. Among them, zebrafish has been preferred as a model organism in various ecotoxicological studies due to numerous advantages. Indeed, zebrafish are easily housed, breed continuously year-round and have short generation times. Furthermore, since their small size minimizes the cost and waste volume for toxicants, more and more studies now use this model organism thus increasing the pool of data available on it [5].

Preliminary experiments were thus carried out on adult zebrafish (*Danio rerio*), to assess early changes induced by uranium exposure *via* the direct route. Animals were exposed to different concentrations of waterborne uranium and were sacrificed for blood sampling after different exposure periods in order to assess DNA integrity of their erythrocytes, using the comet assay and flow cytometry. Concurrently, uranium bioaccumulation was studied in the remaining tissues to understand the potential genotoxic biomarker responses.

2. MATERIALS & METHODS

2.1 Animal maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes weighing 0.2 to 0.6 g were obtained from a local hatchery (Aquasem, France) and acclimatized to laboratory conditions for several days before experiment. During acclimatization and experiment phases, animals were kept at a maximal density of 5 fish/L in 4 tanks filled with 80 L of water. They were daily supplied with standard fish pellets (1% of their body mass per day) and kept at 25°C in artificial water equilibrated by air-bubbling and continuously renewed by means of a flowthrough water system. Ion concentrations in synthetic water were as follows: 6.26 mg/L K⁺, 11.5 mg/L Na⁺, 4.74 mg/L Mg²⁺, 11.6 mg/L Ca²⁺, 32.4 mg/L Cl⁻, 31.0 mg/L NO₃⁻, 9.61 mg/L SO₄²⁻, 0.45 mg/L CO₃²⁻. The pH was regulated at a value of 6.5 by the addition of HCl *via* peristaltic pumps controlled by pH stats (Consort R301, Illkirch, Belgium)

2.2 Chemicals

Uranyl nitrate solution, UO₂(NO₃)₂·6H₂O, was obtained at Fluka (Buchs, Switzerland) and all other reagents of analytical grade were supplied by Sigma Chemicals (St Quentin Fallavier, France).

2.3 Exposure conditions

During the experiment, fish were exposed to four different uranium concentrations in the water (no added U, 20, 100 and 500 µg/L) and were sampled at 12h, 36h, 72h, 5, 10 and 20 days. Thus, fish were equally distributed in each of the four tanks (each one being devoted to a given uranium concentration) and were then sub-distributed in six different groups per tank, physically separated by wire fences, in order to reduce fish disturbances at every collection time. For every experimental condition, 10 fish were devoted to DNA damage assessments.

2.4 Chemical analyses

Water samples were collected several times a day during acclimatization and exposure periods. In the same way, remaining tissues of fish after blood sampling were acid wet digested in open tubes in order to measure major ion and uranium concentrations in fish. Major anion concentrations were analysed in water samples by ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA) while cation and uranium concentrations were measured after 2% [v/v] HNO₃ acidification by means of inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (limit of uranium detection of 10 nmol/L; Optima 4300DV, Perkin-Elmer, USA).

2.5 Fish blood sampling

At every sampling time, 10 fish per tank were collected in order to perform genotoxic analyses on blood cells. For that, fish were captured and immediately pinned on a dissection board, ventral face upwards. Then, a deep incision was performed just below the opercula to release the cardiac cavity. This incision generally induced a rather significant bleeding, sufficient to take several μL of blood using a micropipette with a pre-heparinized tip. Blood sample was then diluted in 250 μL of a cryoprotective solution (250 mM sucrose, 40 mM sodium citrate, 5% DMSO, pH set to 7.6 with 1 M citrate) and immersed into liquid nitrogen. Fish were then sacrificed (by cutting spinal cord) before being weighed. All biologic samples (blood samples and whole body) were stored at -80°C and analysed within few weeks.

2.6 Genotoxicity assessment

DNA damage level assessed through two different assays, both of them estimating DNA strand breaks.

2.6.1 Comet assay

The comet assay was performed according to the protocol of Devaux *et al.* [6], a slightly modified version of the procedure described by Singh *et al.* [7]. Low melting point agarose was mixed with an equal volume of cell suspension (adjusted to about 1.10^6 cells/mL) and laid on a microscope slide (previously coated with normal agarose). Mixture was then covered with a coverslip in order to be uniformly spread out. After polymerization on a cooled metal tray, the coverslips were removed and a second layer of low melting point agarose was added as previously described. After removal of the coverslips, the slides were placed at 4°C for 1 hr in a freshly prepared lysing solution (15 mL DMSO, 1.5 mL triton X-100, 135 mL of a stock solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, pH set to 10 with NaOH)). From this step to the end of the electrophoresis, the slides were kept in the dark or under dim red light. After the lysis, slides were transferred to an electrophoresis tank filled with freshly prepared buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA). DNA was allowed to unwind for 40 min before starting electrophoresis (20 V, 300 mA, 24 min). Then, the slides were neutralized with a freshly prepared neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) before being dehydrated 10 min in absolute ethanol to be stored at room temperature. For microscopic observations, slides were stained with 50 μL 0.05 mM ethidium bromide solution. DNA damage was quantified as tail length value using Komet 4.0 software.

2.6.2 Flow cytometry

DNA fragmentation assessment with flow cytometry was based on the relaxation of DNA supercoils in presence of strand breaks, involving an increase of nucleoid volume. Measurement of DNA damage was achieved by analysing the forward light scatter signal emitted by nucleoid passage through the laser beam, and detected in a specific cytometer channel referred as FSC. First stage of the procedure consisted in obtaining 300 μL of monodisperse nucleoid suspensions. It was achieved by mixing one-third volumes of cell suspension with a lysing solution (1 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.2% triton X-100, 40 mg/L propidium iodide, pH set to 8.0 with NaOH) as described by Wang *et al.*, [8]. Propidium iodide, a fluorochrome, was included in the lysing solution in order to discriminate nucleoids among the whole of the events detected. The sample tubes were kept in ice to reduce effects of temperature change. During analysis, nucleoid suspensions (obtained after 15 min of lysis) were run at a moderate flow rate. Sample collection time was about 20 s, depending on sample concentration. The data were then analysed with the Lysis II program and the mean FSC was taken as a measure of nucleoid size.

2.7 Statistical analyses

All statistical tests run under Statistica 6.0 software (Statsoft, 2002) were non-parametric ones. First of all, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks were performed ($p < 0.005$) and post-hoc Nemenyi tests were used to perform multiple comparisons.

3. RESULTS

3.1 Uranium bioaccumulation in fish

The evolution of bioaccumulation with both time and uranium waterborne concentration is presented on figure 1.

Statistical analyses revealed that there is a significant effect of uranium concentration on bioaccumulation (Kruskal-Wallis ANOVA p -value < 0.001), bioaccumulation in each group of fish exposed to a given uranium concentration being statistically different from the others (table 1a). Furthermore, time exposure influenced bioaccumulation too (Kruskal-Wallis ANOVA p -value < 0.001), fish sacrificed after 20 days of exposure contained significantly more uranium than those that were sacrificed after a 12- or 36-hour exposure (table 1b).

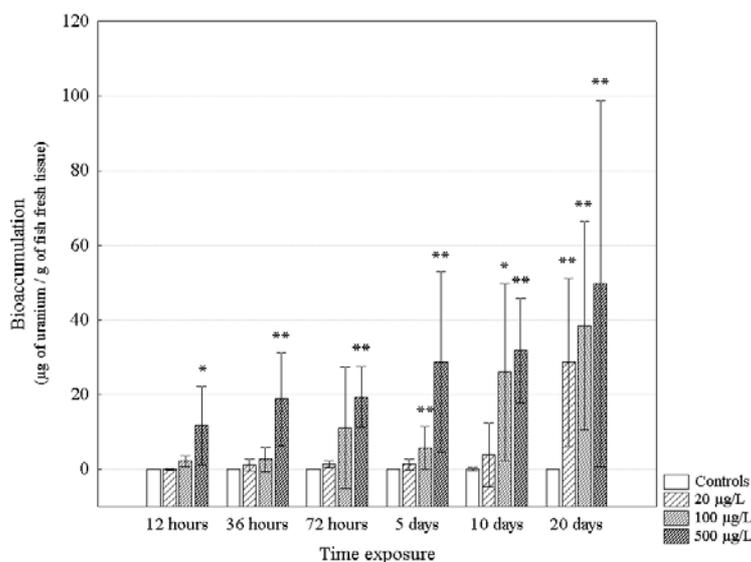


Figure 1. Uranium bioaccumulation in fish (columns and vertical bars denote mean \pm standard deviation, * and ** denote statistical differences with the control group at the same sampling time, p -values being respectively lower than 0.05 and 0.001).

Table 1. Statistical results of Nemenyi tests (* indicate p -values < 0.05 and ** indicate p -values < 0.001).
a. Data corresponding to all sampling times were pooled. **b.** Data corresponding to all U concentrations were pooled.

a.	Controls	20 µg/L	100 µg/L	500 µg/L
Controls		**	**	**
20 µg/L	**		*	**
100 µg/L	**	*		*
500 µg/L	**	**	*	

b.	12 hours	36 hours	72 hours	5 days	10 days	20 days
12 hours		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
36 hours	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	*
72 hours	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
5 days	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
10 days	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.
20 days	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	

3.2 Genotoxicity assessment

3.2.1 Comet assay

Considering complete dataset obtained through comet assay analyses, neither significant effect of uranium concentration nor time exposure can be evidenced (Kruskal-Wallis ANOVAs p-values > 0.05). However, some statistically relevant results appear when we focus on results obtained after a 20-day exposure period (figure 2). Indeed, after 20 days, DNA integrity of erythrocytes removed from fish exposed to 100 and 500 µg/L of uranium is significantly lower than DNA integrity in control fish erythrocytes (post-hoc Nemenyi tests p-values respectively lower than 0.05 and 0.001), thus revealing a significant effect of uranium exposure (Kruskal-Wallis ANOVA p-value < 0.001).

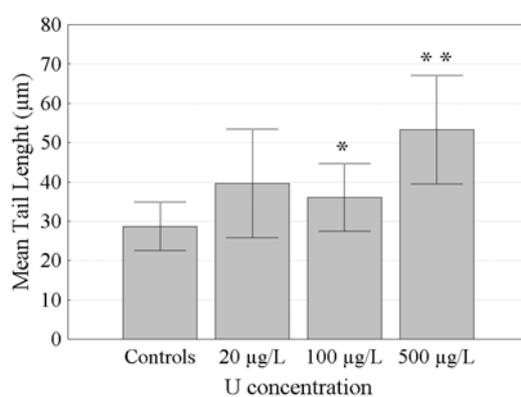


Figure 2. DNA damage assessed by comet assay in erythrocytes of fish exposed to various uranium concentrations for 20 days (columns and vertical bars denote mean \pm standard deviation, * and ** denote statistical differences with the control, p-values being respectively lower than 0.05 and 0.001).

3.2.2 Flow cytometry

DNA damage assessment by flow cytometry reveals, for all sampling times, a general trend of mean FSC increase along uranium concentrations (i.e. there is a significant effect of uranium concentration on DNA damage, Kruskal-Wallis ANOVA p-value = 0.000) as illustrated, for example, for a 20 day-exposure (figure 3).

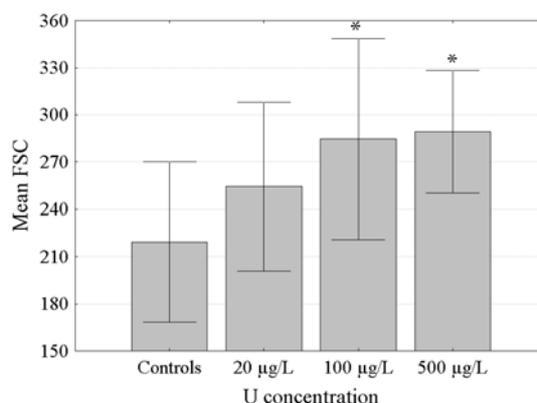


Figure 3. DNA damage assessed by flow cytometry in erythrocytes of fish exposed to various uranium concentrations for 20 days (columns and vertical bars denote mean \pm standard deviation, * denote statistical differences with the control, p-values being lower than 0.05).

4. DISCUSSION

Present investigation firstly provides information regarding the accumulation of uranium in zebrafish. Indeed, a significant uranium bioaccumulation in zebrafish at the body level was revealed from the very beginning of the experiment (as soon as after 12 hours at 500 μ g/L uranium, as soon as after 5 days at 100 μ g/L uranium and after 20 days at 20 μ g/L uranium). Though they are not as informative as results obtained from thorough studies on uranium distribution at the fish tissular level [9], these measurements of whole-body contaminant residues are very informative. Moreover, concurrent follow-up of biomarkers carried out in this experiment allows to estimate toxicological significance of this uranium accumulation.

Indeed, biomarkers are used as early warning pollution monitoring tools to signal the onset of sublethal deleterious effects at the physiological, molecular, cellular or subcellular level therefore being able to provide evidence for changes at higher levels of the biological organisation. In this experiment, the loss of DNA integrity has been chosen as an uranium toxicity biomarker due to chemical and radiological properties of this radioactive element. Thus, DNA damage assessment was carried out on fish erythrocytes by comet assay and flow cytometry, both techniques estimating DNA fragmentation level (DNA strand breaks).

Results obtained by both techniques showed that uranium exposure via the direct route appears to induce genotoxicity in erythrocytes of fish exposed to uranium-contaminated water. Among experiments focused on uranium toxicity evaluation, Yazzie *et al.* [3] also demonstrated uranium-induced genotoxicity (*via an in vitro* experiment carried out on plasmid DNA). These authors hypothesized that hexavalent uranium, as uranyl ion, may have a chemical genotoxicity similar to that of hexavalent chromium (a known human carcinogen), since there are some parallels between their chemistry. They concluded that there are two possible molecular mechanisms that could result in a uranium chemically induced strand breaks: indirectly by free radical generation (Fenton type chemistry) or through direct interactions. In the case of free radical mechanism, catalytic cycling of uranium between hexavalent and tetravalent uranium may induce H₂O₂ liberation. Reaction of H₂O₂ with tetravalent uranium may then generate a DNA-damaging hydroxyl radical. On the other hand, a direct interaction for uranyl cation and DNA can be explained by a uranyl-complex that may interact with the negatively charged DNA phosphate backbone, resulting in DNA hydrolysis. Others authors [10] focused their *in vitro* experiments on uranium-catalyzed oxidative DNA damages. They confirmed that uranium might cause DNA damage through the oxidative pathway, uranium acting as a catalyst of biochemical reactions yielding reactive oxygen species. Furthermore, uranium can mimic Fe in the Fenton reaction so that chemically generated OH \cdot are significantly greater than radioactively generated OH \cdot .

Irrelevant to these mechanistic considerations that cannot be discussed as regards our *in vivo* results, we can nevertheless try to draw a parallel between bioaccumulation and genotoxicity of uranium. Indeed, we can notice that DNA damages were only detected in erythrocytes of fish that accumulated significant amounts of uranium in their tissues.

5. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Considering results obtained through this short-term experiment, we can conclude that aqueous uranium exposure did induce early changes in zebrafish. First of all, uranium can be accumulated in relatively large amounts (from 50 to 100 μ g/g of fresh tissues). Moreover, for high level of exposure concentrations, DNA damage biomarkers revealed a statistically significant genotoxic effect of uranium in erythrocytes. However, it would be of large interest to estimate genotoxic potential of uranium towards organs supposed to be more specific targets than blood tissue. Gills and liver have been selected as such key organs, respectively with regard to exposure route and chemical properties of uranium. Thereby, fish concerned by blood sampling have also been dissected, gill and liver tissues being removed and stocked at - 80°C in a cryopreservative solution. Genotoxicity analyses are still in progress.

Furthermore, genotoxic properties of uranium being linked to its ability to generate reactive oxygen species, specific biomarker responses should be investigated. That is the reason why, concurrently to the experiment previously described, 400 other fish have been sampled for the study of oxidative stress biomarkers. Two kinds of biomarkers were chosen (i) enzymatic antioxidants (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, which belong to the cellular antioxidant system that counteracts the toxicity of reactive oxygen species) and (ii) a non-enzymatic antioxidant (glutathione). Fish have been dissected, gill and liver tissue being removed and S9 fractions prepared in a specific cryopreservative solution and stocked at -80°C . These analyses, still in progress, will probably provide additional information to better understand the toxicity of uranium.

Finally, uranium as every heavy metal is suspected to be a neurotoxic compound, brain collections have thus been realized and S9 preparations stocked at -80°C , in order to later analyse the activity of acetylcholinesterase, an enzyme playing a role in neurotransmission.

References

- [1] Bleise A., Danesi P.R. and Burkart W., *J Environ Radioactiv* **64** (2003) 93-112.
- [2] Hartwig A., *Biometals* **8** (1995) 3-11.
- [3] Yazzie M., Gamble S.L., Civitello E.R. and Stearns D.M., *Chem Res Toxicol* **16** (2003) 524-530.
- [4] Jones D., Domotor, S., Higley K., Kocher D. and Bilyard G., *J Environ Radioactiv* **66** (2003) 19-39.
- [5] Spitsbergen J.M. and Kent M.L., *Toxicol Pathol* **31** (2003) 62-87.
- [6] Devaux A., Pesonen M. and Monod G., *Toxicol In Vitro* **11** (1997) 71-79.
- [7] Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., *Exp Cell Res* **175** (1988) 184-191.
- [8] Wang J., Hyun W., Lmborn K. and Deen D.F., *Cancer Res* **56** (1996) 154-157.
- [9] Cooley H.M., Klaverkamp J.F., *Aquat Toxicol* **48** (2000) 477-494.
- [10] Miller A.C., Stewart M., Brooks K., Shi L. and Page N., *J Inorg Biochem* **91** (2002) 246-252.

BIOACCUMULATION, OXIDATIVE STRESS, AND NEUROTOXICITY IN *DANIO RERIO* EXPOSED TO DIFFERENT ISOTOPIC COMPOSITIONS OF URANIUM

SABRINA BARILLET,*† CHRISTELLE ADAM,† OLIVIER PALLUEL,‡ and ALAIN DEVAUX§||

†Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology, IRSN (Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety), Cadarache, Building 186, BP 3, 13115 St-Paul-Lez-Durance cedex, France

‡Ecotoxicological Risk Assessment Unit, INERIS (National Institute for Industrial Environment and Risks), Parc technologique ALATA, 60 550 Verneuil-en-Halatte, France

§Environmental Science Laboratory, ENTPE (National School of Civil Engineering), 69518, Vaulx-en-Velin cedex, France
||INRA (National Institute for Agronomic Research), EFPA (Department for Forest, Grassland, and Freshwater Ecology), 54280, Champenoux, France

(Received 17 May 2006; Accepted 28 September 2006)

Abstract—Experiments were carried out on adult male zebrafish (*Danio rerio*) to assess early changes induced by waterborne exposure to different isotopic compositions of uranium (depleted uranium associated or not with ²³⁵U). Oxidative stress and neurotoxicity were selected as effect endpoints to characterize uranium chemo- and radiotoxicity. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase activities and total glutathione content of hepatic extracts, as well as brain acetylcholinesterase activity and uranium bioaccumulation, were measured. Oxidative stress induced by uranium exposure led to decreases in superoxide dismutase and catalase activity levels as well as total glutathione content in liver extracts. These perturbations were significantly more marked in ²³⁵U-exposed fish. Furthermore, significant increase in acetylcholinesterase activity was observed in brain extracts at the same level, whatever the isotopic composition of uranium.

Keywords—*Danio rerio* Uranium Bioaccumulation Oxidative stress Neurotoxicity

INTRODUCTION

Uranium is the heaviest of all the naturally occurring elements. It is ubiquitous throughout the natural environment, being found in varying but small amounts in rocks (e.g., 3–10 mg/kg in the earth's crust), soil, water, air, plants, animals, and human beings [1]. This metal essentially exists in the U(+IV) or U(+VI) oxidation state in water systems depending on their reduction–oxidation potential, U(+VI) being dominant in oxic surface waters. The U(+VI) state is highly soluble, unlike U(+IV), which is soluble to a much lesser extent [2]. Uranium is found in surface water as well as groundwater at an extremely wide range of concentrations from below 0.01 µg/L to more than 1,500 µg/L [3].

Various anthropogenic activities involving the processing or use of materials rich in uranium have the potential to remobilize radionuclides and heavy metals and make them available in the environment, hence altering the natural abundance of uranium in environmental compartments. These activities include the use of phosphate fertilizers, various mining activities, and the industrial processing of uranium for the manufacture of nuclear fuel and other products, including the use of depleted uranium (DU) as a reinforcing material [4].

Natural uranium consists of a mixture of three isotopes (²³⁸U, ²³⁵U, and ²³⁴U) that all emit alpha particles. Because of their relatively large size and charge, alpha particles rapidly lose their kinetic energy and have a low penetrating power (~4 cm in air and only 50 µm in soft tissue). Therefore, they are unable to penetrate even the superficial layer of organisms. As a result, from a radiologic standpoint, uranium is mainly an internal radiation hazard [1].

Uranium toxicity has not been studied extensively for non-human biota, particularly for aquatic vertebrates such as fish. Current knowledge of uranium toxicology in fish is generally limited to acute lethality data from waterborne exposure [5–8]. Information regarding early and sublethal effects of uranium exposure in freshwater fish is scarce [9–12]. Better knowledge of interactions between U and living organisms at environmentally relevant concentrations is therefore needed to predict the possible consequences of uranium exposure.

Among the indicators of primary subcellular damage potentially induced by the chemical and radiological properties of uranium, measurements of oxidative stress seem to be a relevant endpoint. Indeed, like any heavy metal, this radioelement is able to chemically activate oxygen species in the course of redox reactions via the redox chemistry of transition metals [13,14]. Furthermore, uranium can enhance the production of free radicals via the ionization phenomenon induced by alpha particle emissions [15]. The damage, in this case, would not be the direct result of radiation, but rather an indirect consequence as a result of reactive oxygen species stemming from the radiation [16]. When the quantity of free oxygen species generated exceeds the level that the cell's protective system can control, cell proteins, nucleic acids, and lipids can be damaged. Several studies were carried out considering oxidative stress markers in various biological models exposed to uranium, but none of them attempted to understand the respective role of chemotoxicity and radiotoxicity [9–12,16–18].

In addition, recent data have linked DU exposure to neurotoxic effects [9,17,19–21]. However, uranium exposure scenarios reported in the literature demonstrated either inhibiting [9] or activating [17] effects of uranium on acetylcholinesterase (AChE) activity. Because of the conflicting conclusions

* To whom correspondence may be addressed (sabrina.barillet@irsn.fr).

drawn from these studies, it remains impossible to identify the biological mechanisms involved in the effects of uranium exposure on neurophysiological and neurocognitive processes. Nevertheless, it is generally assumed that uranium can cross the blood–brain barrier and could accumulate in the brain [19]. It therefore seems essential to have a better understanding of the neurophysiological consequences of uranium exposure.

Moreover, little information can be found on uranium accumulation in tissues of freshwater fish exposed under controlled laboratory conditions other than rare data for whole-body concentrations achieved via aqueous exposure [5] or the more complete work of Cooley and Klaverkamp [22], who investigated the accumulation and distribution of uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Nevertheless, thorough studies of uranium accumulation are required to assess its bioavailability in fish, as well as its specific target tissues.

In this study, we undertook to examine the relationship between toxic effects of uranium and its accumulation and distribution in adult male zebrafish (*Danio rerio*) after a 20-d exposure period via the direct route. Fish were exposed to similar mass concentrations of waterborne uranium, but with different isotopic compositions of waterborne uranium to distinguish the radiologically from the chemically induced effects of uranium exposure. Depleted uranium and ^{233}U were selected to make up the contamination sources used in this study because they exhibit very different specific activities (1.44×10^4 and 3.57×10^8 Bq/g, respectively). Treatments consisted of exposure to DU with or without ^{233}U . Hence, chemical toxicity was approached considering the fish exposed solely to DU (with a very low radiologic dose delivered), whereas fish exposure to both DU and ^{233}U allowed us to examine the biological consequences of a radiological dose enhanced by a factor of 1,500 while keeping the uranium molar concentration constant.

Liver and brain samples were then collected after varying exposure periods to assess different biological parameters (biomarkers of oxidative stress and of neurotoxicity). Uranium bioaccumulation and distribution were also studied in parallel.

MATERIALS AND METHODS

Animal maintenance

Adult male zebrafish of 3.6 ± 0.2 cm in length, weighing 0.345 ± 0.045 g, were obtained from a French hatchery (HB Developpement, Saint Forgeux, France) and acclimated to laboratory conditions for two weeks before the experiment. During the acclimation and experimentation phases, animals were kept at a maximum density of five fish/L in tanks filled with 40 L of water. They were given daily supplies of standard fish pellets (1% of their body mass per day) and kept at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ in artificial water equilibrated by air bubbling. Fifty percent of the total water volume was manually changed on a daily basis. Ion concentrations in synthetic water were 6.26 mg/L K^+ , 11.5 mg/L Na^+ , 4.74 mg/L Mg^{2+} , 11.6 mg/L Ca^{2+} , 32.4 mg/L Cl^- , 31.0 mg/L NO_3^- , 9.61 mg/L SO_4^{2-} , and 0.45 mg/L CO_3^{2-} which is assumed to be in equilibrium with the air ($p\text{CO}_2 = 3 \times 10^{-4}$ atm). The pH value was kept at 6.5 ± 0.1 by addition of HCl via peristaltic pumps controlled by automated pH regulators (Consort R301, Illkirch, Belgium).

Chemicals

Depleted uranyl nitrate, $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Uranium-233, as uranyl ni-

trate, was an isotopic reference material obtained at Isotope Products Laboratories Europe (Berlin, Germany). All other reagents of analytical grade were supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except nitric acid, which was obtained from Merck (Paris, France).

Experimental conditions

During the experiment, fish were exposed to two different uranium isotopic compositions in water; both conditions involved a total uranium mass concentration of 100 $\mu\text{g/L}$, an environmentally relevant concentration that can be found in the vicinity of uranium mines. The first treatment consisted of 100 $\mu\text{g/L}$ DU and the second was composed of 93.3 $\mu\text{g/L}$ DU associated with 6.65 $\mu\text{g/L}$ ^{233}U (hereinafter referred as the DU– ^{233}U treatment). Control and exposed fish were sampled at time zero (t_0) and after 3, 10, and 20 d. For each exposure condition (control, DU-exposed, and DU– ^{233}U -exposed fish), fish were equally distributed in four different groups that were physically separated by wire fences to reduce fish stress during collection times. For each sampling time, 40 fish per tank were devoted to biomarker measurements and 10 more were dedicated to bioaccumulation measurements at the whole body level. Bioaccumulation measurements on isolated tissues (liver, testes, gills, brain, muscle, skin and scales, and bones) were carried out on five additional organisms for each condition after 20 d of uranium exposure.

Water sample analyses

Water samples were collected several times a day during the acclimation and exposure periods. Major anion concentrations were analyzed by ionic chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA), whereas major cation concentrations were measured after 2% (v/v) HNO_3 acidification by means of inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP-AES; Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Uranium concentration in water was also monitored by means of ICP-AES (uranium detection limit of 10 $\mu\text{g/L}$) for DU-contaminated water and of alpha liquid scintillation counting (alpha particle detection limit of 0.03 Bq per sample; Quantulus 1220, Wallac Oy, Turku, Finland) for the DU– ^{233}U mixture-contaminated water. For ICP-AES analyses, a five-point calibration was used. Standards were prepared from a 10 mg/L uranium standard solution. Quality control was assured by regularly using separate standard samples. Alpha liquid scintillation counting only required initial calibration with the appropriate standard alpha emitter. Samples were then counted and processed in batch mode. No quenching correction effort was needed.

Removal and tissue processing

At each sampling time, 40 fish per tank were collected to perform analyses on liver and brain extracts. Fish were captured and immediately sacrificed by cutting their spinal cord. Length and weight were measured. Liver and brain tissues obtained after dissection of four organisms were pooled and immersed in an ice-cold cryoprotective solution (glycerol–phosphate buffer supplemented with phenylmethanesulfonyl fluoride) before homogenization, performed on ice, with a Potter-type homogenizer (Eurostar digital, IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Homogenates were then centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 g, and supernatants (S9 fractions) were collected. Biological samples (hepatic and cerebral S9 frac-

tions and the rest of the body tissues) were then stored at -80°C and analyzed within a few weeks.

Uranium analyses in biological samples

Uranium accumulation was determined both at the whole body level and at the tissue level (liver, viscera, testis, gills, brain, muscle, skin and scales, and bone). Digestion was performed in a DigiBLOC 3000 digestion system (SCP Science, Champlain, NY, USA). Tissues were digested in 3 ml of 15 M nitric acid over a 90-min heating cycle at 95°C . Samples were then evaporated to incipient dryness via a second heating cycle (60 min, 105°C). The digestion process was then followed by a last step involving 2 ml H_2O_2 attack and evaporation to incipient dryness (60 min, 105°C). Depending on the biological material (whole organisms or isolated tissues) and uranium exposure conditions (enriched or not with ^{233}U), digested samples were dissolved in various acid solutions. For fish exposed solely to DU, 5 ml of acidified ultrapure water (0.3 M nitric acid) were added to samples obtained after digestion of whole organisms for ICP-AES analyses (uranium detection limit of $10\ \mu\text{g/L}$), whereas samples obtained from the digestion of isolated tissues were dissolved in 5 ml of acidified ultrapure water (1 M nitric acid) for inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis (ICP-MS; Elan-6000, Perkin-Elmer; uranium detection limit of $0.02\ \mu\text{g/L}$). Before ICP-MS sample analyses, calibration of the spectrometer was performed with $10\ \text{mg/L}$ DU and ^{233}U standard solutions. For fish exposed to the DU- ^{233}U mixture, all digested biological samples were dissolved in 1 ml of acidified ultrapure water (0.3 M nitric acid) and 19 ml of a liquid scintillation cocktail (Instagel, Packard Instruments, Rungis, France) for liquid scintillation analysis (alpha particle detection limit of $0.03\ \text{Bq}$ per sample; Quantulus 1220, Wallac Oy).

Quality assurance and quality control procedures performed on all these analyses included daily calibrations with standards; performance checks to control the sensitivity, accuracy, and precision of measurements; and interlaboratory quality control studies.

Data obtained on whole-body organisms were presented as total body burdens of uranium, expressed as the ratio of the mass of uranium measured in fish to the fish wet weight (wet wt). The ability of zebrafish to concentrate uranium was then assessed by calculating bioconcentration factors (ratio of uranium concentration in fish [$\mu\text{g/g}$ wet wt] to uranium concentration in the water [$\mu\text{g/g}$ of water]).

For data obtained on isolated tissues, results were presented as uranium relative concentrations (RCs) in each tissue.

Uranium RC

$$= \frac{\text{mass of U in tissue/tissue wet weight}}{\text{mass of U in whole body/whole body wet weight}}$$

This metric allows detection of heterogeneity in uranium distribution throughout the whole body by means of tissue burden normalization. This mathematical transformation enables discrimination between tissues that can be considered specific sites of uranium concentration ($\text{RC} > 1$) and those that contribute to a lesser extent to the total body burden ($\text{RC} < 1$).

Conversion to radiologic units

Uranium concentrations in the tissues were converted to internal dose rates with EDEN 2 software (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, developed by the French

Table 1. Isotopic lists of uranium isotopes (^{233}U , ^{234}U , ^{235}U , and ^{238}U), their related daughters selected for the source compositions (obtained by Nuclides 2000 software, developed by the Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany), and corresponding dose rate per unit of concentration (DPUC) obtained by EDEN 2 software (Elementary Dose Evaluation for Natural Environment, developed by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety, Cadarache, France)

Depleted uranium isotopic decay		^{233}U decay	
Isotope	DPUC (Gy/d [Bq/g] $^{-1}$)	Isotope	DPUC (Gy/d [Bq/g] $^{-1}$)
^{234}U	6.56×10^{-5}	^{233}U	6.63×10^{-5}
^{230}Th	6.43×10^{-5}	^{229}Th	6.87×10^{-5}
^{226}Ra	6.56×10^{-5}	^{225}Ra	1.25×10^{-6}
^{222}Rn	7.53×10^{-5}	^{225}Ac	7.94×10^{-5}
^{235}U	6.12×10^{-5}	^{221}Fr	8.71×10^{-5}
^{231}Th	1.53×10^{-6}	^{209}Pb	2.37×10^{-6}
^{231}Pa	6.92×10^{-5}	^{213}Bi	5.60×10^{-6}
^{227}Ac	1.12×10^{-6}	^{209}Tl	4.91×10^{-6}
^{238}U	5.78×10^{-5}		
^{234}Th	6.40×10^{-7}		
$^{234\text{m}}\text{Pa}$	4.96×10^{-6}		
^{234}U	6.56×10^{-5}		
^{234}Pa	3.03×10^{-6}		

Institute for Radioprotection and Nuclear Safety, Cadarache, France). This software provides a fast and user-friendly computerized method to calculate the radiological dose (i.e., the energy deposited in the organism) received from any radionuclide by any nonhuman species for a unit of time and a unit of concentration of radionuclide in the radiation source. The calculation principles to determine this metric, called dose rate per unit of concentration (DPUC, Gy/unit of time per Bq/unit of volume or mass), assume three modeling components: the shape and the elementary composition of the model organism and the radioactive source (defined as a combination of radionuclides). Animals were thus supposed to be ellipsoids (3.6 cm long, 0.8 cm high, and 0.4 cm wide). Their tissues were assumed to be composed of hydrogen, carbon, oxygen, and nitrogen, contributing 10.2, 9.5, 77, and 2.3% of the total mass, respectively. The radioactive source, defined as a combination of radionuclides, was composed according to Nuclide 2000 software (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany), a powerful calculation tool for investigating full decay of radionuclides as a function of time. The selected isotopic lists of uranium isotopes (^{233}U , ^{234}U , ^{235}U , and ^{238}U) and their corresponding daughters are presented in Table 1. The obtained dose conversion coefficients (also presented in this table) were then used to convert uranium concentrations ($\mu\text{g/g}$ of fish tissues) to dose rates delivered to fish ($\mu\text{Gy/d}$).

Enzymatic assays

All enzymatic assays were carried out with spectrophotometric microplate techniques developed in collaboration with the Ecotoxicological Risk Assessment Unit of the French National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS).

Before enzymatic assays, the total protein content of liver and brain S9 fractions were measured according to the method described by Bradford [23]. Enzyme activities were then expressed as enzymatic units per total protein content (U/mg total protein).

Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activity levels and total glutathione (TGSH) content were measured as hepatic biomarkers of ox-

Table 2. Nominal and measured concentrations of total uranium and radioactivity in water throughout the experiment. Results are given as mean value \pm standard deviation ($n = 22, 57,$ and 88 for $3, 10,$ and 20 d of exposure, respectively)

Experimental conditions	Nominal value	Measured value		
		3 d	10 d	20 d
Control	($\mu\text{g/L}$)	0	0	0
	(Bq/L)	0	0	0
Depleted uranium	($\mu\text{g/L}$)	100	119 ± 27	107 ± 29
	(Bq/L)	1.5	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.4
Depleted uranium- ^{233}U	($\mu\text{g/L}$)	100	109 ± 15	100 ± 25
	(Bq/L)	2,376	$2,584 \pm 351$	$2,358 \pm 584$

oxidative stress. The SOD activity was measured as an indirect assay in which the scavenger beta-mercaptoethanol competes with endogenous SOD for nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) oxidation by O_2^- . One unit of SOD activity is defined as the amount that causes 50% inhibition of NADH oxidation under specified conditions [24]. Catalase activity was measured by spectrophotometrically monitoring the disappearance of exogenous H_2O_2 [25]. Glutathione peroxidase activity in hepatic extracts was measured by monitoring the disappearance of NADH phosphate during regeneration of the reduced glutathione (GSH) pool in the reaction mixture [26]. Total glutathione content was assessed according to a first-order recycling reaction resulting in the formation of 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid [27].

Enzymatic activities and TGSH content were then expressed as the percent difference from the control group corresponding to the same sampling time. This value is obtained as

$$\% \text{ Difference} = \frac{m_{e t_i} - m_{c t_i}}{m_{c t_i}} \times 100$$

where m_e is the mean activity level in fish from the exposed group, m_c is the mean activity level in fish from the control group, and t_i corresponds to a given sampling time.

Brain AChE activity, a neurotoxicity biomarker, was assessed according to the most widespread method, first described by Ellman et al. [28] on the basis of the hydrolysis of acetylthiocholine. This assay makes use of the thiocholine-mediated cleavage of the chromogenic disulfide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid.

Enzymatic activity was then expressed as the percent difference from the corresponding experimental group corresponding to the first sampling time (t_0). This value is obtained as follows:

$$\% \text{ Difference} = \frac{m_{i t_i} - m_{i t_0}}{m_{i t_0}} \times 100$$

where m_i is the mean activity level in fish from a given experimental group, t_i corresponds to a given sampling time, and t_0 is the sampling time corresponding to brain collection realized just before water contamination.

Statistical analyses

Statistical tests were run with Statistica 6.0 software (Statsoft, Chicago, IL, USA). Because normality assumptions for valid parametric analyses, even after log transformation, were not satisfied (Kolmogorov–Smirnov tests), nonparametric one-way analyses of variance on ranks approach (Kruskal–Wallis) were used. When significance was demonstrated ($p \leq 0.05$), multiple comparisons were run with the use of Mann–Whitney tests adjusted by experiment-wise error rate Bonferroni–Holm corrections.

For bioaccumulation statistical analyses, tests were applied at each collection time to determine the effect of uranium isotopic composition (DU treatment versus DU- ^{233}U treatment). For oxidative stress data, multiple comparisons were focused on the effect of uranium exposure conditions (Kruskal–Wallis test of the effect of exposure duration being non-significant, $p > 0.050$ for SOD, CAT, and GPx activity, as well as for TGSH content) each sampling time was separately considered as well.

On the other hand, post hoc analyses of AChE activity consisted of comparisons of the effect of exposure duration (Kruskal–Wallis test of the effect of uranium isotopic compositions being non-significant, $p > 0.050$), with each uranium exposure condition (control and DU- and DU- ^{233}U -exposed fish) being separately studied.

RESULTS AND DISCUSSION

Uranium in water

The recorded patterns of uranium massic concentration ($\mu\text{g/L}$) and volumic activity (Bq/L) in water clearly demonstrated the difference in contamination between the two conditions studied (Table 2). In the control tank, no uranium was detectable, whichever analytical technique used. Total uranium massic concentration in the tank contaminated solely with DU was not significantly different from the concentration measured in tank contaminated with the DU- ^{233}U mixture. From a chemical point of view, the contamination level in both tanks was similar. However, from a radiological standpoint, the exposure scenarios corresponded to two substantially different experimental conditions, with radiological activity in the water of the tank contaminated with the DU- ^{233}U mixture approximately 1,500 times higher than that of the tank exclusively contaminated with DU.

Uranium in fish tissues

The results from analyses performed at the whole-body level are presented in Figure 1. Within the control group, no uranium was detected in organisms, whereas uranium was found at the whole-body level in all the fish exposed to the radionuclide. Bioaccumulation levels were similar whatever the considered isotopic composition after 10 or 20 d of exposure. Waterborne uranium is thus bioavailable to the same extent to zebrafish whatever the isotopic composition. These results indicate that no isotopic discrimination occurred and are in agreement that the chemical action of all isotopes and isotopic mixtures of uranium are identical and independent of specific activity, the chemical action depending only on chemical properties. The chemical action of different isotopic compositions of uranium is hence expected to be identical [4].

Nevertheless, a significant difference in uranium internal-

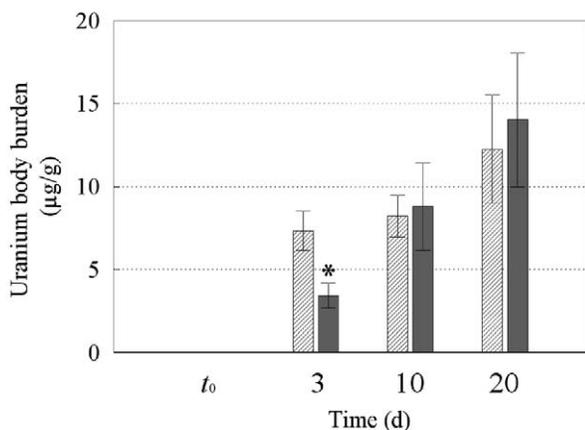


Fig. 1. Accumulation of uranium in the whole body of zebrafish exposed for 3, 10, and 20 d to 100 µg/L of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium-²³³U mixture (gray columns). Data (µg U/g tissue wet weight) are presented as mean ± standard error of the mean ($n = 10$). The asterisk denotes a significant difference between both uranium exposure conditions ($p \leq 0.05$).

ization occurred at day 3, the uranium concentration in fish exposed to the DU-²³³U treatment being half the uranium concentration in fish exposed solely to DU ($p = 0.050$). This could be because of radiologically induced acclimation phenomena or impairments, such as physiological disorders or histological damages, in tissues involved in bioaccumulation mechanisms. To support the hypothesis that uranium entrance into the organism via the gills would be altered (resulting in a decrease in uranium internalization), histological analyses of gill tissues are in progress.

Concentration factors were time dependent and ranged from 31 to 149, as shown in Table 3. Zebrafish were thus able to bioconcentrate uranium isotopes in their tissues (bioaccumulation factors of >1). The corresponding estimated internal dose rates, presented in Table 4, ranged from 7.1 to 22.3 µGy/d for fish exposed solely to DU and from 5.1 to 20.8 mGy/d for fish exposed to the DU-²³³U mixture.

Analysis of uranium in isolated tissues demonstrated that the liver and gills exhibited the highest uranium concentration to be found among the various tissues analyzed, relative concentration factors ranging from 2 to 3 (i.e., uranium is two to three times more concentrated in liver and gills than in other parts of the whole body). These organs thus would represent key organs involved in uranium storage (Fig. 2). This heterogeneous distribution throughout the body could simply reveal the physiological role of organs in uptake and transport of uranium in zebrafish. Although gills represent the main uptake route for waterborne pollutants, they could also serve as an effective barrier to uranium uptake, particularly if uranium is trapped within the protective mucus layer, as previously shown for other divalent metals in fish [29]. When the contamination pressure overcomes the protective capacities of the mucus, the liver could become another key tissue in xenobiotic metabolism once it has entered the body. As highlighted by Cooley et al. [10], the liver plays an important role in uranium detoxification mechanisms. Indeed, these authors drew a parallel between the occurrence of hepatic and biliary histopathologies in lake whitefish exposed to dietary uranium and a possible biliary excretion of uranium that could constitute an important elimination pathway.

To a lesser extent, gonads and bones of fish exposed to the

Table 3. Uranium bioconcentration factors (mean ± standard deviation) calculated for exposed fish and expressed on the wet weight basis ($n = 10$ for each experimental condition)

Experimental conditions	Bioconcentration factor		
	3 d	10 d	20 d
Control	0	0	0
Depleted uranium	62 ± 32	77 ± 37	120 ± 101
Depleted uranium- ²³³ U	31 ± 22	88 ± 84	149 ± 135

DU-²³³U mixture seemed to have a propensity to concentrate uranium. Preferential uranium distribution in bone tissue could be explained by an early distribution of uranium in the skeleton that is similar to that of calcium. Indeed, there is evidence of UO_2^{2+} exchanges with Ca^{2+} at the surface of bone mineral crystals [30]. It is also assumed that, depending on the microscopic bone structure of each species, uranium present on bone surfaces could gradually diffuse into deeper bone tissue. These explanations can be broadened to gill arches which, like all other cartilaginous tissues, are rich in calcium.

Those results are in partial agreement with those published by Cooley and Klaverkamp [22]. These authors investigated the accumulation and distribution of uranium in adult lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) fed on pellets containing 100, 1,000, and 10,000 mg U/g for 10, 30, or 100 d. They observed significant uranium concentrations in the gastrointestinal tract, as well as in bone, scales, liver, kidney, and gonads. According to them, the intestines (from which the contaminated food particles and feces were removed) contained uranium at concentrations one to two orders of magnitude greater than all those in other tissues. Originally in our experimental protocol, measurement of uranium content in the gastrointestinal tract had been planned but was without success because of the difficulty of squeezing out the gastrointestinal tract bolus in a proper manner because of the small size of our biological model. Indeed, even if uranium exposure occurred via the direct route, we cannot exclude the possibility of food contamination because pellets distributed to fish during the experiment were in contact with contaminated water for a certain time.

Uranium concentration in brain tissue was similar to concentrations found in the whole body over the exposure period ($\text{RC} \approx 1$). Hence, the brain cannot be considered a specific site of uranium concentration. However, the presence of uranium in the brain reveals its ability to reach this tissue, which is normally protected against the entrance of xenobiotics by the blood-brain barrier. This means that uranium, like lead and mercury, can cross the blood-brain barrier of fish.

Oxidative stress assessment

Superoxide dismutase hepatic activity generally declined during the experimental period according to a biphasic phenomenon (Fig. 3). Indeed, the observed depletion in activity compared with the control was significant after 3 d in fish exposed to the DU-²³³U treatment ($p = 0.004$) and after 20 d of exposure in fish exposed to uranium, whatever its isotopic composition ($p < 0.001$ for both treatments compared with control). This could be because of a modification of enzyme tertiary structure through a reactive oxygen species (ROS)-mediated oxidation of amino acid side chains, resulting in loss of function, as previously described [31,32]. For the DU-²³³U mixture, the fact that SOD modulation of activity exhibits a

Table 4. Estimated internal dose rates of uranium and its major daughters (mean value \pm standard deviation) in exposed fish ($n = 10$ for each experimental condition)

Experimental conditions	Internal dose rate		
	3 d	10 d	20 d
Control	0	0	0
Depleted uranium ($\mu\text{Gy/d}$)	7.1 ± 3.6	8.1 ± 3.9	22.3 ± 18.8
Depleted uranium- ^{233}U (mGy/d)	5.1 ± 3.5	13.1 ± 12.4	20.8 ± 18.9

bimodal response suggests an early radiologically mediated insult after a few hours, followed by a later chemically mediated effect after 20 d of exposure. The first decrease observed in SOD activity could be the result of cytosolic ROS generation through the action of alpha particles. The temporary overwhelming of hepatic cells with ROS would thus be followed by subsequent ROS scavenging by cellular antioxidant defenses, induction of SOD synthesis, or both because SOD activity returns to levels near those observed in control samples after 10 d of exposure. The second decrease observed in SOD activity could stem from a chemical toxicity mechanism of uranium reaching a threshold concentration after 20 d of exposure. To better understand the potential consequences of a decrease in SOD activity, it is important to stress its role in the cellular antioxidant system. Superoxide dismutases are a group of metalloenzymes that catalyze the conversion of reactive superoxide anions (O_2^-) to produce hydrogen peroxide (H_2O_2), which is normally subsequently dealt with by CAT and GPx activities. Superoxide dismutases are thus considered to play a pivotal antioxidant role. Considering this, the responses observed after 20 d of exposure lead us to suggest that the production of superoxide anions in hepatic cells can no longer be controlled because of the depletion in SOD activity.

Catalase activity demonstrated a significant reduction after day 10 in fish exposed to the DU- ^{233}U mixture compared with

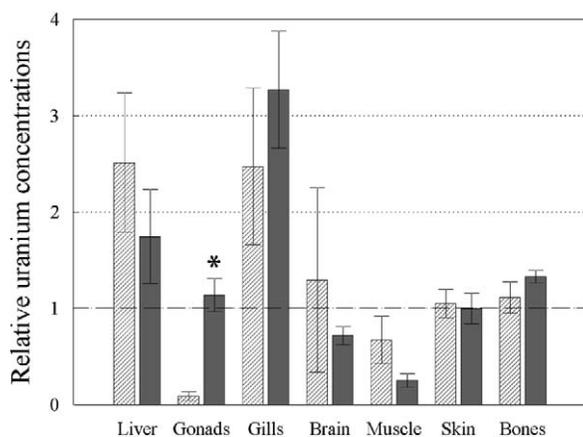


Fig. 2. Relative uranium concentrations in seven tissues from zebrafish exposed for 20 d to $100 \mu\text{g/L}$ of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium- ^{233}U mixture (gray columns). Data ([mass of U in tissue/tissue wet wt]/[mass of U in whole body/whole body wet wt]) are presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). The asterisk denotes a significant difference between both uranium exposure conditions ($p \leq 0.05$). The dashed line indicates the lower limit for an organ to be considered as a specific site of uranium concentration.

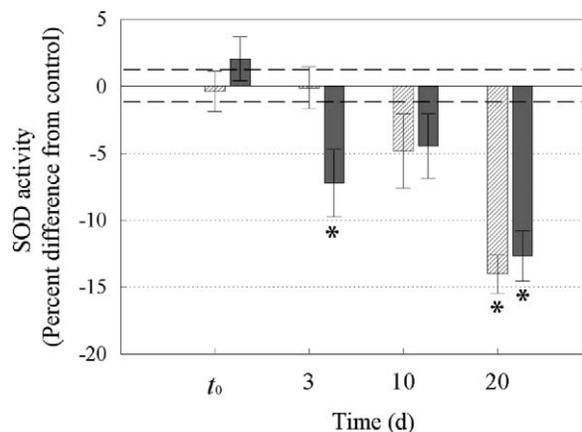


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD) activity in hepatic extracts from zebrafish exposed to $100 \mu\text{g/L}$ of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium- ^{233}U mixture (gray columns). Data are expressed as percent difference from the control group and presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). The solid line indicates the mean control level, and dashed lines indicate the natural variation of the parameter in the control population (standard error of the mean). The asterisk denotes a significant difference from the control group ($p \leq 0.05$).

the control ($p = 0.002$; Fig. 4). Because CATs are heme-containing enzymes that facilitate the transformation of H_2O_2 (the main byproduct of SOD action) in molecular oxygen (O_2) and water, there should be a relationship between the observed decrease in CAT and SOD activities. Indeed, the SOD-mediated removal of O_2^- is linked to an increase in cytosolic H_2O_2 , which normally is subsequently broken down by CAT activity. However, we observed a significant decrease in CAT activity after 10 d of exposure, in parallel with an increase in SOD activity to near control levels, suggesting that mechanisms of action are more complexly related than expected.

In the early hours of the experiment, zebrafish exposed to the DU- ^{233}U mixture showed a significant decrease in hepatic TGSH content compared with both the control ($p < 0.001$) and fish exposed solely to DU ($p = 0.005$; Fig. 5). This var-

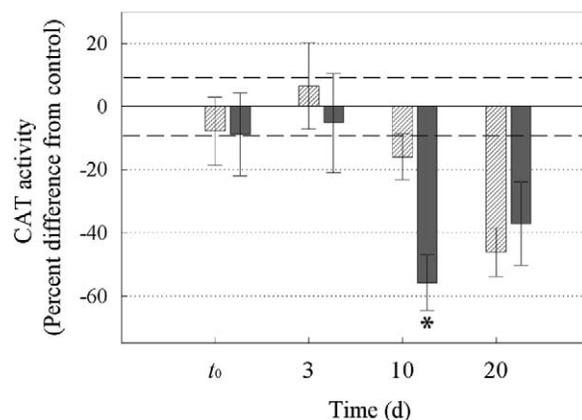


Fig. 4. Catalase activity (CAT) in hepatic extracts from zebrafish exposed to $100 \mu\text{g/L}$ of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium- ^{233}U mixture (gray columns). Data are expressed as percent difference from the control group and presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). The solid line indicates the mean control level, and dashed lines indicate the natural variation of the parameter in the control population (standard error of the mean). The asterisk denotes a significant difference from the control group ($p \leq 0.05$).

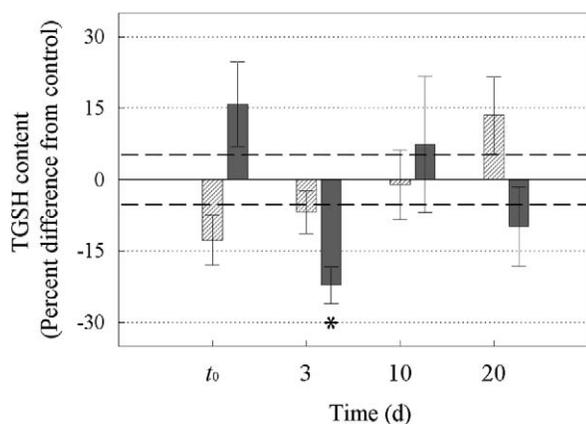


Fig. 5. Total glutathione content (TGSH) in hepatic extracts from zebrafish exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium- ^{233}U mixture (gray columns). Data are expressed as percent difference from the control group and presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). The solid line indicates the mean control level, and dashed lines indicate the natural variation of the parameter in the control population (standard error of the mean). The asterisk denotes a significant difference from the control group ($p \leq 0.05$).

iation in TGSH content might simply reflect a difference in TGSH distribution between tissues [33,34]. Indeed, under oxidative stress, oxidized glutathione (GSSG) has been described as being actively removed from cells when their ability to reduce GSSG to GSH by glutathione reductase is overcome by high cytosolic ROS levels [35,36]. Therefore, it is possible that excess cytosolic GSSG could have been transported to locations other than the liver or could have been turned into an inactive form through the formation of mixed disulfides with proteins. These two possible mechanisms would thus lead to the observed significant reduction in total liver glutathione content.

In addition to directly reducing ROS such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical (HO^\bullet), and superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), GSH also acts as a substrate for GPx in scavenging H_2O_2 [37]. Consequently, depletion of cytosolic TGSH content might not only compromise the pro-oxidant-antioxidant balance through a diminished ability to directly reduce ROS, but also by providing insufficient levels of substrate for the removal of H_2O_2 by GPx, thus explaining the unchanged GPx activity (Fig. 6). Glutathione peroxidase is considered to play an especially important role in protecting membranes from lipid peroxidation, and uranium has already been described as an inducer of peroxidized phospholipids in fish [10]. This reinforces that GPx activity assessments could provide interesting information on uranium biological effects.

These assessments of hepatic oxidative stress biomarkers thus reveal perturbations in the antioxidant system of fish exposed to waterborne uranium. Moreover, these impairments in antioxidant defenses are observed earlier when the uranium isotopic composition has high radiological activity. These results are consistent with the ability of uranium to radiologically enhance free radical production via mechanisms induced by alpha particle emissions [15]. Analogous perturbations can also be chemically induced by uranium exposure, probably depending on uranium massic concentration in fish tissues, through a possible Fenton-type mechanism as previously described in vitro by Yazzie et al. [14].

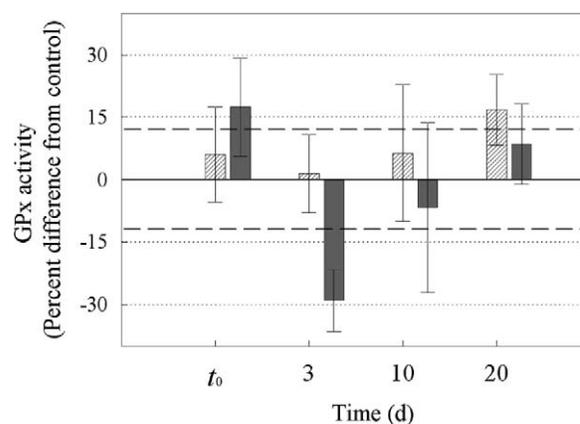


Fig. 6. Glutathione peroxidase (GPx) activity in hepatic extracts from zebrafish exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ of waterborne uranium, either solely as depleted uranium (hatched columns) or as a depleted uranium- ^{233}U mixture (gray columns). Data are expressed as percent difference from the control group and presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). The solid line indicates the mean control level, and dashed lines indicate the natural variation of the parameter in the control population (standard error of the mean). The asterisk denotes a significant difference from the control group ($p \leq 0.05$).

Neurotoxicity assessment

Table 5 shows the level of AChE activity measured in brain extracts of fish after 20 d of exposure to uranium. An increase in AChE activity was induced by waterborne uranium exposure, reaching 30.5 and 36.3% of increase, respectively, for fish exposed solely to DU ($p = 0.004$) and for those exposed to the DU- ^{233}U treatment ($p < 0.001$).

It is crucial to study the effect of uranium treatment on the central nervous cholinergic system because of the central role of AChE and muscarinic receptors in memory and other neurologic functions [17]. Acetylcholinesterase activity generally decreases after metal exposure. Nevertheless, some publications mention activation phenomena, mainly related to chemical toxicity mechanisms. For example, Abou-Donia et al. [17] investigated the delayed effects of intramuscular injection of uranyl acetate on sensorimotor behavior, on generation of nitric oxide, and on the central cholinergic system in rats treated for one week. No significant effect of treatment on AChE activity was observed in any brain region, except the cortex, where a significant increase in AChE activity was observed. The authors suggested that the increased AChE could cause a continuous depletion of acetylcholine at the synapse, leading to defective neural transmission. Additionally, they mentioned

Table 5. Acetylcholinesterase activity in brain extracts from zebrafish (*Danio rerio*) exposed to waterborne uranium. Activity levels for each experimental group are expressed as the percentage compared with the activity measured in fish before tank contamination (t_0). Data are presented as mean \pm standard error of the mean ($n = 10$). Asterisks denote significant differences from the corresponding t_0 activity level (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$)

Experimental conditions	Acetylcholinesterase activity (% relative to t_0)	
	t_0	20 d
Control	100.0 \pm 3.5	115.8 \pm 8.2
Depleted uranium	100.0 \pm 6.8	130.5 \pm 6.3*
Depleted uranium- ^{233}U	100.0 \pm 3.6	136.3 \pm 7.8**

that an increase in AChE content might reflect increased axonal repair and synaptic modeling. Subtle changes in the central nervous cholinergic system could hence have long-term consequences.

Romani et al. [38] looked at possible changes in the AChE activity in brain and white muscle of the Mediterranean bony fish *Sparus auratus* exposed for 20 d to sublethal copper concentrations (100 or 500 nL/L). Copper exposure led to increased specific activity and improved catalytic efficiency of AChE in those tissues. This increase in catalytic efficiency was also observed in vitro with tissue extracts to which Cu^{2+} was added. With regard to the activation effect of ions, other studies pointed out that the conformation of AChE is highly responsive, even to subtle changes in the ionic composition of the medium. In particular, increased ionic strength enhances the hydrolysis of acetylcholine by AChE in the pacific electric ray, *Torpedo californica* [39]. In addition, some studies showed that the influence of ions on AChE conformation might arise from their interaction with the peripheral anionic site of the enzyme. The peripheral site seems to interact with the anionic moiety of the AChE active site involved in the formation of the enzyme-substrate complex. Considering that internalized uranium can reach the brain tissue, free uranyl ions (UO_2^{2+}) can play a role in the ionic composition of the medium and thus interact with AChE, hence improving its catalytic efficiency.

The exact mechanism by which uranium can produce neurotoxicity is thus unclear, and various other hypotheses have been suggested. For example, some authors have found evidence of oxidation of brain lipids in exposed mice and assumed that lipid oxidation might alter ionic conductance, cell membrane fluidity, and other cellular functions [18].

CONCLUSIONS

In this work, we provide additional insights into uranium bioaccumulation and the assessment of radiological and chemical toxicity in fish.

As regards uranium bioaccumulation, although the chemical properties of the different uranium isotopes are identical, it does not necessarily lead to similar bioaccumulated amounts of uranium, as shown after 3 d of exposure in this study. For uranium isotopes with high specific activity (e.g., ^{233}U), the hypothesis of possible structural gill damage because of alpha radiation, leading to alterations in uranium bioaccumulation capacities, will be discussed in another publication (in preparation) focused on histological investigations.

In general, it is difficult to interpret the activity patterns for enzymes involved in oxidative stress and neurotoxic events according to exposure time and uranium isotopic composition. Nevertheless, this study reveals an overall trend, suggesting that radiological insult from uranium occurs earlier than chemical toxicity, leading to depletions in some antioxidant actors (SOD and CAT activity levels as well as in TGSH content) and to an increase in the neurophysiological parameter (AChE activity).

Nevertheless, the issue of distinguishing radiotoxicity and chemotoxicity would also require demonstrating dose dependency. Experiments aiming to better assess the relative contribution of ROSs to the observed effects by measuring the oxidation of DNA bases are in progress and should answer this question of dose dependency investigating different uranium exposure conditions (total concentration and radiological activity).

Acknowledgement—The authors thank B. Romano for providing the fish used in this experiment, V. Camilleri and M. Morello for U analysis, B. Ksas for AChE assay development, F. Zeman for fish sampling, and C. Della-Vedova for statistical support. This work was supported by the EnvirHom research program funded by the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety.

REFERENCES

- Bleise A, Danesi PR, Burkart W. 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *J Environ Radioact* 64:93–112.
- Ervanne H. 2004. Oxidation state analysis of uranium with emphasis on chemical speciation in geological media. PhD thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- World Health Organization. 2001. Depleted uranium, sources, exposure and health effects. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneva, Switzerland.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1999. Toxicological profile for uranium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Poston TM. 1982. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull Environ Contam Toxicol* 28:682–690.
- Holdway DA. 1992. Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish. *Sci Total Environ* 125:137–158.
- Hamilton SJ. 1995. Hazard assessment of inorganics to three endangered fish in the Green River, Utah. *Ecotoxicol Environ Saf* 30:134–142.
- Sheppard SC, Sheppard MI, Gallerand MO, Sanipelli B. 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J Environ Radioact* 79:55–83.
- Labrot F, Ribera D, Saint-Denis M, Narbonne JF. 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1:21–28.
- Cooley HM, Evans RE, Klaverkamp JF. 2000. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48:495–515.
- Buet A, Barillet S, Camilleri V, Garnier-Laplace J. 2005. Alterations of oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure. *Radioprotection* 40:S151–S155.
- Barillet S, Buet A, Adam C, Devaux A. 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40:S175–S181.
- Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. 2002. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: Absence of significant alpha particle decay. *J Inorg Biochem* 91:246–252.
- Yazzie M, Gamble SL, Civitello ER, Stearns DM. 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem Res Toxicol* 16:524–530.
- Jones D, Domotor S, Higley K, Kocher D, Bilyard G. 2003. Principles and issues in radiological ecological risk assessment. *J Environ Radioact* 66:19–39.
- Jelka S, Milica KF, Dragana P, Suncica B, Jovi S, Tatjana B, Marija V. 2005. A study on oxidative stress and peripheral blood parameters of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition. *Acta Vet* 55:269–278.
- Abou-Donia MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Shah DU, Bullman SL, Khan WA. 2002. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:881–890.
- Briner W, Murray J. 2005. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27:135–144.
- Pellmar T, Fuciarelli A, Ejnik J, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz H, Landauer M. 1999. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol Sci* 49:29–39.
- McDiarmid MA, Keogh JP, Hooper FJ, McPhaul K, Squibb K, Kane R, DiPino R, Kabat M, Kaup B, Anderson L. 2000. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf war veterans. *Environ Res* 82:168–180.
- Lestavel P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212:219–226.
- Cooley HM, Klaverkamp JF. 2000. Accumulation and distribution

- of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48:477–494.
23. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
 24. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 154:536–541.
 25. Beers RF, Sizer IW. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133–140.
 26. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169.
 27. Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G. 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: Performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 10:415–421.
 28. Ellman GL, Courtney K, Andres VJR, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.
 29. Coello WF, Khan MA. 1996. Protection against heavy metal toxicity by mucus and scales in fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:319–326.
 30. Leggett RW, Pellmar TC. 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact* 64:205–225.
 31. Levine RL. 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 258:11823–11827.
 32. Charron RA, Fenwick JC, Lean DR, Moon TW. 2000. Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Photochem Photobiol* 72:327–333.
 33. Otto DM, Moon TW. 1995. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol Toxicol* 77:281–287.
 34. Otto DM, Moon TW. 1996. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:141–147.
 35. Srivastava SK, Beutler E. 1969. The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate. *Biochem J* 114:833–837.
 36. Kondo T, Dale GL, Beutler E. 1980. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6359–6362.
 37. DeLeve LD, Kaplowitz N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52:287–305.
 38. Romani R, Antognelli C, Baldracchini F, De Santis A, Isani G, Giovannini E, Rosi G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem-Biol Interact* 145:321–329.
 39. Berman HA, Leonard K. 1990. Ligand exclusion on acetylcholinesterase. *Biochemistry* 29:10640–10649.

RESUME

Ce travail de thèse a visé à étudier les paramètres toxicocinétiques et toxicologiques de l'uranium chez le poisson. Il apparaît que l'uranium est hautement bioaccumulé et bioconcentré par les poissons. Sa répartition, bien que généralisée à l'ensemble de l'organisme, est néanmoins très hétérogène (branchies et foie constituant des sites majeurs d'accumulation). On note une perturbation du système antioxydant hépatique (inhibition des activités SOD, CAT et GPx ; déplétion du GShtot) et du système cholinergique cérébral (inhibition/suractivation de l'AChE). Des atteintes génotoxiques surviennent également au niveau sanguin, hépatique et gonadique. L'activité radiologique de l'uranium influe sur les cinétiques d'apparition de ces perturbations biochimiques, celles-ci apparaissant d'autant plus précocement que l'activité délivrée est importante. Des atteintes histologiques (de différentes natures selon l'activité radiologique mise en jeu) sont également constatées (branchies, muscle).

Mots clés : *Danio rerio*, uranium, toxicité chimique, toxicité radiologique, stress oxydant, neurotoxicité, génotoxicité, histopathologies.

ABSTRACT

This thesis explores the toxicokinetic and toxicologic aspects of uranium in fish. Uranium appears to be highly bioaccumulated and bioconcentrated in fish. It spreads all through the whole organism. Nevertheless, its distribution is heterogeneous (gills and liver being the main sites of accumulation). From a toxicologic point of view, we notice perturbations of the antioxidant system (inhibitions of hepatic SOD, CAT and GPx activities; depletion of total GSH) and of the cholinergic system (inhibition/over-activation of brain AChE). Genotoxic effects also appear in red blood cells, hepatocytes and gonadic cells. The kinetics of these biochemical perturbations depend on the radiological activity of uranium, responses appearing earlier with increasing delivered activity. Histological effects (differing in types depending on delivered radiological activity) are also observed (in gills and muscles).

Key-words : *Danio rerio*, uranium, chemotoxicity, radiotoxicity, oxidative stress, neurotoxicity, genotoxicity, histopathology.