HAL
open science

Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique

Clémentine Poisson Poisson-Moreau de Lizorieux

To cite this version:

Clémentine Poisson Poisson-Moreau de Lizorieux. Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114849 . tel-00950141

HAL Id: tel-00950141

https://theses.hal.science/tel-00950141

Submitted on 21 Feb 2014

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

ANNÉE 2013 - 2014 SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 20/12/2013

par

Clémentine POISSON

Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique

Composition du jury :

Rapporteurs :	Dr. Christelle ADAM-GUILLERMIN (IRSN, Cadarache) Pr. Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT (Université Paris Descartes)
Examinateurs :	Dr. Barbara GOUGET (ANSES, Maisons-Alfort) Pr. Saadia KERDINE-RÖMER (Université Paris-Sud, Chatenay-Malabry) Pr. Victoria LINARES (Université Rovira i Virgili, Reus, Espagne)
Directeur de thèse :	Dr. Isabelle DUBLINEAU (IRSN, Fontenay-Aux-Roses)
Co-directeur de thèse :	Dr. Yann GUEGUEN (IRSN, Fontenay-Aux-Roses)

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale
Service de Radiobiologie et d'épidémiologie, Pôle de Radioprotection de l'Homme
Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
31 avenue de la Division Leclerc
92260 Fontenay-Aux-Roses

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury :

Je remercie Madame le Docteur Christelle Adam-Guillermin et Madame le Professeur Bonnefont-Rousselot qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour le temps accordé à « l'examination » de ce manuscrit.

Je remercie vivement Madame le Professeur Saadia Kerdine-Römer pour son accueil lors de mes passages à l'UMR 996 mais également pour sa présence au sein du jury.

Je remercie Madame le Docteur Barbara Gouget et Madame le Professeur Victoria Linares pour leur présence en tant qu'« examinateurs ».

Je remercie Monsieur le Docteur Patrick Gourmelon et Madame le Docteur Jocelyne Aigueperse ainsi que Monsieur le Docteur Philippe Voisin pour leur accueil respectif au sein du Pôle de Radioprotection de l'Homme et du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie.

Un immense merci au Docteur Isabelle Dublineau pour son accueil au sein du LRTOX mais également pour ses conseils avisés tout au long de ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Yann Guéguen qui m'a encadrée durant ces années à l'IRSN. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour son écoute, sa patience, sa disponibilité, ses conseils quotidiens et la confiance qu'il m'a accordée en me confiant ce sujet de thèse qui a révélé bien des surprises.

Au docteur Jean-Marc Bertho pour ses conseils au quotidien et sa gestion du laboratoire.

Je remercie chaleureusement le docteur Céline Dinocourt pour son soutien constant et nos discussions ainsi que pour son aide dans la dernière ligne droite !
Je remercie également les docteurs Téni Ebrahimian, Chrystelle Ibanez Audrey Legendre, Philippe Lestaevel et, Maâmar Souidi pour leurs encouragements et leurs conseils.

Un immense merci à Christelle Elie, Stéphane Grison, Line Manens et Johanna Stefani pour leur aide technique et leur bonne humeur ! Une mention spéciale pour Johanna et sa précieuse relecture !

Je remercie tout particulièrement Charlotte Bertheau pour sa redoutable efficacité et sa bonne humeur pendant l'année que nous avons partagée ! Je garde un très bon souvenir de ma première expérience d'encadrement : ce n'était pas compliqué finalement !

Merci à Alexandre Ocadiz pour sa précieuse aide sur les expériences sur les souris KO Nrf2 ! Bonne chance en Ecosse !

Mes remerciements s'adressent tout naturellement au Docteur Caroline Rouas qui m'a précédée en thèse : merci pour la motivation que tu m'as transmise ! Tu avais bien raison : trois ans cela passe très vite !!

Merci à l'équipe de choc du LRC- le Docteur Christine Tessier, Géraldine Landon et David Suhard - pour les bonnes manips passées et les beaux résultats obtenus !

Je remercie également les autres doctorants du laboratoire avec lesquelles j'ai eu des looongues discussions (plus ou moins scientifiques) et ai partagés de très bons moments !

Merci Nicholas pour ton humour et le bon congrès passé ensemble

Clélia, tu es ma coloc attitrée pour les congrès et autres journées des thèses (même si à Giens, j'ai préféré mon ordi☺) Merci pour ta joie de vivre et ton entrain ! Bonne fin de thèse et longue vie à l'ADI[N] !

Marie, ou plutôt chère consoeur, nos discussions matinales sur le bus et l'encombrement des routes me manqueront ! Merci pour ta présence et tes judicieuses remarques !

Stefania, j'ai été ravie de partager ce bureau avec toi ! Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et pour nos discussions diverses et variées !

Merci à Mister Brice Saint-Marc pour ses blagues et sa gentillesse quelque peu éprouvée au milieu de toutes ces thésardes !

A tous les stagiaires croisés au LRTOX : Audrey, Cécile C, Cécile D, Fatou, Fanny, Louison, Nour, Ouarda, Patricia, Sylvie mais aussi Yohann et Marième…Merci pour les bons moments passés ensemble !

Mes remerciements s'adressent également aux (ex-)doctorants extra-LRTOX croisés à l'IRSN : Raphaëlle Bessout, Jean-Victor Lacave-Lapalun, Christelle Durand (merci pour ton soutien et bon courage pour la suite !! Yes, we can !), Zakaria Mana, Alexis Jinaphanh, Fabien Panza.
Merci également à Lara Moussa pour son aide ainsi qu'à Franck Gonzalez pour nos pauses déjeuner riches en discussion et à Chloé Connan pour notre duo de choc lors des formations doctorales !

Un immense merci à Marie de Bourayne, Marie-Hélène Damiens et Zeina El Ali, pour leur aide technique et leur accueil lors de mes manips à l'UMR 996.

Une mention toute spéciale pour Anaïs : merci pour ces bons moments passés ensemble depuis mon arrivée en M2 !

Je remercie du fond du cœur mes parents qui depuis 27 ans sont là pour moi et qui m'ont toujours soutenue. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amour et de ma reconnaissance.

Un immense merci à mes frères pour leur présence, leur humour et leurs conseils ! Je remercie également leurs (future) femmes pour la présence féminine qu'elles apportent au sein de notre famille. C'est top !

Je remercie mes filleuls, Benoît et Léopold, pour la joie qu'ils m'apportent !
Merci à mon parrain et ma marraine d'être là pour moi !

Je remercie tous mes amis de Paris ou d'ailleurs qui sans toujours bien comprendre ce que je faisais de mes journées avec mes petits rats et petites souris ont su (et savent) être présents.

Enfin, je ne pourrais clore cette partie sans remercier du fond du cœur Aldric pour sa présence, son soutien et la joie qu'il m'apporte au quotidien depuis le 27 avril ! Merci pour ta patience durant ce dernier mois !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 5

SOMMAIRE 11

LISTE DES FIGURES 31

LISTE DES TABLEAUX 39

ABREVIATIONS 43

RESUME 47

AVANT-PROPOS 51

INTRODUCTION 57

I. L'Uranium 59

A. Définition 59

1. Historique 59

2. Propriétés physico-chimiques 61

3. Propriétés radiologiques 61

4. Métrologie 63

B. Origine 63

1. Gisement et exploitation 63

2. Le cycle du nucléaire 65

C. Utilisations 67

D. Situations d'exposition 67

E. Biocinétique dans l'organisme 69

1. Absorption 69

2. Distribution 71

3. Métabolisme 71

4. Elimination 73

F. Effets biologiques de l'uranium 73

1. Le rein 77

a. Toxicité aiguë 77

b. Exposition chronique 79

c. Données épidémiologiques 81

2. L'os 83
a. Toxicité aiguë 83
b. Exposition chronique 83
c. Données épidémiologiques 85
3. Le foie 85
a. Accumulation 85
b. Toxicité aiguë 85
c. Exposition chronique 87
4. Le système nerveux central 89
a. Effets sur le comportement 89
b. Effets sur les neurotransmetteurs 91
c. Etudes épidémiologiques 91
5. Système reproducteur et développement 91
6. Les poumons 95
7. Autres organes 95
a. L'intestin 95
b. La peau 97
c. Le système cardio-vasculaire 97
G. Mécanismes de toxicité de l'uranium 99
1. Mort cellulaire 99
2. Apoptose 101
3. Génotoxicité 103
4. L'équilibre pro/anti-oxydant 105
a. Exposition aiguë 105
b. Exposition chronique 107
c. Autres espèces 107
d. Etudes *in vitro* 109
5. Localisation de l'uranium 111
6. Transport de l'uranium 113

II. Le système pro/anti-oxydant 115
A. Le stress oxydant 115
1. Définition 115
a. Les espèces réactives 117
a.1 Les espèces réactives de l'oxygène 117
✷ Origines 117
✷ Rôles physiologiques 119
a.2 Espèces réactives de l'azote 121
✷ Origines 121
✷ Rôles physiologiques 121
b. Cibles biologiques 121
b.1 Acides nucléiques 121
b.2 Protéines et acides aminés 123
b.3 Lipides 125
B. Les anti-oxydants 127
1. Définition 127
2. Anti-oxydants endogènes enzymatiques 127
a. La catalase 127
b. Les Superoxydes Dismutases 129
b.1 Cuivre, Zinc superoxyde dismutase (Cu, Zn SOD ou SOD1) 129
b.2 Manganèse superoxyde dismutase (Mn SOD ou SOD2) 129
b.3 Superoxyde à cuivre et à zinc extracellulaire (SOD3) 131
c. La Glutathion Peroxydase 131
d. L'Hème Oxygénase-1 133
e. La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1 133
f. Les thioredoxines 133
g. Glutaredoxines 135
3. Anti-oxydants endogènes non enzymatiques 135
a.1 Le Glutathion 135
✷ Structure et fonctions du glutathion 135
✷ Synthèse du glutathion 137
i. La gamma-Glutamyl Cystéine Synthétase 137
ii. La glutathion synthétase 139
✷ La Glutathion Reductase (GR) 139

✷ La gamma Glutamyl Transpeptidase 139
✷ La Glutathion-S-Transférase (GST) 141
b. L'acide urique 141
c. Le coenzyme Q 141
4. Signalisation cellulaire et stress oxydant 143
a. Nrf2 143
a.1 Structure de Nrf2 143
a.2 Activation de Nrf2 143
a.3 Mécanismes régulés par Nrf2 : exemple du système anti-oxydant 145
a.4 Rôle du complexe Keap 1-Nrf2 dans les pathologies 145
b. Autres facteurs de transcription 147
b.1 Nuclear Factor-κB (NF-κB) 147
b.2 Activated Protein-1 (AP-1) 147
b.3 p53 147
5. Les anti-oxydants «naturels » 149
a. Les vitamines 149
a.1 La vitamine A 149
a.2 La vitamine C 149
a.3 La vitamine E 151
b. Les oligo-éléments 151
b.1 Le Cuivre 151
b.2 Le Sélénium 151
b.3 Le Zinc 153
c. Les polyphénols 153
C. Conséquences physiopathologiques 155
1. Théorie radicalaire du vieillissement 155
2. Pathologies chroniques liées à un excès d'EROs 157
a. Le diabète de type II 157
b. L'athérosclérose 157
3. Toxicité liée à une exposition environnementale 159
4. Les anti-oxydants : une nouvelle classe thérapeutique ? 161
a. Anti-oxydants « naturels » 161
b. Les facteurs de transcription : exemple de Nrf2 161
PROBLEMATIQUE 165

MATERIELS & METHODES 171
I. Matériels 173
A. Modèles animaux 173
1. Modèle Rat 173
2. Modèle Souris transgénique invalidée pour le facteur de transcription Nrf2 173
B. Modèle cellulaire : cellules hépatiques HepG2 175
C. Préparations des solutions 175
1. Uranium appauvri 175
a. Contamination des animaux 175
b. Contamination cellulaire 177
2. Uranium naturel 177
3. Solutions de culture cellulaire 177
a. Préparation du milieu de culture 177
b. Substances pro ou anti-oxydantes 179
b.1 Sulforaphane 179
b.2 Cadmium 179
b.3 Peroxyde d'hydrogène 179
c. Solution de DiHydroEthidium (DHE) 179
II. Méthodes 181
A. Modèle expérimentaux 181
1. Contamination animale 181
a. Contamination des rats 181
b. Contamination des souris 183
2. Contamination et traitement des cellules 185
a.1 Analyse de l'expression génique et de la mort cellulaire 185
a.2 Analyse de l'expression protéique de Nrf2 185
a.3 Evaluation de la production d'anions superoxydes 187
a.4 Analyse SIMS 187
a.5 Traitement des cellules 187
✷ Induction d'un stress oxydant 187
✷ Induction de Nrf2 187

B. Analyses post-mortem 189
1. Prélèvement de matériel biologique 189
2. Evaluation de la contamination 191
a. Dosage de l'uranium 191
b. Technique SIMS 191
b.1 Principe 191
b.2 Préparation des échantillons 193
3. Dosage des paramètres biochimiques classiques 193
4. Analyse histologique 193
a. Préparation des échantillons 193
b. Inclusion en paraffine des tissus et coupe histologique 195
c. Déparaffinage et coloration Hématoxyline Eosine Safran 195
d. Lecture histologique des lames 195
5. Quantification de l'expression génique 195
a. Extraction des ARN messagers tissulaires 195
b. Reverse-transcription (RT) 197
c. Réaction de polymérisation en chaine en temps réel 199
6. Analyse du stress oxydant 201
a. Dosage de la peroxydation lipidique 201
b. Préparation des échantillons et mesure de la concentration protéique 203
c. Mesure du Glutathion (GSH et GSSG) 203
d. Dosage des activités enzymatiques : GR, GPx, GST 205
d.1 Glutathion Peroxydase 205
d.2 Glutathion Reductase 205
d.3 Glutathion-S-Transférase 205
7. Dosages ELISA et EIA 205
a. KIM-1 205
b. Clusterine 207
c. GSTa-1 207
d. Thromboxane B2 207
e. Vitamine D 207

C. Techniques d'analyse *in vitro* 209
1. Culture cellulaire 209
a. Mise en culture 209
b. Préparation du milieu 209
c. Entretien des lignées 211
d. Traitement des cellules 211
2. Dosage et localisation de l'uranium 211
a. Préparation des échantillons 211
b. Analyse SIMS 213
3. Test de cytotoxicité : mesure de la LDH 213
4. Evaluation du stress cellulaire 213
a. Extraction d'ARN messagers cellulaires et PCR 213
b. Mesure de l'activité des Caspases 3/7 215
c. Evaluation de la production d'anion superoxyde par le marquage au DHE 215
5. Analyse de l'expression protéique de Nrf2 217
a. Extraction et dosage des protéines totales 217
b. Western Blot 217
D. Analyse statistique 219
RESULTATS 221
I. Etude des effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système anti-oxydant chez le rat selon un protocole « effet-dose » 223
A. Contexte 223
B. Résultats 225
1. Suivi longitudinal 225
a. Poids 225
b. Consommation hydrique 225
2. Distribution de l'uranium 227
a. Quantification de l'uranium 227
b. Distribution de l'uranium 229
3. Analyse biochimique 229
a. Plasmatique et urinaire 229
a.1 Paramètres plasmatiques 231
a.2 Paramètres urinaires 233

b. Biomarqueurs de néphrotoxicité 235
b.1 KIM-1 235
b.2 GSTa1 et Clusterine 235
b.3 Thromboxane B2 237
b.4 Vitamine D 237
4. Analyses histologiques 237
5. Système pro/anti-oxydant 239
a. Dosage de la peroxydation lipidique 239
a.1 Mesure dans le plasma après 3 et 9 mois de contamination par l'uranium 239
a.2 Mesure dans le foie et les reins après 9 mois de contamination par l'uranium 241
b. Expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2 243
b.1 Le foie 243
b.2 Le rein 243
c. Métabolisme du Glutathion 245
c.1 Le foie 245
c.2 Le rein 247
C. Analyses des résultats 249
II. Etude de Nrf2 : Approche *in vivo* 257
A. Contexte 257
B. Résultats 259
1. Suivi longitudinal 259
a. Paramètres urinaires 261
✷ Protéines 261
✷ Sodium 261
✷ Urée 263
✷ Glucose 263
2. Quantification de l'uranium 263
✷ Le foie 265
✷ Le fémur 265
✷ Le rein 265
3. Le système pro/anti-oxydant 267
a. Peroxydation lipidique 267
✷ Plasma 267
✷ Rein 269

b. Enzymes anti-oxydantes 271
b.1 Glutathion Reductase 271
✷ Expression génique 271
✷ Activité enzymatique 273
b.2 Glutathion Peroxydase 275
✷ Expression génique 275
✷ Activité enzymatique 275
b.3 Glutathion-S-Transférase 277
✷ Expression génique 277
✷ Activité enzymatique 279
b.4 Expression génique d'autres enzymes anti-oxydantes 281
C. Analyse des résultats 285
III. Etude des effets de l'uranium sur le système pro/anti-oxydant sur une lignée de cellules hépatiques 293
A. Contexte 293
B. Résultats 295
1. Localisation de l'uranium 295
2. Mort cellulaire 297
a. Mesure de la Lactate Déshydrogénase 297
b. Apoptose 299
b.1 Expression génique de Bax et Bid 299
b.2 Activité des caspases 3/7 301
3. Equilibre pro/anti-oxydant 303
a. Production d'anions superoxydes 303
b. Expression génique des enzymes anti-oxydantes 305
b.1 La catalase 305
b.2 Hème Oxygénase-1 307
b.3 La Manganèse Superoxyde Dismutase 309
b.4 Cu, Zn Superoxyde Dismutase 311
4. Nrf2 313
a.1 Expression génique 313
a.2 Expression protéique 315
C. Analyses des résultats 317

DISCUSSION & PERSPECTIVES 321

I. Comment l'uranium s'accumule-t-il dans les tissus après contamination chronique par eau de boisson ? 325

II. L'uranium induit-il une néphrotoxicité et une hépatotoxicité après exposition chronique ? 341

III. Quel(s) est (sont) le (s) rôle(s) du système pro/anti-oxydant dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium ? 349

CONCLUSION GENERALE 367

VALORISATIONS 375

I. Publications 377

A. Publiées 377

B. En cours de révision ou de rédaction 377

II. Communications 379

A. Affichées 379

B. Orales 381

ANNEXES 383

I. Annexe I : Elucidation of the decomposition pathways of protonated and deprotonated estrone ions: application to the identification of photolysis products. 385

II. Annexe II : Antioxidative status in rat kidney after co-exposure to uranium and gentamicin. 387

III. Annexe III : Chronic Uranium Exposure Dose-Dependently Induces Glutathione in Rats without any Nephrotoxicity. 389

BIBLIOGRAPHIE 391

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents rayonnements ionisants (source : CEA) 60
Figure 2 : Chaînes de désintégration de l'uranium 64
Figure 3 : "Yellow cake" uranium (source: www.areva.com) 66
Figure 4 : Conversion de l'uranium (source : www.areva.com) 66
Figure 5 : Distribution de l'uranium dans l'organisme après ingestion 70
Figure 6 : Schéma du rein et du néphron 76
Figure 7 : Les différents dommages à l'ADN 102
Figure 8 : Localisation cellulaire de l'uranium après exposition à l'uranium (100 µM) de cellules rénales humaine (HEK293) pendant 24 heures (Gueguen *et al.* 2012) 110
Figure 9 : Mécanismes et transporteurs qui seraient perturbés dans le cas d'une néphrotoxicité induite par l'uranium d'après Vicente *et al.* 2010 112
Figure 10 : Régulation de l'homéostasie Redox (d'après Dröge 2002) 114
Figure 11 : Les origines des espèces réactives 116
Figure 12 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Monteil 2004) 120
Figure 13 : Les anti-oxydants 126
Figure 14 : Réaction enzymatique catalysée par l'Hème Oxygénase 1 130
Figure 15 : Le système Thioredoxine (d'après Arner, 2000) 132
Figure 16 : Les réactions impliquant le glutathion (d'après Lu, 2013) 136
Figure 17 : La synthèse du Glutathion 138
Figure 18 : La structure de Nrf2 142
Figure 19 : L'activation de Nrf2 (d'après Pedruzzi 2012) 142
Figure 20 : Rôles de Nrf2 dans les phénomènes d'autophagie (a), d'inflammation (b), du stress du réticulum endoplasmique (c) et de signalisation mitochondriale (d) (d'après Ma 2013) 144
Figure 21 : Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose 148
Figure 22 : Diabète et stress oxydant (modifié d'après (Bonnefont-Rousselot *et al.* 2004) 156
Figure 23 : Le protocole de contamination des rats pendant 3 et 9 mois à différentes concentrations d'uranium 182

Figure 24 : Le protocole de contamination des souris KO Nrf2 et WT à l'uranium pendant 4 mois. 182
Figure 25 : L'extraction des ARN d'après le kit Qiagen® 196
Figure 26 : Principe du dosage du glutathion 202
Figure 27 : Suivi longitudinal des animaux pendant 9 mois de contamination par l'uranium *via* la pesée (A) et la consommation hydrique (B) hebdomadaires 224
Figure 28 : Accumulation d'uranium dans les organes (foie, os et rein) pendant 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium via l'eau de boisson (1,40, 120,400 ou 600 mg/L) 226
Figure 29 : Suivi longitudinal de la quantité d'uranium dans les urines de rat pendant 9 mois de contamination 226
Figure 30 : Observations microscopiques et SIMS de cortex rénal provenant de rats témoins ou de rats contaminés pendant 9 mois à 40 et 120 mg/L d'uranium 228
Figure 31 : Suivi longitudinal urinaire pendant 3 mois de contamination par la mesure de GSTa1 (A) et de la clusterine (B) 234
Figure 32 : Suivi longitudinal urinaire de KIM-1 pendant 3 (A) et 9 (B) mois de contamination 234
Figure 33 : Suivi longitudinal urinaire pendant 9 mois de contamination par la mesure du Thromboxane B2 236
Figure 34 : Mesure plasmatique de la Vitamine D sous ses deux formes inactive 1,25-dihdyroxy (A) - et active -25-hydroxy (B)- après 9 mois de contamination par l'uranium 236
Figure 35 : Microphotographies représentatives du foie (A) et du rein (B) après 9 mois de contamination par l'uranium chez des animaux témoins et contaminés à 600 mg/L. .. 238
Figure 36 : Mesure des TBARS dans le plasma après 3 et 9 mois de contamination par l'uranium 240
Figure 37 : Mesure des TBARS dans le foie (A) et le cortex rénal (B) après 9 mois de contamination par l'uranium 242
Figure 38 : Mesure de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2 dans le foie après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium 244
Figure 39 : Mesure de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2 dans le cortex rénal après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium 246

Figure 40 : Métabolisme du Glutathion dans le foie après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination à l'uranium. 248
Figure 41 : Métabolisme du Glutathion dans le cortex rénal après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination à l'uranium. 250
Figure 42 : Résumé des résultats obtenus après contamination chronique à l'uranium selon un protocole « Effet-dose » chez le rat. 252
Figure 43 Suivi du poids des souris tout au long de la contamination..... 258
Figure 44 : Suivi des paramètres urinaires pendant 4 mois de contamination par l'uranium à 160 mg/L..... 260
Figure 45 : Accumulation d'uranium dans le foie (A), l'os (B) et le rein (C) pendant 4 mois de contamination..... 264
Figure 46 : Mesure des TBARS dans le plasma chez les souris sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$(■) mâles (A) et femelles (B) après 4 mois de contamination par l'uranium 266
Figure 47 : Mesure des TBARS dans le rein chez les souris sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$(■) mâles (A) et femelles (B) après 4 mois de contamination par l'uranium 268
Figure 48 : Expression génique (A) et activité (B) de la Glutathion Reductase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium 270
Figure 49 : Expression génique (A) et Activité(B) de la Glutathion Peroxydase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium 274
Figure 50 : Expression génique (A) et activité(B) de la Glutathion-S-Transférase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium 276
Figure 51 : Mesure de l'expression génique de la HO-1 (A), la catalase (B) et de NQO1 (C) dans le rein après 4 mois de contamination par l'uranium chez les souris mâles et femelles sauvages (■) ou Nrf2 $^{-/-}$ (■) 280
Figure 52 : Mesure de l'expression génique des superoxydes disumutases dans le rein après 4 mois de contamination par l'uranium chez les souris mâles et femelles sauvages (■) ou Nrf2 $^{-/-}$ (■)..... 282
Figure 53 : Résumé des résultats obtenus dans le cas d'une contamination pendant 4 mois à l'uranium chez des souris sauvages et Nrf2$^{-/-}$ 284

Figure 54 : Observations microscopiques et SIMS d'une cellule hépatique après exposition pendant 5 minutes à 50 µM d'uranium avec la mise en évidence d'une forme « soluble » de l'uranium avec localisation préférentiellement nucléaire 294
Figure 55 : Cinétique d'une contamination à l'uranium à 50 µM pendant 24 heures sur des cellules HepG2 par la technique d'image SIMS 296
Figure 56 : Mesure de la Lactate Déshydrogénase après 1, 2, 4 et 24 heures de contamination par l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM) 298
Figure 57 : Expression génique de Bax (A) et de Bid (B) après 15, 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM)..... 300
Figure 58 : Mesure de l'activité des Caspases 3/7 après 4, 6, 12 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM) ou à des inducteurs d'apoptose (H_2O_2 250 µM, Cadmium 150 et 300 µM) 302
Figure 59 : Marquage des anions superoxydes par le DHE après 4 heures de traitement 304
Figure 60 : Expression génique de la catalase (a), de l'hème-oxygénase-1 (b), de Mn SOD (c) et de Cu, Zn SOD (d) après 15, 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM). 306
Figure 61 : Expression génique (a) et protéique (b) de Nrf2 après exposition à différentes concentrations d'uranium 312
Figure 62 : Le Résumé des résultats obtenus au niveau cellulaire en fonction de la concentration en uranium et du temps d'exposition 314

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium 62
Tableau 2 : Marqueurs de génotoxicité 102
Tableau 3 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant après exposition aiguë chez le rongeur 104
Tableau 4 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant après exposition chronique chez le rongeur 106
Tableau 5 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant au niveau cellulaire ... 108
Tableau 6 : Les espèces réactives de l'Oxygène (d'après Migdal 2011) 116
Tableau 7 : Les principales espèces réactives 117
Tableau 8 : Réaction de peroxydation lipidique 124
Tableau 9 : Biomarqueurs de stress oxydant associés à des pathologies (d'après Valko 2007) 155
Tableau 10 : Les différents protocoles de traitement sur les cellules HepG2 184
Tableau 11 : Les différentes étapes de déshydratation des échantillons biologiques par le VIP. 192
Tableau 12 : Les différentes étapes de déparaffinage avant la coloration. 192
Tableau 13 : Les différentes étapes de la coloration HES. 192
Tableau 14 : Score histologique des lésions hépatiques 194
Tableau 15 : Score histologique des lésions rénales 194
Tableau 16 : Séquences des gènes évalués chez le rat 198
Tableau 17 : Séquences des gènes évalués chez la souris 200
Tableau 18 : Composition du milieu de culture des cellules HepG2 208
Tableau 19 : Protocole de préparation des échantillons en vue des analyses SIMS et ICP-MS 210
Tableau 20 : Séquences des gènes évalués au niveau cellulaire 214
Tableau 21 : Composition du gel d'acrylamide à 10 % 216
Tableau 22 : Références des anticorps utilisés pour le Western Blot 216
Tableau 23 : Mesure de l'uranium dans le foie, l'os (fémur) et le rein après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium (1,40, 120, 400 ou 600 mg/L) 224

Tableau 24 : Analyses des paramètres plasmatiques après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par uranium 230
Tableau 25 : Analyses des paramètres urinaires après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium 232

ABREVIATIONS

4-HNE: 4-Hydroxynonenal
8-OH-dG: 8-hydroxy-desoxyguanosine
8-OH-G: 8-hydroxy-guanosine
$^{\cdot}$NO : Monoxyde d'azote
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ALAT : Alanine Amino Transférase
ANOVA : Analysis of Variance
AP-1 : Activator Protein 1
ARE : Anti-oxidant Response Element
ARNm : Acide ribonucléique messager
ASAT : Aspartate Amino Transférase
CAT : Catalase
CBP : Creatinin Binding Protein
Cd : Cadmium
CIPR : Commission internationale de protection radiologique
CO : Monoxyde de carbone
Creb
C_t : Cycles Thresold
Cu : Cuivre
Cu^+ : ions cuivreux
Cu^{2+}: ions cuivriques
Cul3 : cullin 3
Cu, Zn-SOD: Cuivre-Zinc Superoxyde Dismutase
CYP : Cytochromes
DL 50 : Dose Létale 50
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
ER : Espèces Réactives
ERN : Espèces Réactives de l'Azote
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
Fe^{2+} : ions ferreux
Fe^{3+} : ions ferriques
GCS : gamma-Cystéine Synthétase
GCL : glutamate cysteine ligase
GCLC : glutamate cysteine ligase catalytic
GCLM : glutamate cysteine ligase modifier
GPx : Glutathion Peroxydase
GR : Glutathion Réductase
Grx : Glutaredoxines
GS : Glutathion synthétase
$GS^{\cdot}$: Radical thiyle
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférase
HO-1 : Hème Oxygénase-1
HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
IC_{50} : Inhibitory Concentration 50
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICRP : International Commission on Radiological Protection
Il : Interleukine
i.m Intramusculaire
i.p : Intra péritonéal
IRM : Image par Résonance Magnétique

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
Keap 1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KIM : Kidney Injury Molecule
KPA : Kinetic Phosphorescence analysis
LDL : Low Density Lipoprotein
LRTOX : Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale
MDA : Malondialdéhyde
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique en transmission
Mn : Manganèse
Mn SOD : Manganèse Superoxyde Dismutase
MT : Metallothionéines
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAG :N-Acétyl-Glucosamine
NC : Non Contaminés
NF-κB : Nuclear Factor-κB
NO^+ : ion nitrosium
NO^- : anion nitroxyle
NOS : NO Synthase
NOX : NADPH Oxydase
NQO1 : NADPH Quinone Oxydoréductase 1
Nrf2 : NF-E2-related factor 2
$O_2^{\cdot -}$: Anion superoxyde
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
$ONOO^-$: Peroxynitrite
PC : Poids Corporel
PCR : Polymerase Chain Reaction
RBP : Retinol Binding Protein
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s.c : sous-cutané
Se : Sélénium
SFN : Sulforaphane
SIMS: Secondary ion mass spectrometry
SNC : Système Nerveux Central
SOD : Superoxyde dismutase
SOD1 : Superoxyde Dismutase 1
SOD2 : Superoxyde Disumtase 2
SOD3 : Superoxyde Disumtase 3
SU: Sous Unités
TBA: Acide thiobarbiturique
TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances
TCP : Tube Contourné Proximal
TNF : Tumor Necrosis Factor
Trx: Thioredoxines
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
UA : Uranium appauvri
UE : Uranium Enrichi
UF_4 : tétrafluorure d'uranium
UN : Uranium Naturel
UO_2^{2+}: ion uranyle
UO_3 : trioxyde d'uranium
UV : Ultra-violet
WHO: World Health Organization
Zn: Zinc
γGT gamma-Glutamyl-Transpeptidase

RESUME

L'Uranium (U) est un métal lourd radioactif dispersé dans l'environnement. Du fait de cette présence naturelle mais aussi de ses applications civiles et militaires, la population générale peut être exposée à l'U par ingestion d'eau de boisson ou d'aliments contaminés. Le système pro/anti-oxydant est un système de défense fréquemment impliqué lors d'une exposition aiguë à l'uranium. L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle du système pro/anti-oxydant après contamination chronique à l'U dans le foie et les reins. Après contamination chronique de rats à différentes concentrations d'U *via* l'eau de boisson, une accumulation dose dépendante de l'U dans les organes -jusqu'à 6 µg/g dans les reins- ainsi qu'une localisation préférentielle de l'U dans le noyau des cellules du tube contourné proximal sont observées. L'absence de néphrotoxicité observée, même à la plus forte concentration, pourrait s'expliquer par le renforcement du système anti-oxydant et notamment l'augmentation du taux de glutathion. L'étude des effets de la contamination à l'U chez un modèle déficient pour Nrf2, facteur de transcription cytoprotecteur impliqué dans la défense anti-oxydante, a mis en évidence une accumulation d'U plus importante chez les animaux Nrf2 $^{-/-}$. Néanmoins, les effets biologiques de l'U sur le système pro/anti-oxydant ne semblent pas impliquer Nrf2. Par ailleurs, il existe une corrélation entre la localisation de l'U dans des cellules HepG2 en culture et les effets biologiques sur ce système après exposition à de faibles concentrations d'U. Ce radionucléide se localise dans les noyaux sous forme soluble et l'apparition de précipités est corrélée à la mise en place de mécanismes d'adaptation qui sont ensuite débordés au cours du temps et de la concentration, laissant apparaître une toxicité cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le renforcement du système anti-oxydant serait un mécanisme d'adaptation après exposition chronique à faible concentration d'U.

Mots-clés : Uranium, contamination chronique, Nrf2, Système pro/anti-oxydant, rein, foie.

Uranium is a radioactive heavy metal found in the environment. Due to its natural presence and to civil and militaries activities, general population can be exposed to U throughout drinking water or contaminated food. The pro/anti-oxidative system is a defense system which is often implicated in case of acute exposure to U. The aim of this thesis is to study the role of the pro/anti-oxidative system after chronic exposure to U in the liver and the kidney. After chronic exposure of rats to different U concentrations through drinking water, this radionuclide accumulated in the organs in proportion to U intake ; until 6 $\mu g.g^{-1}$ of kidney tissues. U is localized in nucleus of the proximal tubular cells of the kidney. No nephrotoxicity was described even for the higher U level in drinking water and a reinforcement of the pro/anti-oxidative system with an increase in glutathione is observed. The study of U internal contamination in Nrf2 deficient mice, a cytoprotective transcription factor involved in the anti-oxidative defense has been realized. U accumulate more in Nrf2 $^{-/-}$ mice than in WT mice but the biologic effects of U on the pro/anti-oxidative system did not seem to implicate Nrf2. At the cell level, a correlation between U distribution in HepG2 cells and the biological effects on this system is observed after U exposure at low concentrations. Soluble distribution of U is observed in cell nucleus. The apparition of U precipitates is correlated to the establishment of the adaptive mechanisms overtime which are overwhelmed and lead to a cellular toxicity at higher U level.

In conclusion, these results suggest that the reinforcement of pro/anti-oxidative system could be an adaptive mechanism after chronic exposure at low U concentration.

Key words: Uranium, chronic exposure, Nrf2, pro/anti-oxidative system, liver, kidney.

AVANT-PROPOS

La société se pose de nombreuses questions quant à la présence des radioéléments dans l'environnement et ses conséquences sur les écosystèmes et la santé humaine. Dans le cas de l'uranium, différentes populations sont susceptibles d'être contaminés en raison soit de sa présence naturelle dans les nappes phréatiques, soit de son utilisation humaine à des fins civiles et militaires : les travailleurs du cycle du combustible et les populations vivant à proximité de ces installations, ou, les vétérans de la guerre du Golfe soumis aux tirs à l'uranium appauvri ainsi que les populations présentes dans les zones de conflit.
Afin de répondre à ces interrogations sur les risques potentiels sur la santé humaine, le programme ENVIRHOM (de ENVIRonnement à HOMme) a été mis en place par l'Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN). Ce programme a comme objectif d'évaluer les risques liés à l'exposition chronique à faible dose de radionucléides, dont l'uranium, à la fois sur l'environnement et sur la santé de l'Homme.
Le laboratoire de radiotoxicologie expérimentale (LRTOX) travaille plus particulièrement sur l'accumulation et les effets des radionucléides après incorporation par ingestion, inhalation ou blessure. Le programme ENVIRHOM est plus spécialement dévolu à estimer les effets sur la santé pour des populations vivant sur des territoires contaminés. La voie de l'ingestion étant la voie de contamination prépondérante pour les populations, des expérimentations utilisant des rongeurs (rats, souris) visant à mimer la situation d'exposition chronique de ces populations par eau de boisson ont été mis en place pour déterminer les effets de différents radionucléides sur le développement de pathologies non cancéreuses. Dans ce cadre, des études après contamination chronique à l'uranium sont menées sur différents organes et systèmes de défense et de détoxification.

Le système pro/anti-oxydant est un équilibre qui est souvent perturbé après exposition aiguë ou chronique à des agents toxiques tels que les rayonnements ionisants, les métaux lourds et notamment le cadmium (Liu *et al.* 2009 ; Shaikh *et al.* 1999). Parallèlement, des études aiguës ont montré que l'uranium induit également un déséquilibre de la balance pro/anti-oxydante notamment sur le système nerveux central (Ghosh *et al.* 2007) et les reins (Belles *et al.* 2007). Néanmoins ces études ont été réalisées pour de fortes concentrations d'uranium et pendant une courte durée d'exposition.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets d'une contamination chronique à l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant sur deux organes : le rein et le foie.

Après avoir défini et présenté les termes du sujet dans une partie introductive concernant plus spécifiquement les caractéristiques et effets de l'uranium ainsi que ceux du système pro/anti-oxydant), la description des matériels et méthodes utilisés lors de cette thèse, à la fois sur les contaminations *in vivo* et *in vitro*, sur l'accumulation d'uranium dans l'organisme et sur les analyses biologiques effectuées dans les différents modèles animaux et cellulaires utilisés, nous aborderons la section résultats divisée en trois grandes parties, suite à une contamination chronique chez le rat « sain », dans le cas d'un modèle de souris déficient pour le facteur de transcription Nrf2 et enfin dans des cultures cellulaires hépatiques. Dans une quatrième partie, nous discuterons ces résultats au regard des connaissances actuelles en comparant notamment avec un autre métal lourd : le cadmium. Cette section discussion est scindée en trois parties, permettant de répondre à trois questions parallèles suscitées par les résultats obtenus. Enfin, nous conclurons ce travail en évoquant les perspectives expérimentales, scientifiques et sanitaires qui en découlent.

INTRODUCTION

I. L'Uranium

A. Définition

1. Historique

En 1789, le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth découvre le minerai d'uranium qui sera tout d'abord utilisé comme pigment coloré dans la faïence et la céramique. En 1896, Henri Becquerel découvre que les sels d'uranium émettent un rayonnement qui noircit les plaques photographiques. Il appelle cela « les rayons uraniques » et conclut que l'uranium émet un rayonnement naturel qui décroît au cours du temps. Au début du XXème siècle, Marie Curie observe le même phénomène pour d'autres éléments et donne le nom de « radioactivité » à ce phénomène.

Dans les années 1930-1940, l'équipe d'Enrico Fermi montre qu'un bombardement d'uranium par des neutrons entraîne une émission d'énergie très importante. Cette réaction sera plus tard dénommée fission nucléaire. L'énergie issue de cette réaction est utilisée dans les réacteurs nucléaires pour produire de l'électricité et également dans les armes nucléaires. En 1941, débute aux Etats-Unis le projet « Manhattan ». Celui-ci conduira à la fabrication de trois bombes atomiques dont l'une à l'uranium enrichi (UE) qui détruira en 1945 la ville d'Hiroshima au Japon.

Depuis la fin de la deuxième guerre mondiale, l'utilisation de l'uranium à des fins civiles notamment en France, s'est largement répandue suite à la crise pétrolière de 1973 qui a entraîné une expansion rapide des centrales nucléaires pour la production d'énergie électrique.

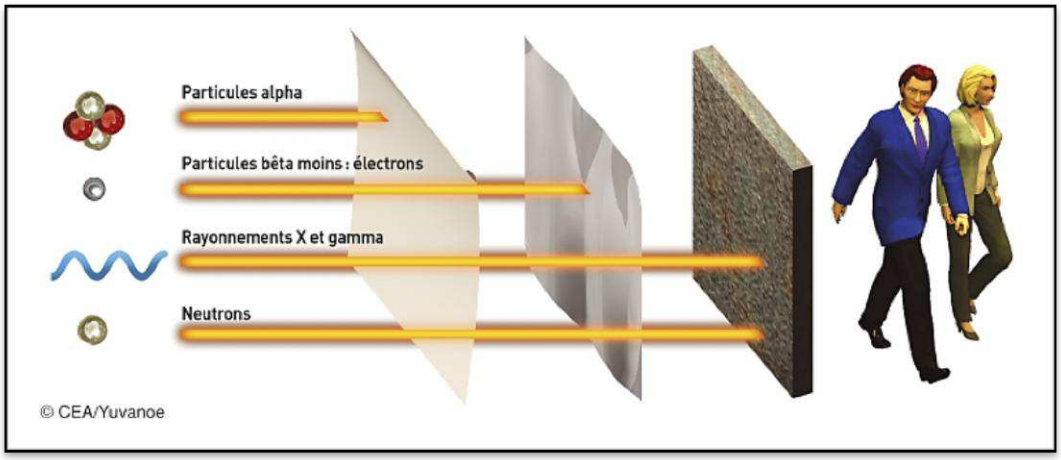

Figure 1 : Les différents rayonnements ionisants (source : CEA)

Les rayonnements ionisants peuvent plus ou moins pénétrer la matière. Les rayonnements alpha possèdent un très faible pouvoir de pénétration de la matière dans l'air : ils sont ainsi arrêtés par une feuille de papier. Le rayonnement bêta- (les électrons) peut parcourir quelques mètres dans l'air, une feuille d'aluminium suffit pour les arrêter. A l'inverse, les rayonnements X et gamma ainsi que les neutrons ont une forte pénétration qui est dépendante de leur énergie. Il faut une épaisseur importante de béton ou de plomb pour les arrêter.

2. Propriétés physico-chimiques

L'uranium, de symbole U, appartient à la famille des actinides. Il possède 92 protons et 135 à 148 neutrons.

A l'état pur, l'uranium est un métal gris radioactif très dense. En effet, sa densité est de 19,1 g/cm^3, ce qui correspond à 1,7 fois celle du plomb.

L'uranium possède six électrons périphériques et peut se présenter aux valences III, IV, V et VI. Les valences IV et VI étant les plus stables, cela permet à l'uranium de former des complexes avec différents atomes tels que l'oxygène, l'azote ou le soufre.

La stabilité du complexe est dépendante du pH ainsi que le potentiel d'oxydo-réduction du couple U(IV)/U(VI) qui est de 0,27 V dans l'eau. En solution aqueuse, l'uranium est préférentiellement en valence VI et est présent sous la forme d'ion uranyle UO_2^{2+} en milieu acide.

Dans l'environnement, l'uranium est principalement lié à des groupements phosphates ou des groupements carboxylates. Cela a été observé dans les tiges, racines ou plante du lupin blanc (*Lupinus Angustifolius*) et dans la paroi cellulaire de la bactérie *Bacillus sphaericus* (Bernhard 2005).

Dans les fluides biologiques (salive, sang), la spéciation de l'uranium est dépendante du pH mais il est principalement trouvé sous forme d'hydroxydes, de phosphates d'uranyle ou d'uranates de calcium.

3. Propriétés radiologiques

L'uranium est un émetteur de particules alpha (α). En raison du faible pouvoir pénétrant des rayonnements α (ils sont arrêtés par l'épiderme de la peau), l'exposition externe à l'uranium présente un risque mineur pour l'Homme *(Figure 1)*. Ces rayonnements sont peu pénétrants mais fortement ionisants. En effet, ils cèdent toute leur énergie sur une faible distance (quelques dizaines de micromètres) leur permettant ainsi d'ioniser les atomes de la matière traversée. Cela peut entraîner, après pénétration de l'uranium dans les tissus, des perturbations qui sont plus importantes que celles induites notamment par le rayonnement γ (Métivier 2001).

.

Isotope	Abondance naturelle (%)	Période radioactive (années)	Activité massique (Bq/g)	Emission principale par désintégration (keV)	Propriétés particulières
^{232}U	-	70	$8,2 \times 10^{11}$	α 5320 γ 57,8	
^{234}U	0,0054	245 000	$2,3 \times 10^{8}$	α 4775 γ 53,2	L'uranium 234 est l'isotope naturel le plus radioactif
^{235}U	0,711	704 millions	8×10^{4}	α 4396 γ 53,2	L'uranium 235 est le seul noyau naturel aisément fissible et il présente donc un intérêt énergétique et nucléaire
^{236}U	-	23,4 millions	$2,39 \times 10^{6}$	α 4495 γ 49,4	
^{238}U	99, 2836	4,47 milliards	$1,24 \times 10^{4}$	α 4198 γ 49,4	L'uranium 238 est le plus courant des isotopes trouvés naturellement

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium

C'est pourquoi, en cas de contamination interne, l'uranium peut entraîner une irradiation des cellules et des tissus, phénomène accentué par sa longue demi-vie.
L'uranium possède de nombreux isotopes dont trois existent à l'état naturel : 234 (^{234}U), 235 (^{235}U), 238 (^{238}U) *(Tableau 1)*. Les chaînes de désintégration de l'^{235}U et de l'^{238}U conduisent à la formation de thorium, de radon et noyaux de plomb stables *(Figure 2)*.

4. Métrologie

La technique de mesure utilisée dépend de plusieurs paramètres dont la nature de l'échantillon et l'information recherchée (concentration, isotopie).
Les émissions α et β des isotopes de l'uranium avec la matière sont mesurées grâce à des techniques dites nucléaires et les résultats sont exprimés en Becquerel. Parmi ces techniques, il existe le comptage α et β, la spectrométrie α ou γ.
La technique dite élémentaire consiste à quantifier la masse d'uranium présente dans les échantillons, et s'exprime alors en gramme par gramme d'échantillon. Dans ce cas-là, les techniques utilisées sont entre autre la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) qui permet la séparation des éléments en fonction de la masse, ou encore la *Kinetic phosphorescence analysis* (KPA) ou analyse de la cinétique de phosphorescence qui mesure la phosphorescence de l'uranium (Paquet *et al.* 2009). Cette dernière technique est de moins en moins utilisée au profit de l'ICP-MS.

B. Origine

1. Gisement et exploitation

L'Uranium est un métal lourd naturellement présent dans la croûte terrestre à raison de 2 à 4 mg/kg (ATSDR 2013). Sa présence est liée à l'érosion des roches dont la teneur en uranium varie selon la nature des roches. Les granites et les roches phosphatées ont une teneur en uranium de respectivement 3 à 4 g/t et 20 à 120 g/t (Langmuir 1978). La teneur en uranium est directement proportionnelle à la profondeur. Certaines régions sont donc naturellement riches en uranium et peuvent être exploitées pour l'extraction d'uranium.

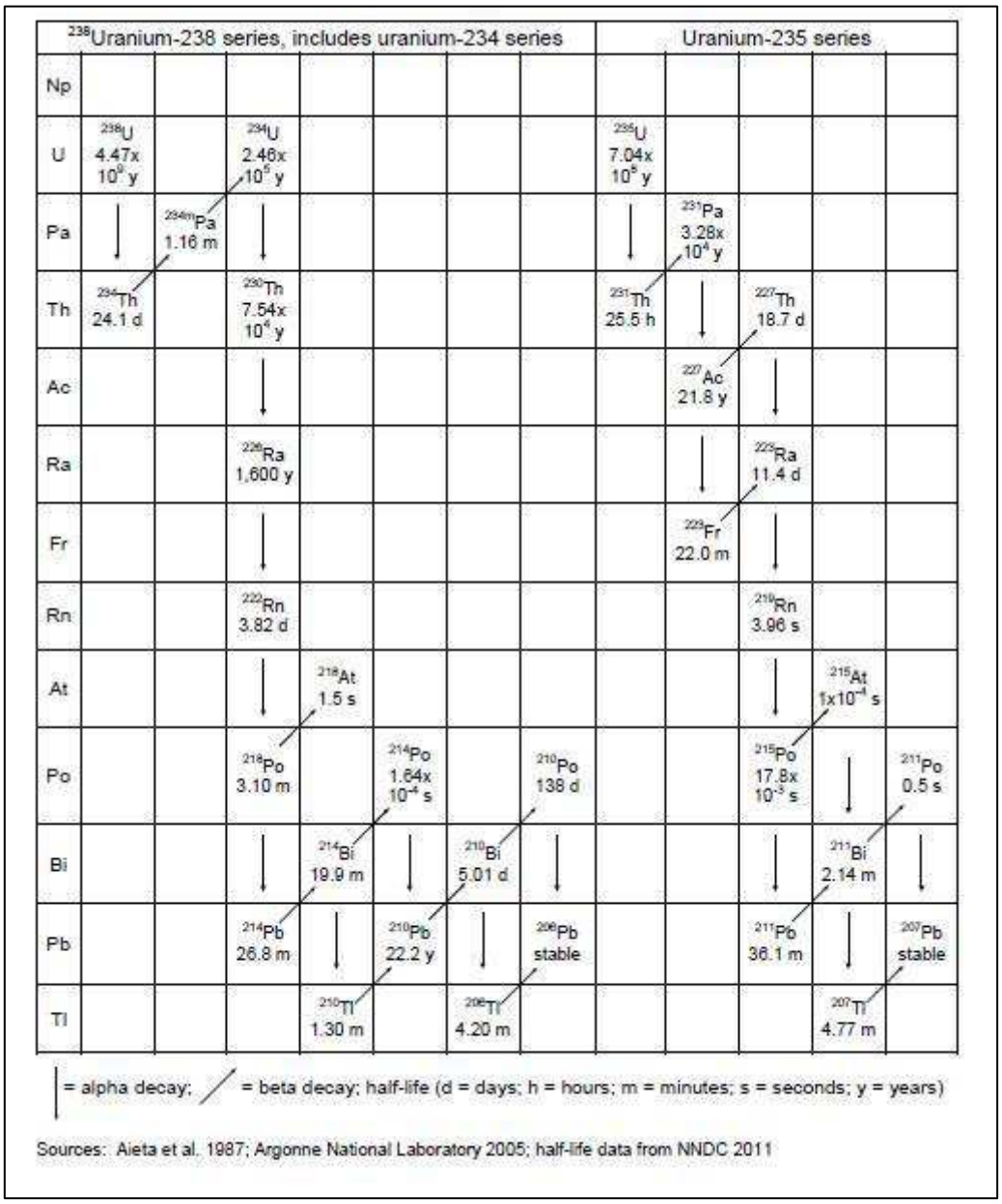

Figure 2 : Chaînes de désintégration de l'uranium

La concentration d'uranium dans l'eau de boisson est en moyenne de 0, 4 µg/L (WHO 2012). Les teneurs en uranium dans les eaux sont plus élevées dans les régions dont le sol est naturellement riche en uranium. Ainsi, ces valeurs peut-être plus importantes dans des zones où des puits de forage privés ont été creusés dans des roches uranifères. Dans le sud de la Finlande, région particulièrement riche en uranium, plusieurs études ont montré que certains puits d'eau privés servant à la consommation avaient une teneur moyenne en uranium de 28 µg/L (Kurttio *et al.* 2002 ; Kurttio *et al.* 2005), et jusqu'à 700 µg /L dans certains puits au Canada (WHO 2012).

La concentration maximale environnementale (20 mg/L) a été recensée en Finlande, dans un puits d'eau de boisson (Juntunen 1991 ; Salonen 1994).

2. Le cycle du nucléaire

L'uranium se retrouve dans les roches sous forme de minerai telles que la pechblende, la carnotite ou l'uranite. Selon les gisements, la concentration peut être en moyenne mille fois supérieure à celle mesurée dans le sol comme indiqué ci-dessus.

L'extraction de l'uranium est nécessaire pour les opérations d'enrichissement permettant son utilisation dans l'énergie nucléaire. L'enrichissement consiste à augmenter la proportion d'isotope radioactif 235 fissile par rapport à l'isotope 238 dans l'uranium naturel (UN).

Après extraction de la mine (souterraine ou à ciel ouvert), le minerai est concentré sous forme d'oxyde d'uranium (U_3O_8) dans des usines de traitement situées à proximité des mines. Après séchage, une pâte dure de couleur jaune est obtenue : c'est le «yellow cake» *(Figure 3)* qui contient environ 75 % d'UN. Il est ensuite conditionné et expédié vers des usines de conversion.

La conversion consiste à transformer l'extrait minier en hexafluorure d'uranium (UF_6) selon 2 étapes comme expliqué dans la *Figure 4*. L'UF_6 sera ensuite enrichi et pourra être alors utilisé comme combustible nucléaire.

Figure 3 : "Yellow cake" uranium (source: www.areva.com)

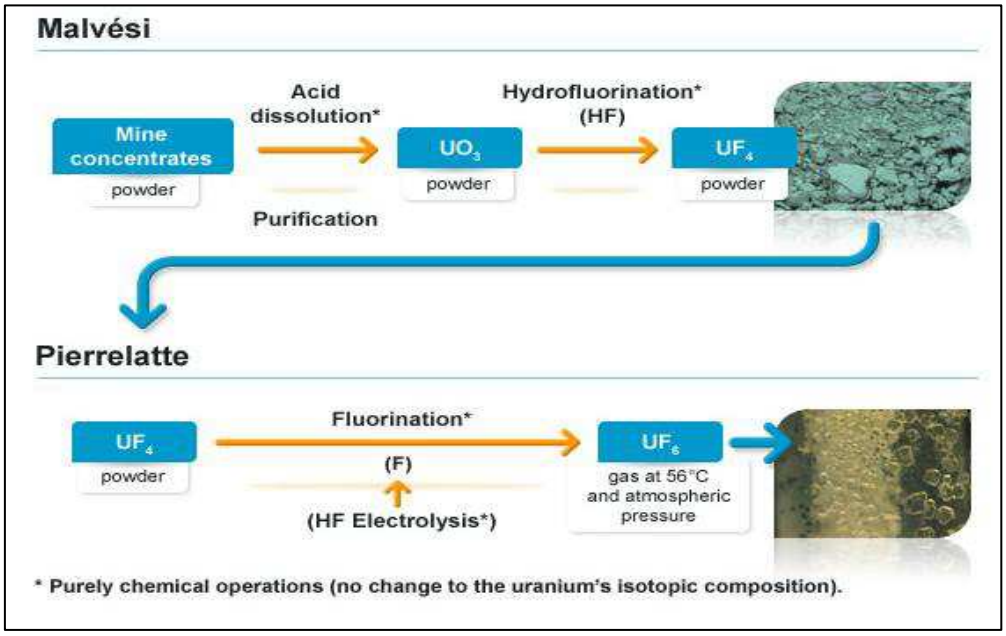

Figure 4 : Conversion de l'uranium (source : www.areva.com)

La conversion de l'uranium se fait selon un procédé chimique en deux étapes. L'uranium est d'abord transformé en tétrafluorure d'uranium (UF_4). En effet, l'uranium extrait des mines est d'abord dissout dans l'acide et purifié. Après précipitation-calcination, la poudre de trioxyde d'uranium (UO_3) est obtenue et transformée en UF_4 par réaction d'hydroflurination. La seconde étape consiste en la conversion de l'UF_4 en hexafluorure d'uranium (UF_6) par une réaction de fluoration. L'UF_6 gazeux est solidifié et peut être enrichi si besoin.

UF_4 : tétrafluorure d'uranium ; UO_3 : trioxyde d'uranium ; UF_6 : hexafluorure d'uranium.

C. Utilisations

L'UE est utilisé comme combustible pour les réacteurs nucléaires (enrichissement en ^{235}U entre 3 et 5 %) ou à des fins militaires dans les armes atomiques (enrichissement en ^{235}U supérieure à 90 %).

Après séparation de l'UE, un sous-produit est obtenu : l'uranium appauvri (UA). Il contient en moyenne 0,3 % ^{235}U et possède les mêmes propriétés chimiques que l'UN. Cependant l'UA est deux fois moins radioactif que l'UN.

Il présente de nombreuses applications civiles et militaires. En effet, l'UA est utilisé dans l'industrie de l'armement où sa forte densité et ses propriétés pyrophoriques (c'est-à-dire qu'il s'enflamme facilement au contact de l'air) même s'il est très finement dispersé- en font un matériau très utile pour le blindage des tanks et les têtes d'obus perforant.

Dans le domaine civil, il sert à la fabrication d'ailes d'avions et de quilles de bateaux comme lest. L'UA intervient aussi dans la composition de bouclier de protection contre les rayonnements ionisants du matériel médical utilisé pour les radiothérapies (Paquet *et al.* 2009).

D. Situations d'exposition

L'uranium étant naturellement présent dans l'environnement, il présente un risque d'exposition pour la population générale suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime entre 1 et 4 µg la quantité d'uranium ingérée quotidiennement (WHO 2012). La valeur de recommandation de teneur maximale d'uranium dans l'eau de boisson définie par l'OMS est de 30 µg/L (WHO 2011).

En France, la concentration en uranium mesurée entre 2008 et 2009 dans les eaux de boissson est comprise entre 0,14 et 114 µg/L, sachant que la valeur moyenne est de 2,22 µg/L (AFFSA 2010 ; IRSN 2011).

Les populations dont le risque d'exposition est le plus important sont celles qui vivent sur des territoires dans lesquels la teneur en UN est particulièrement forte comme c'est le cas dans le sud de la Finlande ou dans certaines régions des Etats-Unis d'Amérique ou du Mexique (Hakonson-Hayes *et al.* 2002).

Lors de récents conflits internationaux, où l'UA a été utilisé comme composant d'armes militaires, une contamination de l'environnement a pu avoir lieu augmentant ainsi les sources d'exposition pour les populations locales et les militaires (McDiarmid *et al.* 2009 ; Miller *et al.* 2004).

Les mineurs et les travailleurs des usines d'enrichissement, de production et de retraitement de l'uranium présentent un risque d'exposition particulier en raison de l'inhalation possible de poussières contenant de l'uranium ou suite à des blessures cutanées (Paquet *et al.* 2009 ; Ubios *et al.* 1997).

E. Biocinétique dans l'organisme

1. Absorption

L'uranium peut pénétrer dans l'organisme selon trois voies : inhalation, ingestion ou lésion cutanée (Craft *et al.* 2004).

- L'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés est la voie d'exposition majoritaire pour le grand public. Elle peut se faire soit directement comme dans le cas de l'eau, soit indirectement *via* la chaîne alimentaire (végétaux, viandes). L'uranium est absorbé au niveau de l'intestin grêle (Dublineau *et al.* 2005) à hauteur de 1 à 2 % chez l'Homme (Wrenn *et al.* 1985) et 0,4 à 1 % chez le rat (Frelon *et al.* 2005 ; La Touche *et al.* 1987). Chez l'Homme, la fraction absorbée au niveau intestinal varie en fonction de la solubilité de l'uranium : 2 % de la fraction soluble sera absorbé contre 0,2 % pour les formes insolubles (ICRP 1995a).

- L'inhalation de particules d'uranium concerne les travailleurs du cycle de l'uranium, par exemple les mineurs qui extraient l'UN des carrières. L'impact de munitions provoque une formation de poussières d'UA qui peuvent être inhalées par les militaires. La Commission internationale de protection radiologique (CIPR) classe en trois catégories les composés uranifères en fonction de leur solubilité et indépendamment de leur diamètre (ICRP 1995b).

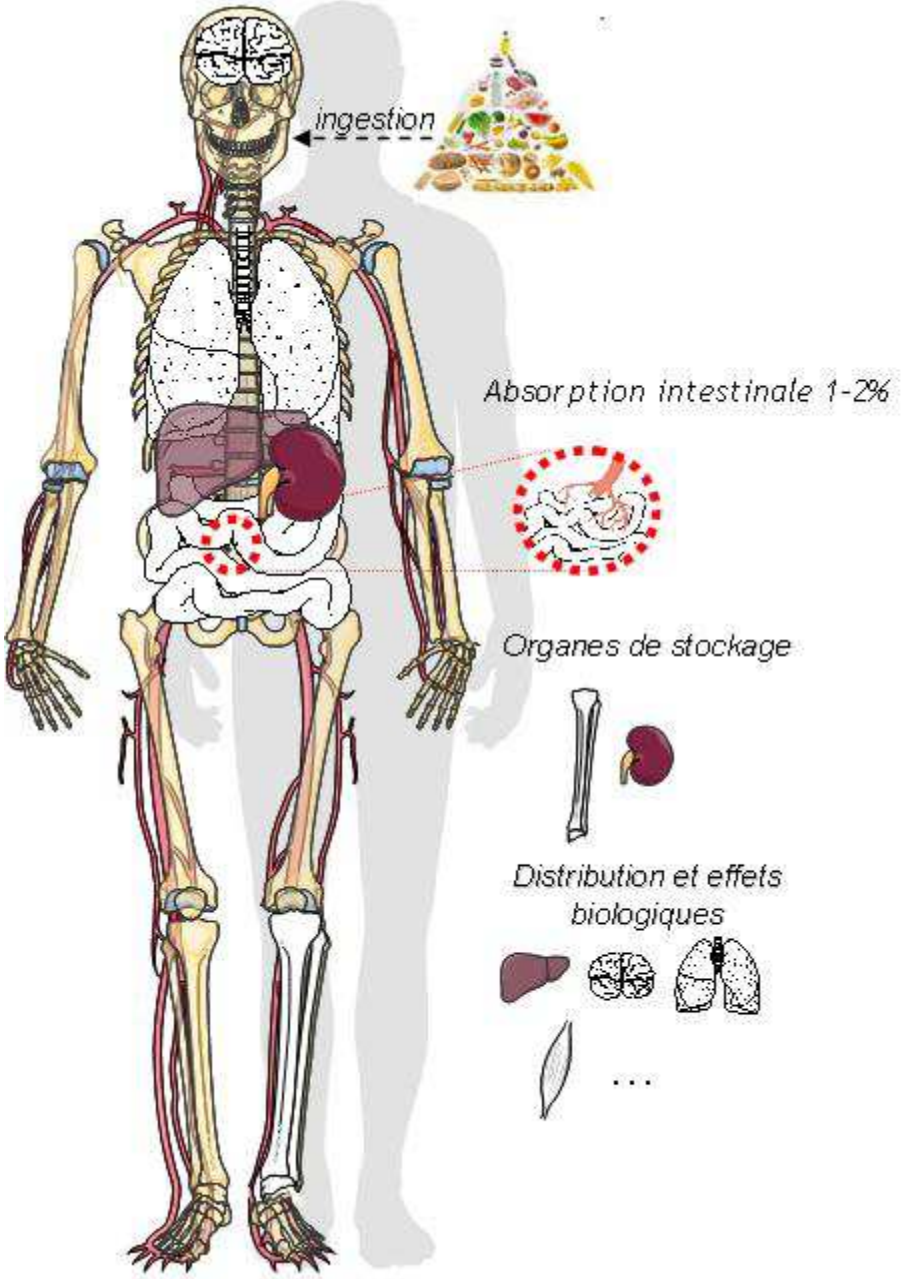

Figure 5 : Distribution de l'uranium dans l'organisme après ingestion

L'uranium est absorbé au niveau intestinal puis distribué aux différents organes par voie systémique. Le rein est le premier organe cible de la toxicité de l'uranium et également le siège du stockage à court terme. Au-delà de quelques semaines, l'uranium s'accumule essentiellement dans l'os. Ce dernier constitue l'organe de stockage à long terme.

- La blessure cutanée concerne principalement les soldats ou les civils lors des tirs ou des bombardements pendant les conflits mais également les travailleurs du cycle du combustible. Dans le cas de personnes se trouvant dans le voisinage d'un tir de pénétrateur, il peut y avoir une incrustation dans le corps de fragments de munitions. Il peut également y avoir contact de l'uranium avec une peau lésée (avec ou sans plaie ouverte) : l'uranium peut alors rejoindre la circulation sanguine (Petitot *et al.* 2007a ; Petitot *et al.* 2007b ; Petitot *et al.* 2004 ; Tymen *et al.* 2000 ; Ubios *et al.* 1997).

2. Distribution

Après absorption intestinale, l'uranium est présent dans le sang sous forme d'ions uranyles (UO_2^{2+}) où il se complexe avec différentes protéines telles que la transferrine ou l'albumine (Cooper *et al.* 1982 ; Michon *et al.* 2010).

L'uranium se distribue de façon inégale dans les tissus : il s'accumule majoritairement dans les reins et l'os puis dans les tissus mous (foie, poumons, muscle et cerveau) (Craft *et al.* 2004 ; Paquet *et al.* 2006 ; Pellmar *et al.* 1999) *(Figure 5)*.

Au niveau rénal, l'uranium est filtré au niveau glomérulaire avant d'être réabsorbé par le tube contourné proximal (TCP). Cette accumulation au niveau du rein en fait la première cible des effets toxiques (Craft *et al.* 2004 ; La Touche *et al.* 1987 ; Leggett 1989).

Selon les études, la quantité d'uranium ainsi stockée dans les reins représenterait 66 à 85 % de la charge corporelle (ATSDR 2013 ; Craft *et al.* 2004 ; Sztajnkrycer *et al.* 2004).

L'os constitue l'organe de stockage de l'uranium à long terme (Wrenn *et al.* 1985) : les ions uranyles se substitueraient aux ions calciques dans les cristaux d'hydroxyapatite lors du remodelage osseux (Leggett 1994).

3. Métabolisme

Il n'existe à ce jour aucune donnée connue sur le métabolisme hépatique propre de l'uranium.

4. Elimination

La majorité de l'uranium ingérée est éliminée très rapidement dans l'organisme. En effet, 98 % de la dose ingérée est éliminée directement dans les fèces sans pénétrer dans la circulation sanguine. 70 à 80 % de la fraction absorbée est éliminée par voie urinaire dans les 24 premières heures. Au bout de quelques jours, près de 90 % de la quantité d'uranium ingérée est éliminée (WHO 2003).

Néanmoins, en raison de son excrétion lente et faible au niveau osseux, la demi-vie biologique de l'uranium dans l'organisme est comprise entre 300 et 5000 jours (Craft *et al.* 2004 ; Sztajnkrycer *et al.* 2004 ; Wrenn *et al.* 1985).

F. Effets biologiques de l'uranium

Dans cette partie, nous détaillerons uniquement les effets de l'uranium sur différents organes et fonctions physiologiques. Dans le paragraphe suivant (G), les mécanismes mis en jeu suite à une contamination par l'uranium, et ce, indépendamment de l'organe considéré, seront plus particulièrement développés.

L'uranium possède une toxicité chimique liée à son caractère de métal lourd, et une toxicité radiologique en raison de sa radioactivité. Cette dernière varie en fonction des radioisotopes de l'uranium (232, 233, 234, 235, 236 ou 238). A l'inverse, la toxicité chimique reste inchangée quel que soit l'isotope considéré. L'UN et l'UA étant peu radioactifs par rapport à l'UE, ils présentent majoritairement une toxicité chimique (Craft *et al.* 2004 ; Sztajnkrycer *et al.* 2004).

En fonction de la durée d'exposition, sont distinguées deux types de toxicité : une toxicité aiguë correspondant à un temps d'exposition court (inférieur à 30 jours) et une toxicité chronique liée à une exposition sur un temps long (supérieur à 30 jours).

La dose létale 50 (DL50), qui correspond à la dose induisant 50 % de mortalité des animaux après exposition unique, est estimée à 204 mg/kg chez le rat après exposition orale unique par gavage (Domingo *et al.* 1987). L'intoxication aiguë à l'UA se traduit par une altération de l'état général de l'animal se manifestant notamment par une perte de poids, une hypothermie, des tremblements, une hémorragie oculaire, un myosis.

La toxicité de l'uranium peut atteindre la totalité des organes, cependant les reins en sont la cible privilégiée (Leggett 1989). D'ailleurs, la néphrite est le premier symptôme d'une intoxication à une dose forte d'uranium.

Par ailleurs, l'uranium n'étant pas classé comme une substance cancérogène, les rares études qui ont décrit des effets cancérogènes suite à une exposition à l'uranium seront brièvement développées dans ce paragraphe avant de décrire plus en détail les effets de l'uranium sur les grands systèmes physiologiques.
Ainsi, chez le rat, l'implantation de fragments d'UA (2,5 x 2,5 mm) sous la peau entraine une hyperprolifération cellulaire avec apparition de sarcome du muscle (Hahn *et al.* 2002). Par ailleurs, l'inoculation de cellules préalablement exposées à l'uranium à des souris a entrainé l'apparition de tumeurs chez ces dernières (Miller *et al.* 2002c).
Des études épidémiologiques ont été réalisées sur différentes populations. Ainsi, chez des populations consommant de l'eau naturellement riche en uranium, aucun lien n'a pu être établi entre cette consommation et l'apparition de cancers pour différents organes dont la vessie et le rein (Kurttio *et al.* 2006). En revanche, dans le cas des mineurs d'uranium, une corrélation entre l'exposition par inhalation à l'uranium et l'augmentation du nombre de cancers des poumons et des reins a été mise en évidence (Vacquier *et al.* 2008), même si des études récentes montrent que le cancer des poumons serait dû à l'exposition au radon (Boice *et al.* 2007 ; Vacquier *et al.* 2009). Enfin, concernant les populations vivant sur les anciens territoires de conflit armé, une étude réalisée dans les Balkans a montré une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux, dans les lymphocytes circulants (Krunic *et al.* 2005).

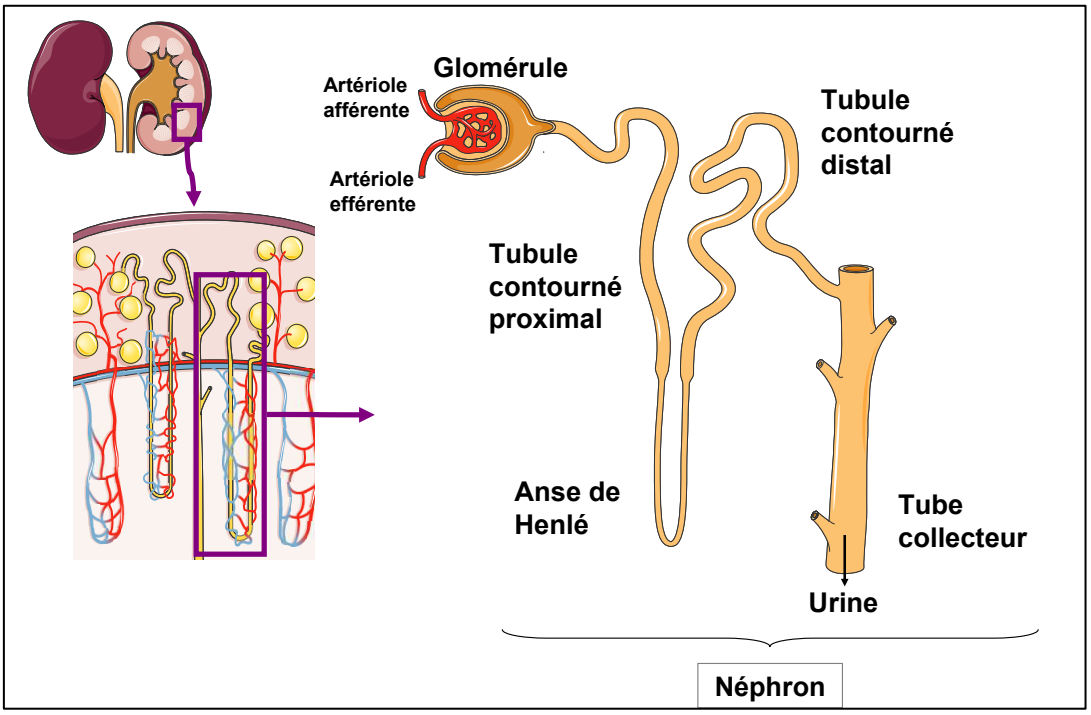

Figure 6 : Schéma du rein et du néphron

1. Le rein

En raison de la réabsorption rénale de l'uranium, et de son analogie structurale avec le calcium *(Figure 6)*, le rein, filtre de l'organisme, est continuellement exposé à l'uranium. Après filtration glomérulaire, l'uranium passe ensuite dans les TCP où il est réabsorbé au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Une fois dans ces cellules, et à forte concentration, l'uranium peut précipiter sous forme d'aiguilles de phosphates d'uranyle. Ces précipités seraient dus au fait que l'uranium est présent dans les lysosomes et précipite suite à une diminution du pH au sein de ces organites (Galle 1997 ; Leggett 1989).

a. Toxicité aiguë

Suite à une exposition aiguë à l'uranium, et ce indépendamment de la voie d'administration et de la dose (10 mg/kg de nitrate d'uranyle par injection sous-cutanée (s.c) (Haley *et al.* 1982); 0,66 à 1,32 mg/kg de fluorure d'uranyle (Diamond *et al.* 1989), les lésions rénales induites sont majoritairement situées dans les Tubes Contournés Proximaux (TCP).

Haley *et al.* ont observé qu'au niveau histologique l'uranium entraine une atteinte glomérulaire ainsi qu'une perte focale de la bordure en brosse du TCP et une augmentation de la présence de vacuoles dans la première heure suivant l'injection de nitrate d'uranyle (Haley *et al.* 1982). Après cinq jours de traitement, des foyers nécrotiques apparaissent. D'autre part, suite à une contamination par le fluorure d'uranyle, les tubes collecteurs peuvent également être atteints (Diamond *et al.* 1989). Suite à cette étude, la concentration minimale d'uranium entraînant des altérations histologiques au niveau du rein a été estimée entre 0,7 et 1, 4 µg d'uranium par gramme de rein, chez le rat.

L'atteinte rénale semble réversible après arrêt d'une contamination de courte durée (Diamond *et al.* 1989 ; Haley *et al.* 1982 ; Kobayashi *et al.* 1984). Malgré une régénération tubulaire, il peut néanmoins être observée une persistance d'une fibrose interstitielle et une infiltration de cellules mononuclées (Haley *et al.* 1982).

Parallèlement aux atteintes histologiques, certains paramètres biochimiques sont modifiés après exposition aiguë. Suite à des injections répétées de fluorure d'uranyle de 0,66 à 1,32 mg/kg de poids corporel (PC) chez le rat, l'apparition d'une protéinurie et d'une enzymurie ont été décrites (Diamond *et al.* 1989)

.

Chez le rat, une augmentation de la créatinine et de l'urée plasmatiques a été observée après injection s.c de 11,5 mg/kg d'UA (Gueguen *et al.* 2006b) et après injection intramusculaire (i.m) (0,2 à 2 mg/kg) de nitrate d'uranyle pendant 28 jours (Fukuda *et al.* 2006). Cette dernière étude a également mis en évidence une corrélation entre la dose d'uranium injectée, sa concentration dans le rein et le rapport urinaire N-acétylglucosamine (NAG)/créatinine. La clairance à la créatinine, reflet du débit de filtration glomérulaire, est également diminuée chez le rat suite une injection intrapéritonéale (i.p) de 0,5 mg/kg de nitrate d'uranyle pendant 5 jours (Banday *et al.* 2008).

b. Exposition chronique

En cas de contamination chronique à l'uranium, l'atteinte rénale est essentiellement tubulaire chez le rat et se traduit notamment par l'apparition de vacuoles ou de vésicules pour des fortes concentrations d'uranium (0,02 mg/kg à 40 mg/kg *per os* pendant 3 mois (Gilman *et al.* 1998b) ; 2 à 16 mg/kg pendant 1 mois *via* l'eau de boisson (Ortega *et al.* 1989); 200 à 600 mg/kg par pose d'implants pendant 3 à 12 mois (Zhu *et al.* 2009b). Des altérations glomérulaires ainsi que des modifications de l'interstitium ont néanmoins été observées chez le rat (Gilman *et al.* 1998b ; Zhu *et al.* 2009b).

Les paramètres biochimiques sont également perturbés après exposition chronique à l'uranium. Une augmentation du glucose urinaire a été observée après contamination par voie orale pendant 1 et 3 mois chez le rat (Gilman *et al.* 1998b ; Ortega *et al.* 1989). La créatinine et l'urée plasmatiques ainsi que la ß2-microglobuline et l'albumine urinaires sont augmentées chez des rats auxquels des implants d'uranium (0,1 g d'uranium par implant) ont été introduits dans le muscle gastrocnémien (Zhu *et al.* 2009b).

Une étude de toxicogénomique réalisée chez la souris contaminée *via* l'eau de boisson à 80 mg/L et 160 mg/L (soit 13 et 26 mg/kg/jour) pendant 4 mois décrit une augmentation de la créatinine plasmatique (Taulan *et al.* 2004). En revanche, Gilman *et al.* n'ont observé aucune modification des paramètres biochimiques ni d'altération histologique chez le lapin après 3 mois de contamination à des concentrations de 0,02 à 40 mg/kg d'uranium (Gilman *et al.* 1998a).

Des études chroniques menées chez le rat contaminé *via* l'eau de boisson (UA, 40 mg/L, 9 mois ce qui correspond à 2,67 mg/kg/jour d'UA) mettent en évidence des modifications de certaines enzymes de détoxification dont les cytochromes P450 (CYP). Ainsi, ont été observés une augmentation de l'expression génique des CYP 3A1 et 2B1 ainsi que celle du récepteur nucléaire PXR (Souidi *et al.* 2005), une diminution de l'expression génique de GSTa2 et UGTA1 au niveau du cortex rénal en l'absence d'atteinte histologique et de modifications des paramètres biochimiques (Rouas *et al.* 2011) et une diminution du taux sanguin de globules rouges (Berradi *et al.* 2008). Enfin, une étude réalisée dans des conditions analogues a permis de montrer une diminution de l'expression génique de CYP24A1 mis en jeu dans le métabolisme de la vitamine D ainsi qu'une diminution de la vitamine D plasmatique (Tissandie *et al.* 2007).

c. Données épidémiologiques

Des études ont été réalisées chez des populations consommant de l'eau de puits où la teneur en uranium était supérieure à 15 µg/L, ce qui correspondait à la norme définie par l'OMS en 2006 et qui a été réévaluée en 2011 à 30 µg/L (WHO 2011). Les résultats montrent qu'un apport quotidien d'uranium à forte concentration (supérieur à 1 mg/L) chez l'Homme peut induire une atteinte tubulaire potentielle : modification de l'excrétion de calcium, augmentation de l'excrétion de ß2-microglobuline, glucosurie (Kurttio *et al.* 2002 ; Zamora *et al.* 1998). Cependant ces modifications de la fonction rénale ne sont pas confirmées par d'autres études (Kurttio *et al.* 2006 ; Selden *et al.* 2009). Au regard de ces résultats, il apparait nécessaire de réaliser des études supplémentaires utilisant des biomarqueurs plus spécifiques et des cohortes plus importantes (Canu *et al.* 2011).
Les mineurs travaillant dans les mines d'uranium ont fait l'objet d'études dans lesquelles aucune corrélation claire n'a pu être établie entre l'exposition à l'uranium et l'apparition de cancer du rein ou de maladies rénales (Boice *et al.* 2008 ; Boice *et al.* 2011 ; Boice *et al.* 2003).

Enfin, des études épidémiologiques ont également été réalisées sur les vétérans de la guerre du Golfe et du conflit des Balkans. Ainsi la présence d'uranium dans les urines a été détectée jusqu'à 18 ans après chez des militaires ayant des fragments d'obus implantés dans diverses parties du corps (McDiarmid *et al.* 2011 ; McDiarmid *et al.* 2006 ; McDiarmid *et al.* 2000). Néanmoins les dysfonctionnements tubulaires rénaux attribuables à la contamination par l'uranium ne sont pas significatifs (McDiarmid *et al.* 2009 ; McDiarmid *et al.* 2006 ; McDiarmid *et al.* 2013).

2. L'os

L'os est le site d'accumulation de l'uranium à long terme (Pellmar *et al.* 1999 ; Zhu *et al.* 2009a). La fixation à la surface de l'os se fait par échange d'ions uranyles UO_2^{2+} avec les ions Ca^{2+} présents dans les cristaux d'hydroxyapatite (Leggett 1994 ; Priest *et al.* 1982). L'uranium se dépose préférentiellement dans les zones de croissance et les zones vascularisées (Priest *et al.* 1982).

a. Toxicité aiguë

Chez le rat, suite à une contamination aiguë et ce indépendamment de la voie d'administration, 0,2 à 2 mg/kg en IM ou 0,8 mg/kg en i.p ou implantation sous-cutanée de poudre UO_2 (0,125 mg/kg), l'uranium provoque une inhibition de la formation osseuse ainsi qu'une augmentation de la résorption osseuse (Diaz Sylvester *et al.* 2002 ; Fukuda *et al.* 2006 ; Ubios *et al.* 1991).

b. Exposition chronique

Des études menées chez des rats implantés avec des fragments d'uranium (0,125 mg/kg de PC) pendant 30 jours montrent que suite à cette exposition chronique à l'uranium, il y a une diminution de la croissance, de la formation osseuse et de l'ossification (Diaz Sylvester *et al.* 2002).

Par ailleurs, une étude réalisée plus récente a mis en évidence qu'une contamination chronique à l'uranium (2,67 mg/kg/jour) affecte l'os des rats en croissance en diminuant d'une part l'expression génique de protéines impliquées dans le métabolisme osseux et d'autre part la surface de l'os fémoral cortical (Wade-Gueye *et al.* 2012).

c. Données épidémiologiques

Une étude réalisée sur une population (146 hommes et 142 femmes) exposée à l'uranium *via* l'eau de boisson (27 µg/L) pendant 13 ans met en évidence que la consommation d'eau contaminée par l'uranium pourrait être à l'origine de l'augmentation de certains marqueurs osseux (ostéocalcine, télopeptide C-terminal du collagène de type 1) (Kurttio *et al.* 2005). Par ailleurs, le suivi des vétérans de la guerre du Golfe a permis de mettre en évidence, 16 ans après leur retour, l'apparition de légères modifications au niveau de la formation osseuse en l'absence de modification de la vitamine D et de la parathormone (PTH) (McDiarmid *et al.* 2009).

3. Le foie

a. Accumulation

L'accumulation d'uranium au niveau hépatique est décrite dans plusieurs études, et ce quelle que soit la voie d'exposition, la forme chimique de l'uranium ou l'espèce étudiée. Ainsi, chez le rat, l'uranium est présent au niveau hépatique après ingestion chronique, pour des doses comprises entre 1 et 600 mg/L (0,02 à 40 mg/kg/jour) (Gilman *et al.* 1998b ; Paquet *et al.* 2006), ou après la pose d'implants d'uranium (Pellmar *et al.* 1999).
Néanmoins, dans les études expérimentales de contamination interne chronique, la quantité d'U retenue au niveau hépatique est le plus souvent très inférieure à celles retrouvées dans le rein ou l'os (La Touche *et al.* 1987 ; Pellmar *et al.* 1999).

b. Toxicité aiguë

Après une exposition à forte dose (210 mg/kg) d'uranium, des lésions histologiques et tissulaires au niveau hépatique sont observées chez le rat (Domingo *et al.* 1987).
Plusieurs études ont étudié l'impact d'une insuffisance rénale induite par injection i.v de doses néphrotoxiques d'uranium chez le rat sur la métabolisation de certains xénobiotiques au niveau du foie.

Dans ces conditions expérimentales, l'uranium entraine des modifications de l'expression génique de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et de la pharmacocinétique de xénobiotiques dont le métabolisme dépend de ces même enzymes (Chung *et al.* 2006 ; Chung *et al.* 2003 ; Lin *et al.* 1982 ; Moon *et al.* 2003 ; Yu *et al.* 2002).

Une élévation des enzymes hépatiques telles que les transaminases Alanine Amino Transférases (ALAT) et Aspartate Amino Transférases (ASAT) ainsi qu'une diminution du poids du foie et des perturbations des enzymes hépatiques (CYP) sont décrites après injection sous cutanée d'uranium (11,5 mg/kg) pendant 3 jours chez le rat (Gueguen *et al.* 2006b).

Pasanen *et al.* ont aussi observé des modifications des CYP trois jours après instillation d'uranium chez le rat, en l'absence d'altération histologique hépatique (Pasanen *et al.* 1995).

Le métabolisme de la vitamine D est également modifié suite à un traitement unique par voie orale de nitrate d'uranyle (204 mg/kg) (Tissandie *et al.* 2006).

c. Exposition chronique

A l'instar des effets précédemment décrits dans le rein, les enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques sont également atteintes au niveau hépatique (Souidi *et al.* 2005). Cela entraîne un dysfonctionnement du métabolisme des xénobiotiques dont le paracétamol (Gueguen *et al.* 2007 ; Rouas *et al.* 2009).

D'autre part, la CYP7A1, protéine impliquée dans le catabolisme du cholestérol hépatique, voit son expression génique et son activité diminuer dans des conditions expérimentales similaires (Racine *et al.* 2010).

En revanche, les effets décrits précédemment après exposition aiguë à l'uranium sur le métabolisme hépatique de la vitamine D ne sont pas observés dans le cas d'une contamination chronique (Tissandie *et al.* 2007).

4. Le système nerveux central

Le cerveau accumule très peu d'uranium quelle que soit la durée de l'exposition. En effet, l'équipe de Paquet a montré que le cerveau accumulait entre 0,07 à 1,1 ng d'UA par gramme de tissus après une exposition comprise entre 95 à 570 jours d'exposition *via* l'eau de boisson à une concentration de 40 mg/L d'UA (Paquet *et al.* 2006). La présence d'implant d'uranium chez des rats pendant un et six mois a également montré une accumulation très limitée d'uranium dans le cerveau (Pellmar *et al.* 1999).

Bien qu'il soit admis qu'il existe un passage de l'uranium sanguin vers le cerveau, les mécanismes impliqués sont mal connus. Ainsi, Lemercier *et al.* n'observant pas d'altération de la barrière hémato-encéphalique, émettent l'hypothèse d'un passage parenchymateux ou vasculaire de l'uranium (Lemercier *et al.* 2003).

D'autres travaux mettent en évidence une accumulation d'uranium différente en fonction du mode d'exposition à la fois quantitative et spatiale. Ainsi après inhalation, une accumulation d'uranium est observée dans le lobe frontal et la quantité retrouvée dans les bulbes olfactifs est plus importante qu'après injection d'uranium chez le rat (Tournier *et al.* 2009). Une seconde étude suggère un transfert de l'uranium des voies nasales vers les bulbes olfactifs *via* le liquide céphalo-rachidien le long du nerf olfactif après instillation d'uranium chez le rat (Ibanez *et al.* 2013). Enfin, d'autres travaux proposent un possible transfert *via* des transporteurs du fer (TfR ou DMT-1) (Fitsanakis *et al.* 2006).

a. Effets sur le comportement

Après exposition aiguë, une altération transitoire de la mémoire est observée chez le rat suite à une injection unique d'uranium (1 mg/kg, i.m) (Barber *et al.* 2007). L'équipe de Briner a décrit des modifications neuromotrices chez le rat suite à l'ingestion d'eau contaminée par l'UA (75 ou 150 mg/L) pendant 2 semaines (Briner *et al.* 2005).

En cas de contamination chronique à l'UE (40 mg/L soit 2,67 mg/kg/jour pendant 9 mois), une modification du comportement et du cycle veille/sommeil (Lestaevel *et al.* 2005) ainsi qu'une augmentation de l'anxiété et une réduction des capacités de mémoire spatiale et ont été observées chez le rat (Houpert *et al.* 2005). En revanche, ces effets ne sont pas décrits suite à une contamination chronique par l'UA.

b. Effets sur les neurotransmetteurs

Les quantités des différents neurotransmetteurs ont été étudiés suite une contamination par l'uranium. Ainsi, Barber *et al.* observent après injection unique d'uranium, que la concentration de dopamine est diminuée avant un retour à la normale au bout du 7ème jour (Barber *et al.* 2007).

La voie cholinergique a également été étudiée. L'activité de l'acétylcholinestérase est augmentée au niveau cortical chez des rats traités par injection IM d'acétate d'uranyle pendant 7 jours (Abou-Donia *et al.* 2002). Suite à une contamination *via* l'eau de boisson pendant 1,5 ou 9 mois, l'UA (40 mg/L) entraîne des perturbations des monamines (Bussy *et al.* 2006) et plus particulièrement une diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase et du taux d'acétylcholine dans le cortex de rat (Bensoussan *et al.* 2009).

c. Etudes épidémiologiques

Lors de la guerre du Golfe, les militaires ont été exposés à l'UA par inhalation lors des combats mais également suite à des blessures provoquées par des éclats d'obus. Des études épidémiologiques ont été réalisées sur des cohortes de vétérans mettant en évidence l'apparition de perturbations cognitives 7 ans après la fin de la guerre (McDiarmid *et al.* 2000). Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés lors des études épidémiologiques menées 12 à 18 ans après cette première étude (McDiarmid *et al.* 2011 ; McDiarmid *et al.* 2009 ; McDiarmid *et al.* 2007 ; McDiarmid *et al.* 2006 ; Squibb *et al.* 2006).

5. Système reproducteur et développement

Les éventuels effets d'une contamination par l'uranium sur le système reproducteur tant chez le mâle que chez la femelle et sur le développement fœtal ont été investigués.

L'étude de la fertilité chez des rats mâles contaminés à 40 mg/kg/j *via* l'eau de boisson pendant 3 mois a montré une diminution du nombre de spermatozoïdes accompagnée d'une altération tissulaire des testicules (Linares *et al.* 2005).

Chez la souris femelle, une modification de la maturation des ovocytes a été décrite suite à une contamination par ingestion de 1 à 96 mg/kg/j pendant 15 à 49 jours (Arnault *et al.* 2008 ; Feugier *et al.* 2008 ; Kundt *et al.* 2009) de nitrate d'uranyle. Arnault *et al.* ont également montré qu'une contamination interne par l'uranium induit des modifications de la folliculogénèse.

Raymond-Wish *et al.* ont observé une augmentation du poids utérin et de la taille des cellules épithéliale de la lumière vaginale et une réduction du nombre de follicules primaires suite à une contamination au nitrate d'uranyle (0,12 µg à 6,7 mg/kg/j) pendant 30 jours. Ces altérations sont corrigés en cas d'administration concomitante d'un anti-oestrogénique (Raymond-Whish *et al.* 2007). L'uranium agirait, d'après les auteurs, comme un agoniste des récepteurs oestrogéniques.

Le stade embryo-fœtal est le stade du développement le plus sensible à la contamination par l'uranium. En effet, l'équipe de Paternain a observé un fort taux de létalité embryonnaire et une croissance plus lente des nouveaux-nés après une contamination des souris mâles et des femelles avant l'accouplement puis durant la gestation et la lactation à de fortes concentrations d'acétate d'uranyle *per os* à 5, 10 et 25 mg/kg par jour (Paternain *et al.* 1989).

Une étude multi-générationnelle a été réalisée sur les parents (F0) puis les souriceaux (F1) contaminés par l'alimentation à l'UA à différentes doses (0, 4 ou 40 mg/kg/j) pendant 4 mois. La quantité d'uranium mesurée dans le rein est plus importante à la génération F1 que chez les parents. De même, les modifications observées telles que des anomalies du sperme sont plus marquées chez la génération F1 (Hao *et al.* 2009 ; Hao *et al.* 2012a).

Chez l'Homme, une étude épidémiologique menée sur des mineurs de Namibie a montré une diminution de la concentration circulante de testostérone sans pour autant montrer d'effet majeur sur les fonctions de reproduction de ces travailleurs (Zaire *et al.* 1997). Chez le personnel féminin du nucléaire, l'augmentation du nombre de fausses couches n'a pas pu être corrélée à l'exposition à l'uranium (Doyle *et al.* 2000).

D'après Hindin *et al.* un éventuel effet tératogène de l'uranium ne serait pas à exclure même si des études complémentaires sont nécessaires pour le démontrer (Hindin *et al.* 2005).

6. Les poumons

Le système respiratoire est la première cible de contamination par inhalation : seules les particules les plus fines atteignent les alvéoles pulmonaires (Petitot *et al.* 2013). En cas d'accumulation, le poumon peut être confronté à une toxicité chimique de l'uranium d'une part, et à sa radiotoxicité d'autre part. L'étude de la toxicité de l'uranium au niveau pulmonaire concerne majoritairement les travailleurs du nucléaire.

Les effets de l'uranium au niveau pulmonaire seraient dus à une réaction inflammatoire activant des cytokines pro (Interleukine-8 (Il) et Tumor Necrosis Factor (TNFα) et anti-inflammatoires (IL-10) (Lang *et al.* 1994 ; Monleau *et al.* 2006b ; Pasanen *et al.* 1995).

Des expositions chroniques à l'hexafluorure d'uranium (13mg/m^3), à raison de 6 heures par jour durant 30 jours peuvent provoquer entre autres des œdèmes pulmonaires et une inflammation des bronches chez différentes espèces animales (ATSDR 2013).

Des études épidémiologiques ont montré une augmentation des fibroses pulmonaires chez des mineurs (Archer *et al.* 1998) sans toutefois constater une augmentation de la mortalité par maladies respiratoires chez ces travailleurs par rapport aux populations non exposées (Tirmarche *et al.* 2004).

7. Autres organes

a. L'intestin

Le franchissement de la barrière intestinale par l'uranium se fait au niveau de l'intestin grêle, certainement par passage transcellulaire (Dublineau *et al.* 2005). Dans le cas d'une exposition aiguë chez le rat à de l'UA (204 mg/kg, *per os*, 1et 3 jours), aucune toxicité intestinale n'est observée (Dublineau *et al.* 2006). Après contamination chronique par l'UA (40 mg/L soit 2,67 mg/kg/j), le statut immunitaire de l'intestin est modifié. En effet, une accumulation de l'uranium est observée au niveau des plaques de Peyer. Parallèlement une augmentation de la densité des neutrophiles et une diminution des macrophages et mastocytes intestinaux sont observées sans altération du fonctionnement des plaques de Peyer (Dublineau *et al.* 2007) .

b. La peau

La contamination cutanée par l'uranium peut entrainer des altérations des tissus telles qu'une atrophie de l'épiderme observée quelques minutes après application de nitrate d'uranyle chez le rat (De Rey *et al.* 1983). Dans le cas d'une application quotidienne d'uranium (0,012 g/j) pendant 30 jours chez le rat, une diminution de l'épaisseur de la peau ainsi qu'une augmentation de sa perméabilité sont observées (Ubios *et al.* 1997).

c. Le système cardio-vasculaire

Il existe peu de données concernant les effets d'une exposition à l'uranium sur le système cardio-vasculaire. Deux études réalisées chez l'animal ont montré qu'une contamination à l'uranium n'entrainait pas de perturbations du système cardio-vasculaire (Craft *et al.* 2004 ; Maynard *et al.* 1949). Une étude épidémiologique récente réalisée sur une cohorte de travailleurs du nucléaire français suggère que l'exposition à l'uranium pourrait entrainer une augmentation de la mortalité suite à une pathologie circulatoire telle qu'une ischémie cerébro-vasculaire ou une ischémie cardiaque (Guseva Canu *et al.* 2012).

G. Mécanismes de toxicité de l'uranium

Dans cette partie, seront détaillés les différents mécanismes mis en jeu suite à une contamination par l'uranium tant *in vivo* qu'*in vitro* et ce indépendamment de l'organe considéré ainsi que le transport et la localisation de l'uranium au niveau cellulaire.

1. Mort cellulaire

De nombreuses études ont décrit les propriétés cytotoxiques sur l'uranium et ce sur différentes lignées. Il existe classiquement trois voies de mort cellulaire : la nécrose, l'autophagie ou l'apoptose qui sera développée dans le paragraphe suivant.

La concentration d'uranium induisant 50 % de mortalité (IC_{50}) dépend du type de cellule, de la composition de la solution d'uranium et également de sa spéciation chimique (Carriere *et al.* 2004 ; Milgram *et al.* 2008b).

En effet, l'IC_{50} est respectivement de 500 et 650 µM après 24 heures de contamination par une solution d'acétate d'uranyle sur une lignée de cellules rénales humaines HEK-293 (Prat *et al.* 2005) et HK-2 (Carriere *et al.* 2004). Dans le cas d'une solution de bicarbonate d'uranium appauvri, la concentration à partir de laquelle une mortalité après 24 heures de contamination est observée sur trois lignées humaines hépatique (HepG2), neuronale (IMR-32) et rénales (HEK-293) est respectivement de 300, 500 et 700 µM (Rouas *et al.* 2010). Dans des conditions expérimentales analogues, après 24 heures de contamination, l'IC_{50} pour des cellules rénales de rat (NRK-52E) se situe entre 500 et 600 µM (Carriere *et al.* 2004 ; Thiebault *et al.* 2007) et pour des cellules rénales d'origine porcine (LLC-PK1) aux alentours de 800 µM (Mirto *et al.* 1999b ; Muller *et al.* 2006).

Les analyses réalisées sur des cellules issues d'un ostéosarcome de rat (ROS 17/2.8) ont également montré une différence de l'IC_{50} en fonction de la solution d'uranium (Milgram *et al.* 2008b). Ainsi, après 24 heures d'exposition, l'IC_{50} est de 250 µM dans le cas d'une solution d'uranium-citrate tandis qu'elle est de 400 µM pour une solution d'uranium-acétate.

2. Apoptose

Des études réalisées chez le rat ont montré suite à l'injection IV (5mg/kg pendant 28 jours) ou à l'ingestion (UA, 40 mg/L, 9 mois) d'uranium une augmentation du nombre de cellules apoptotiques *via* le nombre de cellules marquées positivement au TUNEL (technique d'immunomarquage mettant en évidence la fragmentation d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) au niveau cellulaire) dans les cellules de différentes structures rénales : les tubules (Sano *et al.* 2000) et la jonction medullo-corticale (Berradi *et al.* 2008). Sano *et al.* observent une augmentation de cellules apoptotiques au premier jour suivant l'injection pour atteindre un pic 5 jours après l'injection. Cette augmentation rapide de l'apoptose participerait, selon les auteurs, à l'apparition de l'insuffisance rénale aiguë induite par l'injection d'uranium avec dans un second temps (J15 après l'injection), une régulation de l'apoptose *via* la voie Bax/Bcl-2.

Enfin, une étude récente a montré qu'après injection d'uranium (s.c, 0,1-2 mg/kg de PC), le nombre de cellules tubulaires proximales apoptotiques mises en évidence par le marquage TUNEL augmente proportionnellement avec l'âge (Homma-Takeda *et al.* 2013).

Des études *in vitro* montrent également une activation de l'apoptose suite à une contamination par l'uranium. En effet, l'activité des caspases 3 et 9 est augmentée dès respectivement 200 et 600 µM après 24 heures d'exposition sur des cellules rénales de rat (NRK-52E) (Thiebault *et al.* 2007).

Une activation dose dépendante des caspases 3 et 8 après respectivement 8 et 3 heures d'exposition à l'uranium (250-1000 µM) est observée sur des cellules épithéliales pulmonaires de rat ainsi qu'une augmentation des cellules apoptotiques après 24 heures d'exposition à 1000 µM d'uranium (Periyakaruppan *et al.* 2009).

L'activité de la caspase 3 est aussi augmentée chez des macrophages alvéolaires de rat après 24 heures de contamination à 25 µM d'uranium (Orona *et al.* 2012) mais également après 4 et 8 jours d'exposition à une solution de 50 µM d'uranium pour des cellules humaines fœtales d'ovaires et de testicules respectivement contaminées pendant 4 et 8 jours (Angenard *et al.* 2011).

En cas d'exposition pendant 2 heures à 100 µM d'uranium, l'Annexin V, qui est utilisée comme marqueur précoce d'apoptose, est augmentée après 2 heures d'exposition sur des macrophages de souris (Kalinich *et al.* 2002).

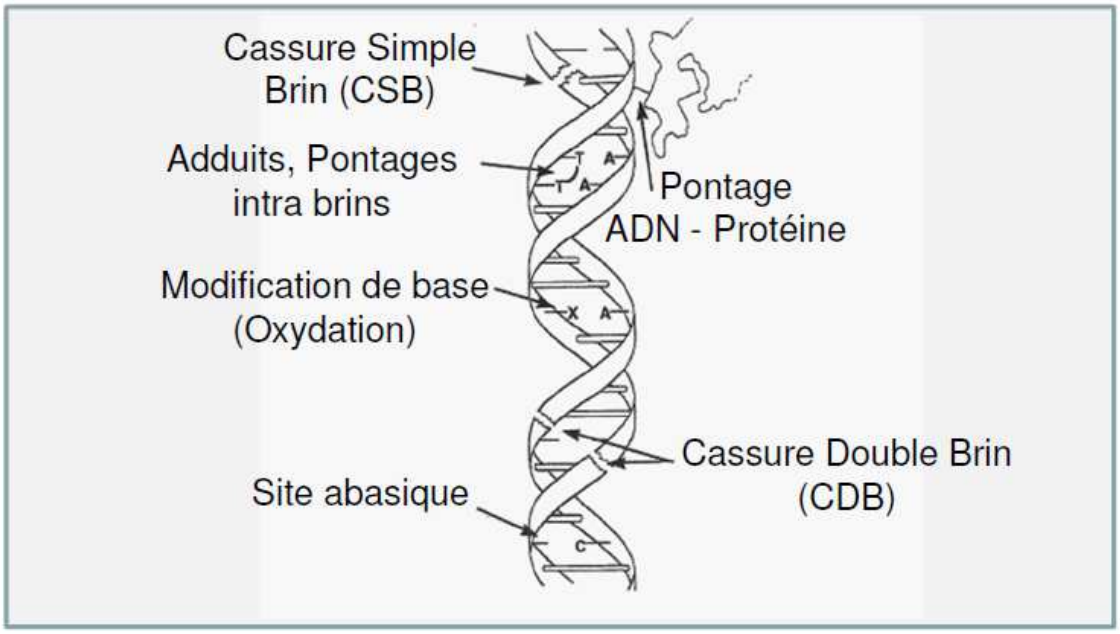

Figure 7 : Les différents dommages à l'ADN

Marqueurs	Paramètres recherchés
Activité mutagène	Test d'Ames (analyse qualitative et quantitative des mutations)
Anomalies cytogénétiques	Test du micronoyau (indicateur de la rupture d'un chromosome)
	Echange de chromatides sœur
	Aberration chromosomique
Altération primaire de l'ADN	Test Comètes (cassures simple et double brins)
Formation d'adduits (ADN, protéines, hémoglobine)	Détecter les liaisons entre le toxique et les macromolécules

Tableau 2 : Marqueurs de génotoxicité

3. Génotoxicité

L'uranium, à l'instar d'autres radioéléments et métaux lourds, peut entrainer une instabilité génomique se manifestant notamment par des dommages à l'ADN *(cf. Tableau 2, Figure 7)* tels que des cassures double-brin de l'ADN, la formation de micronoyaux ou encore des aberrations chromosomiques (translocation, chromosomes dicentriques).

Ainsi, suite à une contamination par voie orale (4-40 mg/kg/j) pendant 4 mois chez des rats, une augmentation de la fréquence des micronoyaux a été observée au niveau des cellules de la moelle osseuse (Hao *et al.* 2009). Une augmentation des cassures de l'ADN est observée sur des cellules broncho-alvéolaires de rat ayant inhalé des particules de dioxyde d'uranium (Monleau *et al.* 2006a ; Monleau *et al.* 2006b) mais aussi sur des globules rouges de poisson zèbre contaminé par l'uranium (Barillet *et al.* 2011).

De nombreuses études *in vitro* se sont également intéressées à l'augmentation des aberrations chromosomiques suite à une contamination par l'uranium. En effet, après 24 heures d'exposition à 10 µM d'UA, la transformation cancéreuse de cellules humaines ostéoblastiques immortalisées (HOS) a été observée (Miller *et al.* 1998), et des études complémentaires ont montré une augmentation des micronoyaux, des chromosmes dicentriques et des cassures de brins d'ADN sur les cellules HOS après exposition à l'uranium (Miller *et al.* 2003 ; Miller *et al.* 2002b ; Miller *et al.* 2002c).

Une augmentation des cassures simple et double brins d'ADN a aussi été décrite après 24 heures d'exposition sur des cellules rénales (NRK-52E) contaminées à 300 µM d'uranium (Thiebault *et al.* 2007) et sur des cellules d'ovaires de hamster contaminées à 200 µM d'uranium (Stearns *et al.* 2005). Dans cette dernière étude, la formation d'adduits à l'ADN a également été observée.

Chez l'Homme, des études ont montré une augmentation des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes circulants chez des mineurs d'uranium qui serait liée à l'exposition au radon, gaz omniprésent provenant de la chaîne de désintégration de l'uranium (Meszaros *et al.* 2004 ; Wolf *et al.* 2004).

Espèces	Voie d'administration	Concentrations	Durée	Composé	Organes	Effet	Référence
Rat	IP	0,5 mg/kg	5 jours	Nitrate d'uranyle	Rein	↗ Peroxydation lipidique ↗ Activité SOD ↗ Activité GPx ↘ Activité CAT	Banday 2007
Rat	SC	5 mg/kg	2 jours	Acétate d'uranyle dihydraté	Rein	↗ Peroxydation lipidique ↗ Activité SOD	Belles 2007
Rat	IP	0,5 mg/kg	5 jours	Nitrate d'uranyle	Cortex et médulla (rein)	↗ Peroxydation lipidique ↗ Activité SOD ↗ Activité GPx ↘ Activité CAT	Priyamvada 2010
Rat	IP	576 µg/ kg	3 jours	Nitrate d'uranyle	SNC & Os	↗ Peroxydation lipidique	Gosh 2007
Rat	Inhalation	37 mg/m3	3h pendant 14 jours	UA	BAL	↗ Peroxydation lipidique	Monleau 2006
Souris	IP	5 mg/kg	2 jours	UA	Rein	↘ Expression génique SOD1	Taulan 2006
Souris	IP	5 mg/kg	5 jours	Uranium	Foie & Rein	↘ Glutathion total ↗ Peroxydation lipidique	Yapar 2010

Tableau 3 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant après exposition aiguë chez le rongeur

4. L'équilibre pro/anti-oxydant

Des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur différents modèles démontrant l'implication du stress oxydant sans pour autant élucider les mécanismes complets.
L'équilibre pro/anti-oxydant sera développé dans la seconde partie de l'introduction avec notamment les marqueurs pro-oxydants tels que la peroxydation lipidique ; et les fonctions des anti-oxydants enzymatiques (Superoxydes dismutases (SOD), Catalase (CAT), Glutathion Peroxydase (GPx), Glutathion Reductase (GR), Glutathion-S-Transferase (GST) ainsi que le glutathion réduit (GSH) ou oxydé (GSSG) cités ci-après *(II.B p. 127)*.

a. Exposition aiguë

Suite à une exposition aiguë *(Tableau 3)*, à raison de 5 mg/kg d'uranium en injection s.c unique chez le rat, une augmentation de l'activité de la SOD et de la peroxydation lipidique au niveau rénal ont été décrites (Belles *et al.* 2007). Des résultats analogues ainsi qu'une diminution de l'activité de la CAT et une augmentation de celle de la glutathion peroxydase GPx sont également observées au niveau tubulaire chez des rats 5 jours après avoir reçu une injection i.p unique d'uranium à la dose de 0,5 mg/kg de PC (Banday *et al.* 2008). Dans des conditions expérimentales similaires, Priyamvada *et al*. ont retrouvé ces mêmes modifications et également observé une augmentation de l'activité de la GPx au niveau du rein (cortex et médulla) (Priyamvada *et al.* 2010).
Chez la souris, des travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré qu'après injection i.p de 0,5 mg/kg/jour de nitrate d'uranyle pendant 2 jours une diminution de l'expression génique de la cuivre, zinc SOD dans le rein est observée (Taulan *et al.* 2006). De plus, après 5 jours de contamination à l'uranium par gavage (5 mg/kg de PC), le taux de glutathion total est diminué et la peroxydation lipidique augmentée au niveau rénal chez la souris (Yapar *et al.* 2010).
En parallèle, des études ont été conduites sur d'autres organes mettant également en évidence une perturbation de l'équilibre pro/anti-oxydant. Ainsi Yapar *et al*. ont étudié le foie où ils observent les mêmes modifications qu'au niveau rénal (Yapar *et al.* 2010).

Espèces	Voie d'administration	Concentrations	Composé	Durée	Organe	Effet	Référence
Rat	orale	2,6 mg/kg/j	UA	9 mois	Cortex rénal	La contamination ne renforce pas les effets observés suite au co traitement par la gentamicine	Poisson 2013
Rat	orale	10, 20 et 40 mg/kg/j	Acétate d'uranyle dihydraté	3 mois	Rein	↗ Peroxydation lipidique à 40 mg/kg	Linares 2006
Rat	orale	10, 20 et 40 mg/kg/j	Acétate d'uranyle dihydraté	3 mois	Testicules	↗ Activité SOD (20 et 40 mg/kg) ↘ Activité CAT (10,20 et 40 mg/kg) ↘ Activité GR (40 mg/kg) ↘ GSH (10 et 20 mg/kg)	
Rat	orale	10, 20 et 40 mg/kg/j	Acétate d'uranyle dihydraté	3 mois	Cortex cérébral	↘ Activité GPx (40 mg/kg)	Linares 2007
					Cervelet	↗ Peroxydation lipidique (10, 20 et 40 mg/kg) ↗ Activité GPx (40 mg/kg) ↘ GSH (10, 20 et 40 mg/kg) ↗ GSSG (10, 20 et 40 mg/kg)	
					Hippocampe	↘ GSH (20 et 40 mg/kg)	
Rat	orale	2,6 mg/kg/j	UE	9 mois	SNC	↗ Peroxydation lipidique ↘ Expression génique GPx, CAT, SOD	Lestaevel 2009
Rat	orale	2,6 mg/kg/j	UA	9 mois	SNC	↗ Expression génique GPx, CAT, SOD	
Souris	orale	13 et 26 mg/kg/j	UA	4 mois	Rein	↗ Peroxydation lipidique	Taulan 2004

Tableau 4 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant après exposition chronique chez le rongeur

Chez le rat, une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau du SNC et de l'os a été observée après injection i.p de 576 µg/kg de PC pendant 3 jours (Ghosh *et al.* 2007) ainsi qu'au niveau pulmonaire 14 jours après l'inhalation de particules d'UA(375 $mg.m^{-3}$) pendant 3 heures (Monleau *et al.* 2006b) .

b. Exposition chronique

Après exposition chronique *(Tableau 4)* chez le rat (9 mois, 2 mg /kg/jour *via* l'eau de boisson), l'expression génique de la CAT, SOD et GPx au niveau du SNC est augmentée après exposition à l'UA alors qu'elle est diminuée après exposition l'UE (Lestaevel *et al.* 2009). Un stress oxydant est également décrit après exposition à des concentrations plus fortes d'uranium (10, 20 et 40 mg/kg/j) chez le rat pendant 3 mois au niveau rénal et testiculaire (Linares *et al.* 2006).

Une augmentation de la peroxydation lipidique rénale chez les rats ayant ingéré la plus forte concentration d'uranium est observée. Une augmentation de l'activité de la SOD dès 20 mg/kg/jour ainsi qu'une diminution du GSH (10 et 20 mg/kg), de la CAT (10, 20 et 40 mg/kg) et de la GR (40mg/kg) ont été observées au niveau des testicules. Dans des conditions expérimentales analogues, Linares *et al.* ont également observé des modifications des enzymes anti-oxydantes au niveau cérébral (cortex, cervelet et hippocampe) (Linares *et al.* 2007). Dans le cas d'une contamination chronique chez la souris (13 et 26 mg/kg/j, 4 mois), une augmentation de la peroxydation lipidique dans les reins a été décrite (Taulan *et al.* 2004).

c. Autres espèces

Ces perturbations induites par l'uranium sur la balance pro/anti-oxydante ont aussi été étudiées sur d'autres espèces animales. Les travaux de Barillet *et al.* ont mis en évidence une diminution de l'activité de la SOD au niveau hépatique chez le poisson zèbre après 20 jours dans de l'eau à une concentration en UA ou en UE de 100 µg/L (Barillet *et al.* 2007). Une diminution de l'activité de la CAT a aussi été décrite après 3 jours dans de l'eau à une concentration en UA de 20, 100 et 500 µg/L (Barillet *et al.* 2011).

cellules	composé	concentration	temps d'exposition	Effet	Auteur
cellules épithéliales de rat	Nitrate d'uranyle	250-500 µM	24 heures	↗ Peroxydation lipidique ↘ Expression génique SOD	Periakaruppan 2007
Macrophages alvéolaires de rat	UA	12,5 µM	24 heures	↗ EROs	Orona 2012
cellules rénales de rat	UA	≥ 300 µM	20 heures	↗ EROs	Thiébault 2007
Hépatocytes primaires de rat	Uranium	50 µM	3 heures	↘ GSH ↗ EROs ↗ TBARS	Pourahmad 2006 et 2011
Mitochondries de rein de rat	Uranium	50, 100 et 200 µM	2 heures 1 heure	↗ EROs ↗Potentiel membranaire mitochondrial	Shaki 2012
Mitochondries de cerveau de rat	Uranium	50, 100 et 200 µM	1 heure	↗ ibération du cytochrome c ↗ Peroxydation lipidique	Shaki 2013

Tableau 5 : Effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant au niveau cellulaire

De même, chez l'écrevisse (*Procambarus Clarkii*), une diminution de l'expression génique de la Mn SOD et des activités de la GPx et de la GST ont été observées au niveau des branchies après respectivement 4 et 60 jours dans une eau contenant 30 µg/L d'UA (Al Kaddissi *et al.* 2012a ; Al Kaddissi *et al.* 2012b).

d. Etudes *in vitro*

Par ailleurs, des études *in vitro* ont été réalisées et confirment les effets observés *in vivo* *(Tableau 5)*. Une exposition pendant 24 heures à différentes concentrations d'UN (250, 500, 1000µM) induit une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution de l'expression génique de la SOD sur des cellules épithéliales pulmonaires de rat (Periyakaruppan *et al.* 2007). Dans le cas de macrophages alvéolaires de rat, pour de faibles concentrations d'UA (dès 12,5 µM), une augmentation de la production d'anions superoxydes est observée après 24 heures d'exposition (Orona *et al.* 2012).
Thiebault *et al.* ont observé une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) par les cellules rénales NRK-52E, après exposition pendant 20 heures à des concentrations supérieures à 300 µM d'UA (Thiebault *et al.* 2007).

L'équipe de Pourahmad a mis en évidence une augmentation de la production d'EROs et des Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) et une diminution du GSH sur des hépatocytes primaires de rats mis en présence d'uranium (50 µM) pendant 3 heures ainsi qu'une toxicité mitochondriale et lysosomale liée à un mécanisme faisant intervenir les EROs (Pourahmad *et al.* 2006 ; Pourahmad *et al.* 2011).
Afin d'approfondir la voie mettant en jeu une toxicité mitochondriale impliquant les EROs, Shaki *et al.* ont réalisé une étude sur la mitochondrie rénale en utilisant une double approche : *vivo* et *vitro* (Shaki *et al.* 2012). Ils ont ainsi confirmé que la contamination par l'uranium induit des modifications du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment le transfert d'électrons entre les complexes II et III, entraînant une augmentation de la production d'EROs. Des effets similaires sur la mitochondrie ont aussi été décrits au niveau du cerveau chez le rat (Shaki *et al.* 2013).

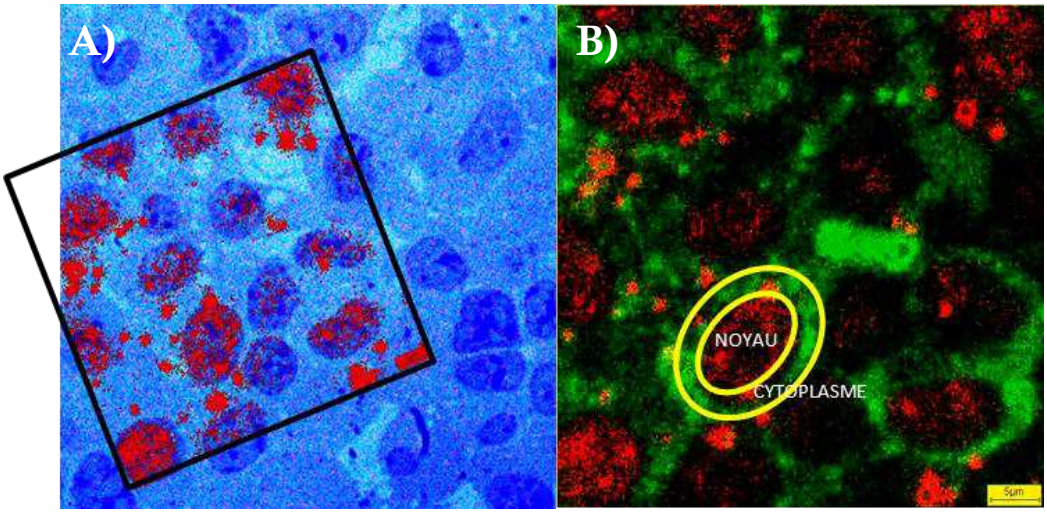

Figure 8 : Localisation cellulaire de l'uranium après exposition à l'uranium (100 µM) de cellules rénales humaine (HEK293) pendant 24 heures (Gueguen *et al.* 2012)

(A) Superposition d'image histologique (coloration au bleu de toluidine) et image SIMS (uranium en rouge) (Secondary Ion Mass Spectrometry) obtenues sur coupe minces (0,5 µm) de cellules incluent en résine Epoxy après 24 h d'exposition à l'uranium appauvri (100 µM).

(B) Superposition d'images ionique du Na^+ (vert) et $^{238}U^+$ (rouge) obtenues par analyse SIMS sur coupe minces (0,5 µm) de cellules inclues en résine Epoxy après 24 h d'exposition à l'uranium appauvri (100 µM).

Les différents mécanismes d'action précédemment développés : apoptose, génotoxicité et stress oxydant, supposent la présence d'uranium dans les cellules. C'est pourquoi des études ont été entreprises au sujet de la localisation de l'uranium, de sa forme physico-chimique et des transporteurs impliqués dans l'entrée du radioélément dans la cellule.

5. Localisation de l'uranium

La présence d'uranium a tout d'abord été mise en évidence au niveau intra-cellulaire, sous forme de dépôts appelés « uraniosomes », mais également au niveau extra-cellulaire chez le lapin (Ghadially *et al.* 1982a ; Ghadially *et al.* 1982b) et dans les cellules lymphoblastiques humaines (Ghadially *et al.* 1982c). Des études plus récentes viennent compléter ces résultats grâce à de nouvelles techniques d'imagerie. Ainsi, sur des cellules osseuses humaines (ROS 17/2.8) et des cellules rénales de rat (NRK-52E) ou porcines (LLC-PK1), des précipités d'uranium ont été observés par microscopie à transmission électronique (MET) et à balayage (MEB) après 24 heures d'exposition à une concentration respective de 400, 600 et 1000 µM d'uranium (Carrière *et al.* 2005 ; Milgram *et al.* 2008a ; Mirto *et al.* 1999a).

La composition chimique de ces précipités, étudiée par analyse de microfluorescence X, montre qu'ils seraient composés de potassium, phosphate et soufre complexés à l'uranium (Carrière *et al.* 2008 ; Ghadially *et al.* 1982a ; Mirto *et al.* 1999b ; Muller *et al.* 2006).

Une étude récente a mis en évidence, grâce à la technique d'imagerie SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), la présence d'uranium sous forme « soluble » dans les noyaux des cellules hépatiques et rénales dès 50 µM et également sur des cellules neuronales à 100 µM après 24 heures d'exposition (Rouas *et al.* 2010).

Selon sa concentration, l'uranium peut donc se présenter dans les cellules sous deux « formes » : soluble ou précipité. L'apparition des précipités était jusqu'à maintenant décrite pour de fortes concentrations en uranium, supérieures à l'IC 50 *(cf.G p. 99)*. En effet, l'équipe de Carrière observe la formation de précipités après 24 heures d'exposition à 600 µM d'uranium, cette concentration correspondant à l'IC 50 des NRK-52E (Carriere *et al.* 2004 ; Carrière *et al.* 2008). Les travaux de Rouas *et al.* ont montré d'une part que l'uranium pénètre dans la cellule sous forme soluble pour aller se localiser préférentiellement dans le noyau et ce pour des concentrations non cytotoxiques (10-100 µM).

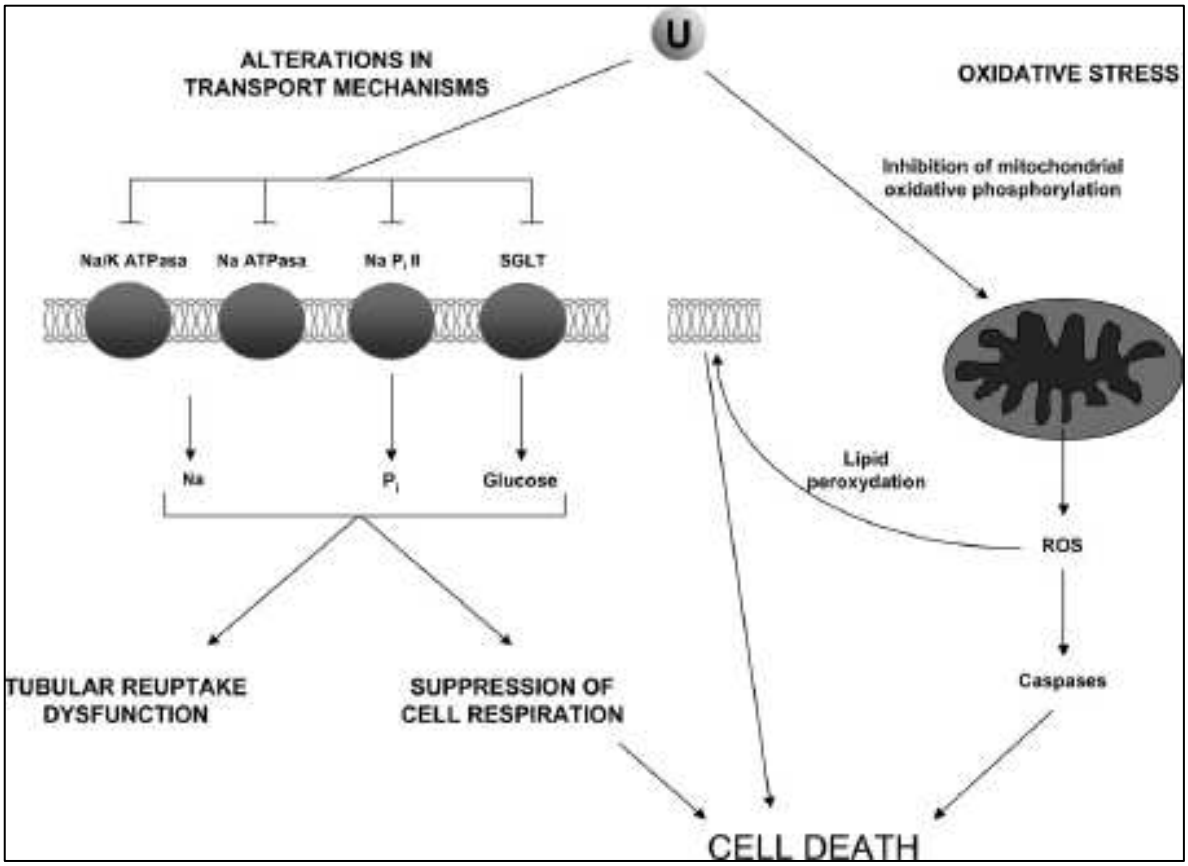

Figure 9 : Mécanismes et transporteurs qui seraient perturbés dans le cas d'une néphrotoxicité induite par l'uranium d'après Vicente *et al.* 2010

D'autre part, la formation de précipités dans le cytoplasme est également observée pour des concentrations supérieures ou égales à 100 µM *(Figure 8)* (Rouas *et al.* 2010).

6. Transport de l'uranium

Les mécanismes précédemment développés ainsi que la localisation de l'uranium au niveau cellulaire impliquent son entrée dans la cellule.

Une des hypothèses émise propose une entrée dans la cellule par endocytose (Galle 1997 ; Muller *et al.* 2008), puis l'uranium se retrouverait dans les lysosomes. L'acidification du milieu entrainerait alors la précipitation du composé dans les lysosomes (Galle 1997 ; Leggett 1989).

Muller *et al.* ont mis en évidence, sur des cellules rénales (LLC-PK1), le rôle du transporteur Na-Pi IIa, cotransporteur de phosphate dépendant du sodium, suite à une contamination par l'uranium (Muller *et al.* 2006 ; Muller *et al.* 2008) suggérant que l'uranium entrerait dans la cellule grâce à des transporteurs sodium dépendant.

D'autres transporteurs sont également perturbés en présence d'uranium. En effet, l'uranium exercerait un effet inhibiteur sur certains transports actif de sodium et de potassium tels que NaK-ATPase, Na-ATPase (Brady *et al.* 1989 ; Hori *et al.* 1985) ; et modifierait le fonctionnement des transporteurs du glucose (Goldman *et al.* 2006 ; Renault *et al.* 2010 ; Vicente-Vicente *et al.* 2010). La *Figure 9* illustre les différents transporteurs impliqués en cas de néphrotoxicité induite par l'uranium.

La compétition entre l'uranium, sous forme UO_2^{2+} et les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} pourrait également perturber les transports actifs présents sur la membrane cellulaire (Boileau *et al.* 1985 ; Lin-Shiau *et al.* 1979). Une étude de transcriptomique réalisée sur des cellules rénales (HEK-293) conforte l'éventuelle compétition uranium-calcium, l'expression de gènes codant pour la calmoduline et pour des protéines impliquées dans le transport du calcium étant modifiée suite à une exposition à de l'acétate d'uranyle (Prat *et al.* 2005).

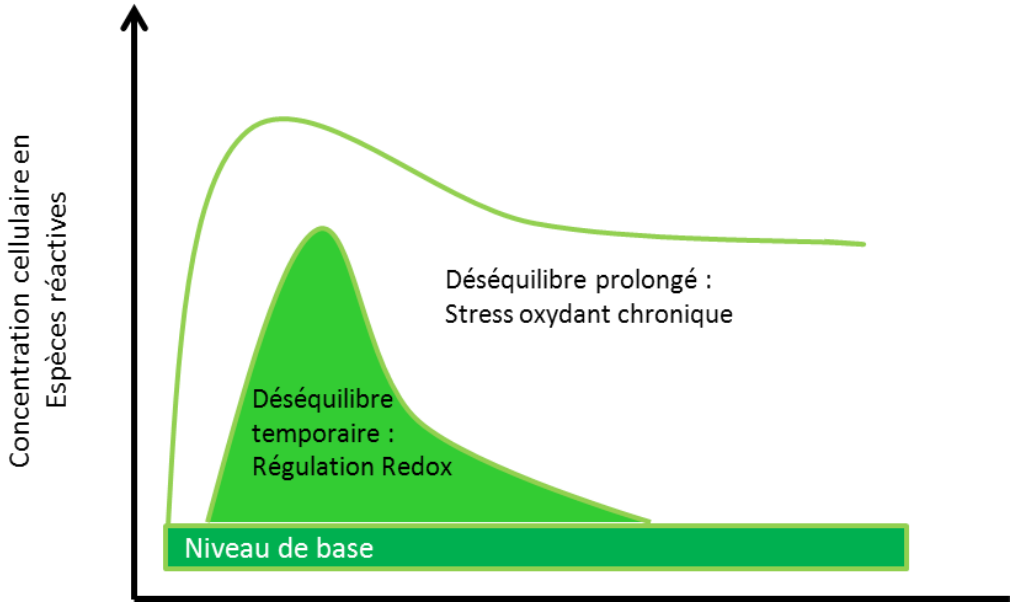

Figure 10 : Régulation de l'homéostasie Redox (d'après Dröge 2002)

Quand la concentration cellulaire d'espèces réactives augmente de façon temporaire, le système anti-oxydant compense et permet un retour à l'équilibre. En revanche, en cas d'augmentation prolongé, le système anti-oxydant est débordé entrainant un stress oxydant chronique.

II. Le système pro/anti-oxydant

Pour aborder le système pro/anti-oxydant, nous étudierons tout d'abord le stress oxydant puis le système de défense dit « anti-oxydant » et enfin leurs conséquences physiopathologiques.

A. Le stress oxydant

1. Définition

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre d'une part les espèces réactives (ER) qui sont présentes à l'état basal en faible concentration et d'autre part le système anti-oxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments, le glutathion. Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'ER. Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre entre la production d'ER et les systèmes de défense (Delattre *et al.* 2007).

Cette régulation, appelée équilibre redox, se fait en permanence. Dans le cas d'une faible concentration d'ER, le système anti-oxydant la compense : le déséquilibre est de courte durée. L'équilibre redox est maintenu. A l'inverse, s'il est prolongé ou permanent comme dans certaines pathologies chroniques, la concentration en ER est augmentée de façon constante, et la réponse anti-oxydant n'est plus suffisante pour la contenir : une perte de l'homéostasie redox apparait conduisant à l'apparition d'un déséquilibre avec une production d'ER forte *(Figure 10)*, c'est le stress oxydant.

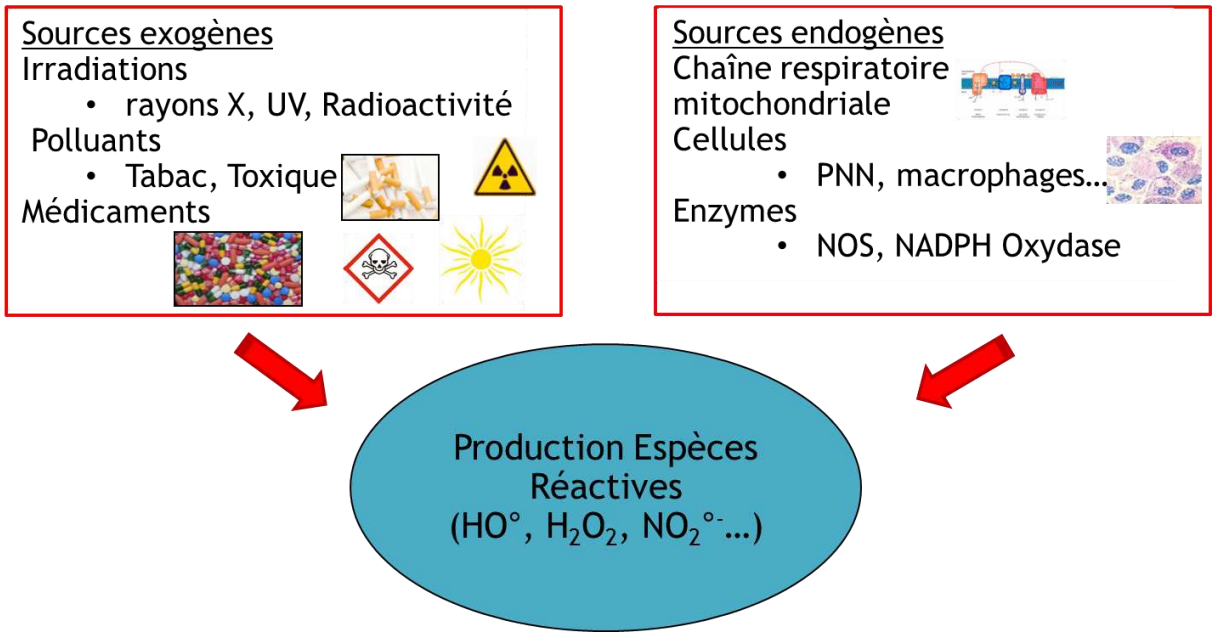

Figure 11 : Les origines des espèces réactives

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	$HO^{\cdot}$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\cdot} + HO^- + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow O_2 + HO^{\cdot} + HO^-$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2\,GSH \longrightarrow 2\,H_2O + GSSG$
Radical Peroxyle	$RO_2^{\cdot}$	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$
Hydroperoxyde	RO_2H	$RO_2^{\cdot} + RH \longrightarrow RO_2H + R^{\cdot}$

Tableau 6 : Les espèces réactives de l'Oxygène (d'après Migdal 2011)

La réaction (1) correspond à la réaction de Fenton, et la réaction (2) à la réaction d'Haber Weiss. O_2 : oxygène ; e^- : électron ; H^+ : ion hydrogène ; Fe^{2+} : ions ferreux, Fe^{3+} : ions ferriques, GSH : glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; HO^- : anion hydroxyde.

a. Les espèces réactives

Les ER se divisent en deux familles : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les espèces réactives de l'azote (ERNs).

Espèces Radicalaires		Espèces Non Radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	$HO^{\cdot}$	Acide hypochloreux	HOCl
Monoxyde d'azote	$^{\cdot}NO$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
Grande instabilité : stabilisation par réaction avec les constituants cellulaires.		Eléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes de défense enzymatique.	

Tableau 7 : Les principales espèces réactives

Comme indiqué dans le *Tableau 7* elles peuvent être de nature radicalaire ou non. Un radical se définit comme une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique lui conférant ainsi une grande réactivité.
La production d'ER peut être soit d'origine endogène soit due à des facteurs exogènes tels que les métaux lourds, les rayonnements ionisants et les rayons ultra-violets, les polluants atmosphériques tels que la fumée de cigarette mais également des médicaments (paracétamol, anthracyclines…) *(Figure 11)*.

a.1 Les espèces réactives de l'oxygène

✷ **Origines**

Les EROs sont majoritairement produites par la NADPH oxydase (NOX) membranaire et les enzymes du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale.
Plusieurs étapes réactionnelles successives conduisent à la formation d'une molécule d'eau à partir d'oxygène comme le montre le
Tableau 6. La première étape conduit à la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$).

Au niveau mitochondrial, près de 2% de l'oxygène consommé est transformé en $O_2^{\cdot-}$. A partir de ce radical dit primaire, d'autres EROs sont formées telles que le radical hydroxyle $HO^{\bullet\cdot}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ce dernier réagit avec le fer, sous forme Fe^{2+} pour former du $HO^{\bullet\cdot}$et du fer ferrique (Fe^{3+}) : c'est la réaction de Fenton. Puis le fer ferrique est réduit en fer ferreux par $O_2^{\cdot-}$.L'ensemble de ces réactions forme la réaction d'Haber Weiss.

Il existe une autre source de production d'EROs *via* la NOX qui est une enzyme catalysant la réaction suivante :

$NAD(P)H + 2\ O_2 \rightarrow NAD(P)^+ + H^+ + 2\ O_2^{\cdot-}$ où le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate NAD(P)H sert de donneur d'électrons.

La xanthine oxydase, enzyme cytosolique qui catalyse l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine lors du métabolisme des purines, ainsi que les enzymes de la cascade de l'acide arachidonique. Les enzymes présentes dans le noyau et différentes organites (réticulum endoplasmique, lysosomes…) peuvent également être source d'EROs (Migdal *et al.* 2011).

✷ Rôles physiologiques

La production de grande quantité d'$O_2^{\cdot-}$ par la NOX dans les cellules phagocytaires en cas d'inflammation représente une première barrière de défense vis-à-vis des agents pathogènes : c'est « le burst oxydatif ». Il y a une production massive d'EROs par les macrophages, les neutrophiles activés *via* la NOX. Celle-ci étant également présente dans les cellules non phagocytaires, les EROs produits interviennent dans la régulation de voies de signalisations intracellulaires (Migdal *et al.* 2011).

Les EROs interviennent également dans les phénomènes d'apoptose en induisant notamment une oxydation de l'ADN entraînant la production de protéines pro-apoptotiques.

Ces différents rôles physiologiques des EROs illustrent le fait que l'oxygène est nécessaire à la vie des organismes vivant en aérobiose. Mais à travers ses espèces réactives, il est également toxique : c'est le « paradoxe de l'oxygène ». Afin de lutter contre les EROs, les organismes vivants ont dû développer des mécanismes de défense.

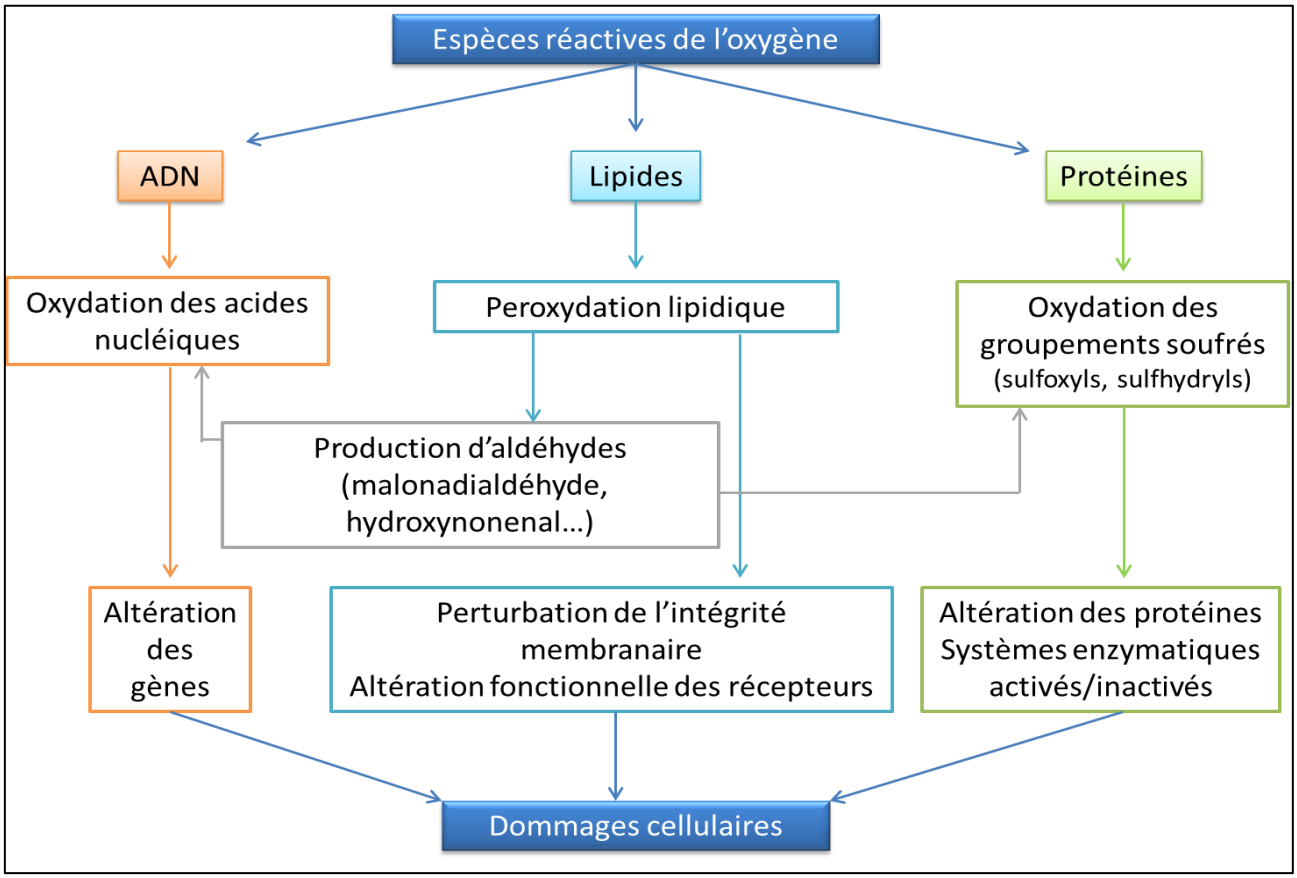

Figure 12 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Monteil 2004)

a.2 Espèces réactives de l'azote

✷ Origines

Le monoxyde d'azote, $^{\bullet}NO$, est produit au niveau cellulaire à partir d'arginine et d'oxygène. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les $^{\bullet}NO$ synthases (NOS). Il existe trois types de NOS : la NOS neuronale, la NOS endothéliale et la NOS inductible présente dans de nombreux tissus et organes. Les deux premières sont constitutives ; leur activité est régulée par la concentration intracellulaire de calcium. Le $^{\bullet}NO$ peut être converti en ion nitrosium (NO^{+}), en anion nitroxyl (NO^{-}) ou en peroxynitrite ($ONOO^{-}$).

✷ Rôles physiologiques

Le $^{\bullet}NO$ est un agent vasodilatateur qui intervient dans la relaxation des muscles lisses. Au niveau cardiaque, il peut modifier la contraction cardiaque en modulant les flux calciques. Le $^{\bullet}NO$ intervient également dans les phénomènes de neurotransmission et les réactions inflammatoires en tant qu'agent cytotoxique. C'est aussi un agent anti-apoptotique qui stimule la production de protéines anti-apototiques dont Bcl-2.
Par la suite, le terme EROs regroupe les espèces réactives de l'azote et de l'oxygène.

b. Cibles biologiques

En raison de leur grande réactivité, les EROs peuvent s'attaquer à de nombreuses cibles biologiques dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques comme le montre la *Figure 12*.

b.1 Acides nucléiques

Les ERs, et plus particulièrement le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les EROs peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'–deoxyguanosine (8-OH-dG) qui peut être ensuite mesuré comme marqueur de stress oxydant.

Ces modifications vont ainsi perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagénèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (Valko *et al.* 2006).

b.2 Protéines et acides aminés

L'oxydation des protéines et des acides aminés par les EROs aboutit à la formation de produits carbonylés et hydroxylés. Les acides aminés soufrés dont la cystéine et la méthionine, les acides aminés basiques (arginine, leucine) et les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine sont plus particulièrement sensibles à ces phénomènes.

Il existe différents types d'oxydation :

- Attaque directe : c'est la fragmentation des protéines et formation de produits carbonylés. Ainsi la fragmentation de l'arginine aboutit à la formation de semi-aldéhyde glutamique. Ces produits de fragmentation sont impliqués dans des maladies liées à des dysfonctionnements de neurotransmetteurs comme l'épilepsie (Pearl *et al.* 2007 ; Wong *et al.* 2003).
- Lipo-oxydation : c'est la réaction d'une protéine avec un aldéhyde produit au cours de la réaction de peroxydation lipidique. L'accumulation de lipoprotéines oxydées au niveau de la paroi vasculaire et un dysfonctionnement endothélial sont notamment à l'origine de l'athérosclérose qui est une pathologie chronique d'évolution lente de l'intima des artères.
- Glyco-oxydation : les protéines vont se lier avec le glucose qui est sous forme aldéhydique. Les produits de réaction sont appelés produits de glycation avancée. Dans le cas du diabète, qui se traduit par une augmentation de la glycémie ; les tissus sont, à terme, imprégnés de glucose entraînant ainsi une hyperproduction d'EROs *via* notamment la formation de produits de glycation avancée. Les EROs en excès vont alors altérer la paroi des vaisseaux et induire des complications vasculaires : micro et macro angiopathies.

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + HO^{\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + H_2O$
Propagation	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow ROO^{\cdot}$ $ROO^{\cdot} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\cdot}$
Terminaison	$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RR$ $ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROR$ $ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2$

Tableau 8 : Réaction de peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique se déroule selon trois étapes : une première d'initiation qui aboutit à la formation d'un radical qui dans une seconde étape dite de « propagation » conduit à la formation d'un second radical. Ces deux radicaux vont réagir ensemble lors de la terminaison, troisième étape de la réaction dont les produits finaux sont des composés stables (ROOR) et de l'oxygène.

b.3 Lipides

La peroxydation lipidique correspond à l'attaque des cibles lipidiques par les EROs.

La présence d'oxygène dans le milieu est nécessaire pour initier la réaction. Les acides gras polyinsaturés, qui sont des acides gras comportant au moins deux ou trois doubles liaisons, sont très sensibles à l'oxydation.

La peroxydation lipidique est, comme le montre le *Tableau 8* une réaction en chaîne initiée par un radical qui conduit à la formation d'hydroperoxydes qui vont se dégrader en aldéhydes et altérer la membrane cellulaire pouvant entraîner une perte d'intégrité de la cellule et de ses organites (Valko *et al.* 2006). Parmi les produits finaux formés, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) ont un potentiel mutagène et cancérigène.

La peroxydation lipidique peut être évaluée par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS : Thiobarbiturics acid-reactive substances) (Lefevre *et al.* 1998).

Les isoprostanes sont les produits terminaux issus de la réaction de peroxydation lipidique de l'acide arachidonique. Ils sont chimiquement stables et éliminés par voie urinaire.

Ces deux produits d'oxydation lipidiques peuvent être utilisés comme marqueur dans le suivi de pathologie (Signorini *et al.* 2013) ou de traitement (Hockenberry *et al.* 2013).

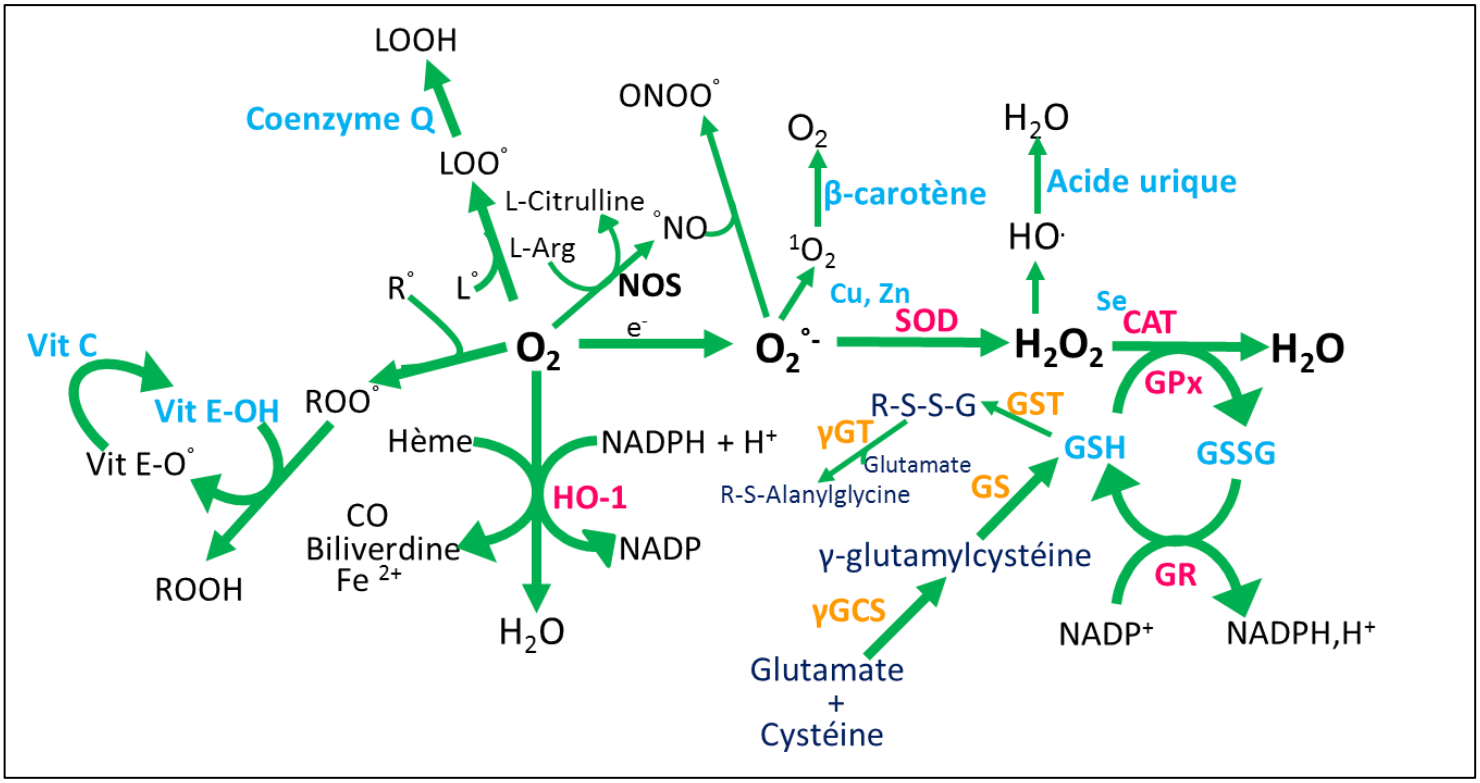

Figure 13 : Les anti-oxydants

Les couleurs utilisées permettent d'identifier les différents anti-oxydants : en rose, ce sont les enzymes anti-oxydantes, en jaune orangé celles impliquées dans la synthèse du glutathion et en bleu ciel les antioxydants naturels (vitamine, oligoéléments) ainsi que le glutathion. La synthèse du glutathion est représentée en bleu marine.

CO : Monoxyde de carbone ; Cu, Zn SOD : Cuivre, Zinc Superoxyde Dismutase ; e^- : électron ; Fe^{2+} : ions ferreux ; GS : Glutathion Synthétase ; GST : Glutathion-S-Transférase ; GR : Glutathion Reductase ; γ-GCS : Gamma-Glutamyl-Cystéine Synthétase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; HO-1 : Hème Oxygénase 1 ; L-Arg : L-Arginine ; °NO : Monoxyde d'azote ; NOS : NO Synthase ; $^1O_2$: Oxygène singulet ; Se : Sélénium ; Vit C : Vitamine C ; Vit E-OH : Vitamine E.

B. Les anti-oxydants

1. Définition

Un anti-oxydant est une substance qui, à faible concentration, prévient ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat (Halliwell *et al.* 1990). Ils ont pour rôle d'empêcher la formation de radicaux libres, de permettre leur élimination ou bien de réparer les dégâts causés par les radicaux libres.

Il existe différentes sortes d'anti-oxydants : des enzymes, des facteurs de transcription, des composés de bas poids moléculaire piégeant les radicaux libres. Parmi ces derniers, on distingue le glutathion, les vitamines (A, C, E), les polyphénols, les oligo-éléments comme le sélénium (Se), le zinc (Zn) ou le cuivre (Cu) mais aussi des protéines transportant le fer (la transferrine) ou le mettant en réserve (la ferritine).

2. Anti-oxydants endogènes enzymatiques

Dans une première partie seront détaillées les enzymes anti-oxydantes regroupant la catalase, les superoxydes dismutases et la glutathion peroxydase, ainsi que d'autres enzymes (l'hème oxygénase 1, les thioredoxines) ayant également des propriétés anti-oxydantes. Elles peuvent toutes transformer les espèces radicalaires en composé moins réactifs *(Figure 13)*.

a. La catalase

Cette enzyme, localisée dans les peroxysomes, catalyse la dismutation de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire *(Figure 13)* :

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

La catalase (CAT) est une enzyme héminique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème. Sa masse molaire moléculaire est de 220 000 Da. La CAT possède 4 sous unités comprenant chacune un atome de fer sous forme Fe^{3+}.

Elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. C'est une enzyme qui possède un turnover important : une molécule de CAT peut convertir en une minute environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Valko *et al.* 2006).

b. Les Superoxydes Dismutases

Ce sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en deux produits : l'oxygène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène *(Figure 13)* :

$$2H^+ + 2O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Elles sont présentes dans la majorité des organismes vivants et chez les eucaryotes, ce sont des enzymes ubiquitaires.

Il existe plusieurs superoxydes dismutases (SOD) qui diffèrent par leur cofacteur (Manganèse, Cuivre ou Zinc), leur structure et leur localisation cellulaire.

b.1 Cuivre, Zinc superoxyde dismutase (Cu, Zn SOD ou SOD1)

C'est un homodimère de masse moléculaire de 32 000 Daltons (Da). Les deux sous-unités (SU) contiennent chacune un atome de cuivre et un de zinc. Les ions cuivre présentent une activité catalytique alors que les ions zinc stabilisent la molécule.

La SOD1 est présente majoritairement au niveau cytoplasmique et est exprimée dans toutes les cellules avec une activité plus importante au niveau du foie, du cerveau, des neurones et des érythrocytes.

Des mutations du gène codant pour la SOD1 sont à l'origine d'une neurotoxicité impliquée dans la sclérose latérale amyotrophique (Redler *et al.* 2012).

b.2 Manganèse superoxyde dismutase (Mn SOD ou SOD2)

C'est un tétramère constitué de 4 SU renfermant chacune un atome de manganèse (Mn). Sa masse moléculaire est de 96 000 Da.

Différentes études ont montré qu'une surexpression de la Mn SOD entraînait un ralentissement de la croissance tumorale (Behrend *et al.* 2003).

La SOD2 est exclusivement retrouvée dans les mitochondries des cellules de différents organes : le cœur, les reins, le foie et le cerveau.

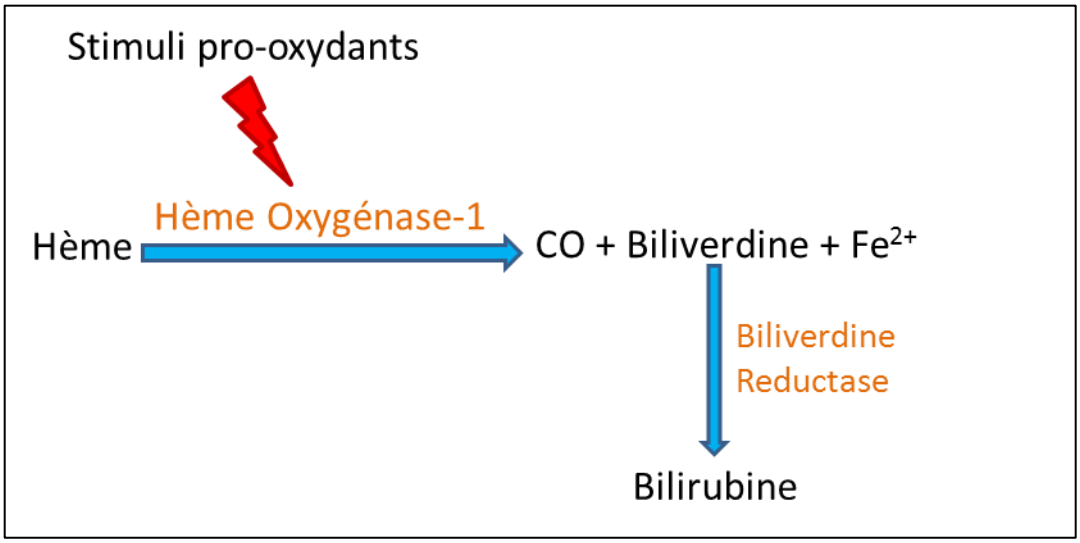

Figure 14 : Réaction enzymatique catalysée par l'Hème Oxygénase 1

CO : Monoxyde de carbone

b.3 Superoxyde à cuivre et à zinc extracellulaire (SOD3)

Cette glycoprotéine a une masse de 135 000 Da et présente une structure tétramérique, chaque Sous Unité (SU° comprenant un atome de Zn et un de Cu. Elle est préférentiellement retrouvée dans la matrice extracellulaire des tissus. Elle possède une forte affinité pour certains glycosaminoglycanes tels que l'héparine (Mates *et al.* 1999).
Une diminution de la SOD3 est observée chez des patients atteints de psoriasis suggérant ainsi son importance dans la réaction inflammatoire au niveau cutané (Kwon *et al.* 2012).

c. La Glutathion Peroxydase

Il existe différentes isoformes de glutathion peroxydase (GPx). Leur rôle principal est d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant, sur les acides gras polyinsaturés en les couplant avec l'oxydation du glutathion selon les réactions suivantes *(Figure 13)*:

$$ROOH + GPx\text{-}Se^- + H^+ \rightarrow ROH + GPx\text{-}SeOH$$

$$GPx\text{-}SeOH + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se\text{-}SG + H_2O$$

$$\underline{GPx\text{-}Se\text{-}SG + GSH \rightarrow GPx\text{-}Se^- + GSSG + H^+}$$

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

Alors que la GPx catalyse la dismutation d'H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire, le glutathion sous forme réduite, GSH, est oxydé en GSSG (Zhu *et al.* 2008). La GPx est en compétition avec la CAT car elles utilisent toutes les deux le même substrat : H_2O_2, la GPx étant active pour des faibles concentrations d'EROs (Valko *et al.* 2006).
D'un point de vue structural, les GPx présentent une ou quatre SU, selon l'isoforme. Chaque SU possède un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine.
Chez les eucaryotes, il existe 5 isoenzymes. La GPx 1 l'isoforme la plus fréquente, est exprimée dans de nombreuses cellules telles que les érythrocytes, les cellules hépatiques et rénales et est présente dans le cytoplasme et la mitochondrie. Les autres isoformes sont la GPx 2 dite gastro-intestinale car localisée préférentiellement dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, la GPx 3 présente au niveau plasmatique, la GPx 4 présente dans les cellules épithéliales du rein et dans les testicules est située à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme, et enfin la GPx 5 localisée dans l'épididyme.

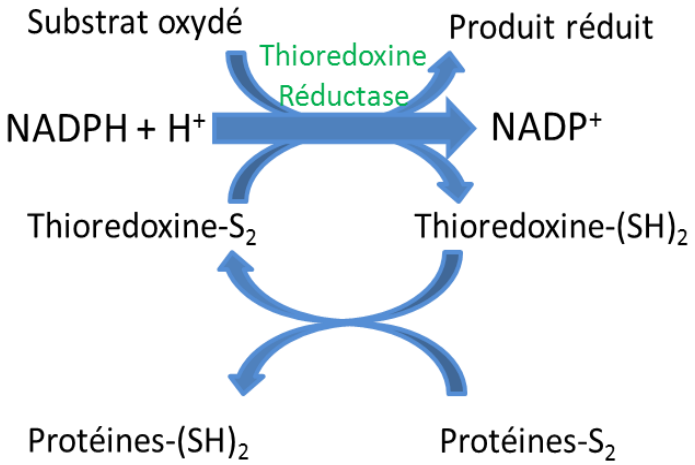

Figure 15 : Le système Thioredoxine (d'après Arner, 2000)

d. L'Hème Oxygénase-1

Il existe trois isoformes d'hème oxygénase : HO-1, HO-2 et HO-3 retrouvée uniquement chez le rat (Hayashi *et al.* 2004). HO-1 est majoritairement localisée dans les microsomes et a une masse de 32 000 Da (Grochot-Przeczek *et al.* 2012). C'est une enzyme inductible et ubiquitaire qui dégrade l'hème en fer ferreux (Fe^{2+}), monoxyde de carbone (CO) et biliverdine *(Figure 13 &Figure 14)*.

Cette dernière est ensuite transformée par la biliverdine réductase en bilirubine, puissant anti-oxydant. Le fer ferreux quant à lui entraîne la stimulation de la ferritine, protéine de stockage du fer (Grochot-Przeczek *et al.* 2012).

HO-1 possède une activité anti-inflammatoire, anti-oxydante et antiapoptotique (Lyoumi *et al.* 2007). En cas de stress, de nombreux agents, comme les cytokines, les métaux lourds ou le peroxyde d'hydrogène peuvent induire HO-1 : elle constitue donc un mécanisme de défense contre les dégâts tissulaires causés par le stress oxydant (Grochot-Przeczek *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2010).

e. La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1

La NAD(P) H quinone oxydoréductase 1 (NQO1) est une flavoenzyme qui est principalement localisée dans le cytosol (Siegel *et al.* 2012). Elle réduit les deux électrons célibataires des quinones en utilisant le NADPH ou le NADH comme cofacteur (Lind *et al.* 1982). Elle empêche la formation de produits réactifs (semiquinones) qui entraînent la formation d'EROs et assure le maintien de la vitamine E sous forme réduite et donc active (Siegel *et al.* 1997). NQO1 est surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides (côlon, sein, pancréas et poumons) chez l'homme (Siegel *et al.* 2000).

f. Les thioredoxines

Le système des thioredoxines (Trx) regroupe différents acteurs qui interagissent entre eux, comme le montre la *Figure 15*. La Trx possède trois isoformes chez l'homme : Trx1, Trx2 et Trx3 qui sont respectivement localisées dans le cytosol, la mitochondrie et les spermatozoïdes (Mahmood *et al.* 2013).

Le système Trx possède un rôle important de défense vis à vis du stress oxydant car il peut i) réguler Nrf2 qui est un facteur de transcription *(cf. II.B.4.a p.143)* et les Anti-oxidant Response Element (ARE) transcrivant de nombreux gènes anti-oxydants (Moi *et al.* 1994), et ii) protéger les protéines cytosoliques riches en ponts disulfures en les maintenant sous forme réduite grâce à son activité oxydo-reductase afin d'éviter la formation de liaisons disulfures au niveau intra- ou inter- moléculaire (Arner *et al.* 2000).

g. Glutaredoxines

Ce sont des protéines qui font partie de la famille des Trx et possèdent donc une activité oxydo-reductase participant ainsi au maintien de l'équilibre RedOx de la cellule. Les glutaredoxines (Grx) sont localisées dans le cytosol, le noyau et les mitochondries.
Elles peuvent agir notamment en catalysant la réduction de protéines disulfides et de thiols glutathionylés (Lillig *et al.* 2013 ; Lillig *et al.* 2008).

3. Anti-oxydants endogènes non enzymatiques

a.1 Le Glutathion

✷ Structure et fonctions du glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ-glutamyl-cystéinylglycine) ubiquitaire produit dans différents tissus où il est présent à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mM chez les mammifères (Lu 2013). Il est présent dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous sa forme réduite (GSH) à une concentration intracellulaire de 0,1 à 1 mM, soit sous sa forme oxydée (GSSG) à des concentrations dix fois moins importantes. Un rapport GSH/GSSG élevé est essentiel pour assurer une protection contre le stress oxydant (Valko *et al.* 2006).
Le glutathion présente deux caractéristiques structurales : une liaison γ-carboxyle entre les résidus glutamate et cystéine, et un groupement thiol porté par le résidu cystéine. La liaison γ-carboxyle étant un type de liaison peu fréquent et hydrolysée uniquement par la gamma-Glutamyl-Transpeptidase (γGT), le glutathion est donc métabolisé de façon extra-cellulaire par les cellules exprimant la γGT, et est ainsi plus résistant à la dégradation intracellulaire (Lu 2013).

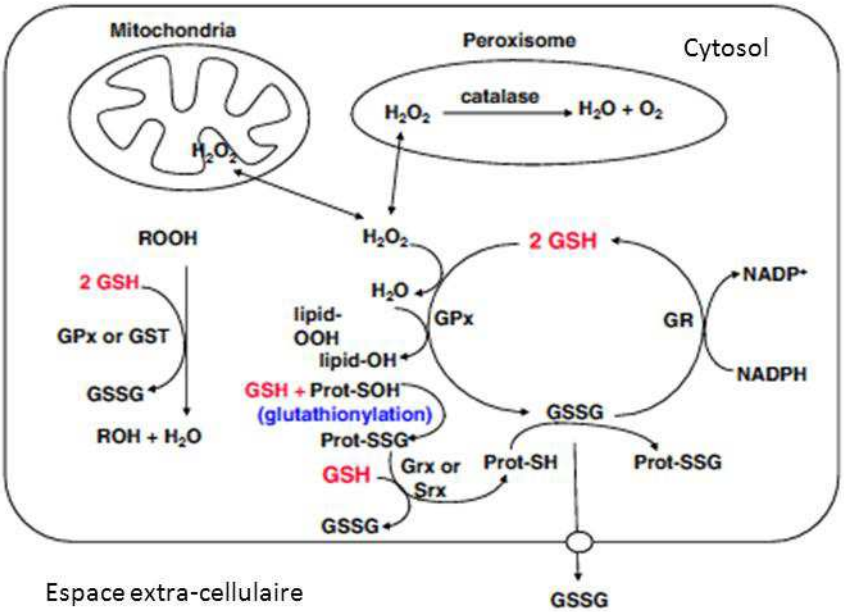

Figure 16 : Les réactions impliquant le glutathion (d'après Lu, 2013)

GS : Glutathion Synthétase ; GST : Glutathion-S-Transférase ;

GR : Glutathion Reductase ; γ-GCS : Gamma-Glutamyl-Custéine Synthétase ;

GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé

Grx : Glutaredoxines ; Srx : Sulphiredoxines

Le groupement thiol permet au glutathion d'intervenir dans de nombreuses réactions de réduction. Il participe également aux réactions de détoxification des EROs, notamment H_2O_2 et aussi lors de la détoxification des xénobiotiques électrophiles.

De plus, *via* sa fonction thiol, le glutathion participe au maintien de l'équilibre redox cellulaire impliqué dans la régulation de différentes voies métaboliques (transduction de signal, expression génique des facteurs de transcription) selon la réaction suivante appelée glutathionylation :

Protéine-SOH + GSH→ Protéine-SSG + H_2O

générant des protéines glutathionylées (Lu 2013).

Cependant, la fonction thiol peut également entraîner la formation de radicaux thiyles ($GS^{\cdot}$) qui pourront à leur tour générer de nouveaux radicax libres.

Le glutathion agit comme un anti-oxydant notamment au niveau mitochondrial ; en présence de GPx dépendante du sélénium, il réduit le peroxyde d'hydrogène prévenant tout effet délétère tel que la peroxydation lipidique. Le glutathion sert ainsi de co-facteur à la GPx, comme c'est le cas pour la glutathion-S-transférase (GST). Il permet aussi la régénération de différents anti-oxydants dont les vitamines C et E. Le glutathion est également impliqué dans les processus d'apoptose et de division cellulaire (Lu 2013) et intervient aussi dans le transport de certains acides aminés dont la cystéine (Pastore *et al.* 2003).

Le glutathion est également un agent radioprotecteur. En effet, l'injection préventive de glutathion chez des rats un mois avant irradiation entraîne une diminution du stress oxydant observé après irradiation (Cemek *et al.* 2006).

La *Figure 16* illustre les différentes réactions anti-oxydantes mettant en jeu le glutathion.

✷ Synthèse du glutathion

La synthèse du glutathion fait successivement intervenir deux enzymes cytosoliques ubiquitaires ATP-dépendantes : la gamma-Glutamyl Cystéine Synthétase (GCS) et la glutathion synthétase (GS) *(Figure 17).*

i. LA GAMMA-GLUTAMYL CYSTEINE SYNTHETASE

La première étape de la synthèse du glutathion, catalysée par la GCS, consiste en la réaction du groupement γ-carboxyle du glutamate avec le groupement aminé de la cystéine pour former la γ-glutamylcystéine.

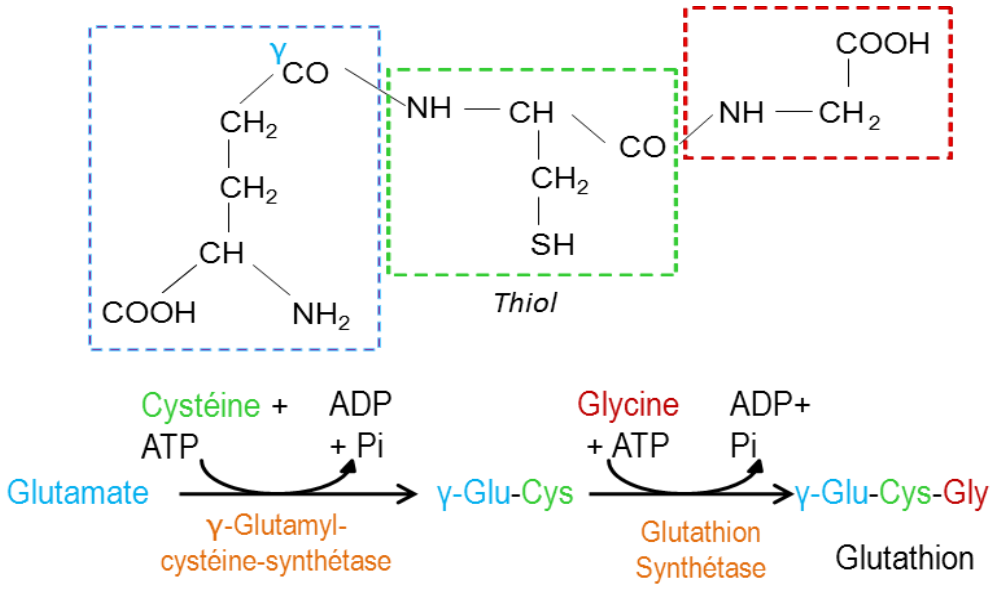

Figure 17 : La synthèse du Glutathion

C'est l'étape limitante de la synthèse du glutathion. La GCS, aussi appelée gamma-Glutamyl Cystéine Ligase (GCL), est composée de 2 SU : l'une catalytique de 73 000 Da, notée GCLC ; et la seconde la CGLM dite « modulatrice » a une masse de 31 000 Da.

L'activité de la GCS est physiologiquement régulée par un rétrocontrôle négatif de la concentration en glutathion et par la disponibilité de cystéine (Lu 2013).

ii. LA GLUTATHION SYNTHETASE

La GS catalyse la liaison de la γ-glutamylcystéine et de l'ATP pour former la γ-glutamylcystéinylphosphate qui réagit avec la glycine pour former le GSH. La GS est constituée de deux SU de 118 000 Da chacune (Lu 2013). En cas de déficit en GS, une diminution de glutathion est observée, celle-ci entraînant des conséquences métaboliques importantes telles que des acidoses métaboliques ou des anémies hémolytiques.

✷ La Glutathion Reductase (GR)

La GR appartient à la famille des flavoprotéines. Elle catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) en utilisant du NADPH provenant de la voie des pentoses phosphates.

$$GSSG + 2H^+ + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Elle a un rôle essentiel dans le cycle redox car elle permet le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un faible taux de GSSG (Deponte 2013).

✷ La gamma Glutamyl Transpeptidase

Cette enzyme permet le transport du GSH : elle est présente dans toutes les cellules sauf les cellules musculaires. Elle est majoritairement trouvée au niveau des tissus épithéliaux du rein (néphron), de l'intestin (jéjunum) et du foie. Elle est située sur la membrane externe des cellules alors que le glutathion se trouve principalement au niveau intracellulaire. La gamma glutamyl transpeptidase (γGT) *(Figure 13)* permet la translocation du glutathion à l'intérieur de la cellule (Griffith *et al.* 1979) et ainsi le transfert du groupement γ-glutamyl à un acide aminé libre et la formation de cystéinylglycine. L'entrée du γ-glutamyl-acide aminé dans la cellule est couplée à cette réaction (Pastore *et al.* 2003).

✷ La Glutathion-S-Transférase (GST)

Les GST sont des enzymes cytosoliques présentes dans de nombreux tissus (muscle, intestin, foie, rein), dont l'expression varie en fonction de la localisation, du sexe, de l'âge et de facteurs génétiques et physiopathologiques. Il existe 5 isoformes cytosoliques de la GST: α, μ , π , σ et θ ; les trois premières isoformes étant les plus fréquentes.
Elles catalysent la réaction de conjugaison du GSH réduit avec des xénobiotiques électrophiles afin de les rendre plus hydrosolubles (Desmots *et al.* 2001) *(Figure 13)*. Les produits de la réaction sont métabolisés sous forme d'acide mercaptopurique puis éliminés (Lu 2009).

b. L'acide urique

Issu du catabolisme des purines, l'acide urique est soit éliminé dans les urines, soit excrété par la bile et l'intestin où il sera dégradé en allantoïne par l'uricase des bactéries coliques (Pritchard *et al.* 1993). L'acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres : il réduit les radicaux peroxyles, hydroxyles *(Figure 13)* et neutralise aussi l'anion superoxyde (Ames *et al.* 1981 ; Simic *et al.* 1989). L'acide urique représente 60 % de la capacité anti-oxydant plasmatique (Letonturier 2002).

c. Le coenzyme Q

Le coenzyme Q est un composé hydrophobe qui se situe dans les membranes cellulaires. Il appartient à la chaîne de respiration mitochondriale et permet le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Il est également présent dans les lipoprotéines où il a un effet anti-oxydant : il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxyles *(Figure 13)*. Son effet anti-oxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme Q est le seul anti-oxydant liposoluble endogène (Bentinger *et al.* 2010).

Figure 18 : La structure de Nrf2

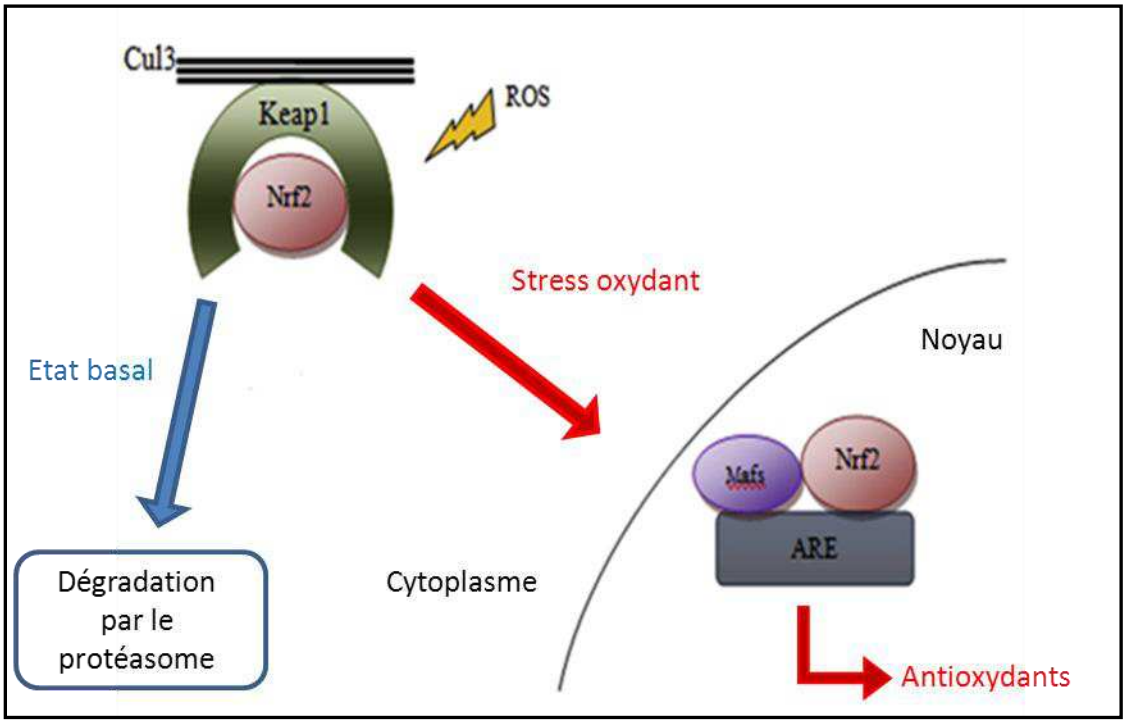

Figure 19 : L'activation de Nrf2 (d'après Pedruzzi 2012)

4. Signalisation cellulaire et stress oxydant

Dans ce paragraphe, différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation du stress oxydant seront décrits et plus particulièrement NF-E2-related factor 2 (Nrf2) en raison de son rôle prépondérant dans la régulation du système anti-oxydant.

a. Nrf2

Le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la protection de différents organes (le foie, le rein, l'estomac, le cerveau) et de cellules (macrophages, érythrocytes) vis-à-vis d'attaques toxiques est primordial.

a.1 Structure de Nrf2

Nrf2 est une protéine de près de 600 acides aminés. Sa structure comprend 6 domaines fonctionnels, nommés Neh1 à Neh6 représentés sur la *Figure 18*. Neh1 est un domaine de type « leucin zipper » et permet notamment la liaison avec l'ADN. Neh2 correspond à la région de l'extrémité N-terminal alors que Neh3 est situé dans la région C-terminale et participe à l'activation transcriptionnelle. Neh4 et Neh5 peuvent se lier ensemble ou séparément à un autre activateur de transcription, le cAMP Responsive Element Binding (cREB) protein (CBP), activant ainsi la transcription des gènes cibles. Enfin, Neh6, tout comme Neh2, sont deux régulateurs négatifs de Nrf2 (Cardozo *et al.* 2013 ; Motohashi *et al.* 2004).

a.2 Activation de Nrf2

A l'état basal, Nrf2 est inactif et présent dans le cytoplasme sous forme liée à Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) : Keap 1 se fixe *via* le domaine Neh2 de Nrf2 *(Figure 19)*. Keap 1 est également lié avec la Cullin 3 (Cul3) formant le complexe Cul3- Keap 1-ubiquitin E3 ligase. Nrf2 sous forme ubiquitinylée est dégradé par le protéasome.

Une augmentation de la production d'EROs induit un clivage Keap1/ Nrf2, ce dernier transloque alors sous sa forme active dans le noyau où il s'hétérodimérise avec une protéine Maf. Une fois activé, Nrf2 se fixe sur les sites des éléments de réponse aux anti-oxydants (ARE) qui sont des séquences activatrices de la transcription de gènes intervenant dans le stress oxydant (Cardozo *et al.* 2013 ; Ma 2013 ; Taguchi *et al.* 2011).

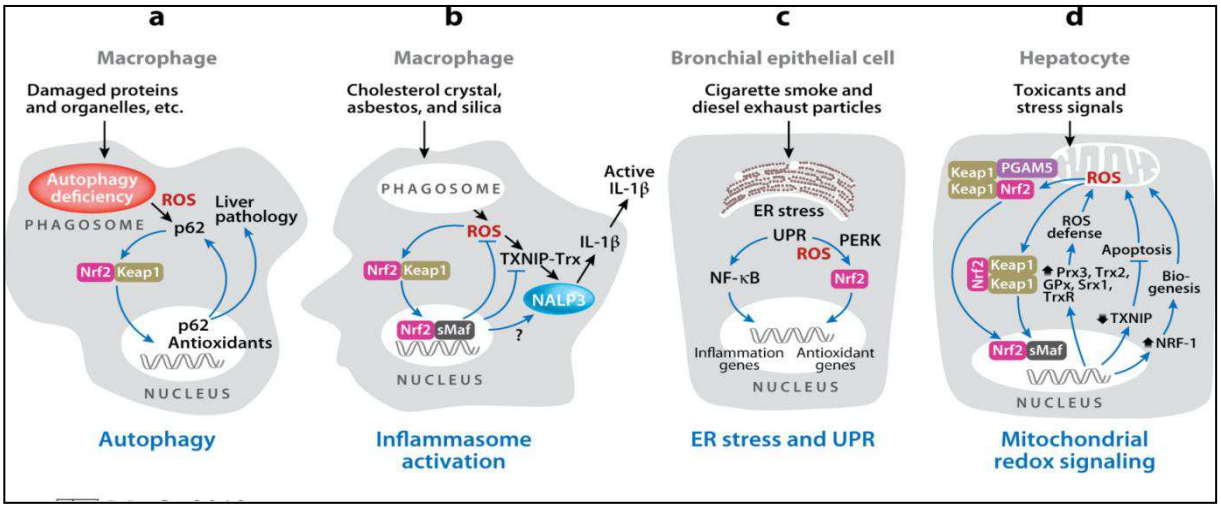

Figure 20 : Rôles de Nrf2 dans les phénomènes d'autophagie (a), d'inflammation (b), du stress du réticulum endoplasmique (c) et de signalisation mitochondriale (d) (d'après Ma 2013)

La fixation de Nrf2 sur ces sites localisés dans la région promotrice de nombreux gènes de détoxification (la GST), anti-oxydants (la GR, la CAT, la GPx, NQO1, HO-1), ou impliqués dans la dégradation protéique par le protéasome (Kwak *et al.* 2003) et la prolifération cellulaire (Malhotra *et al.* 2010) induit ainsi les différents systèmes de défense cellulaire (Lee *et al.* 2005a ; Taguchi *et al.* 2011).

a.3 Mécanismes régulés par Nrf2 : exemple du système anti-oxydant

L'activation des défenses anti-oxydantes par Nrf2 met en jeu différentes voies pour réguler l'homéostasie des EROs.

Nrf2 induit la transcription des gènes permettant :

i) la neutralisation des anions superoxydes et peroxydes (GPx, SOD et Peroxiredoxines),
ii) la synthèse du glutathion et de NAPDH,
iii) la régénération des protéines et cofacteurs oxydés (GR, TrxR),
iv) l'activation de l'expression de la Trx et l'inhibition de celle de TrxIP,
v) l'augmentation de transporteurs tels que le transporteur cystine/glutamate
vi) l'induction de HO-1
vii) la chélation des métaux (Metallothionénines I et II, la ferritine)

Nrf2 induit la transcription des gènes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques comme UDP-Glucoronosyltransferase 1A1 (UGT 1A1) chez l'homme ou le CYP 2A5.

Il a récemment été démontré que Nrf2 régule aussi des processus mettant en jeu des espèces pro-oxydantes dont l'autophagie, l'inflammation et l'apoptose comme le montre la *Figure 20* (Ma 2013).

a.4 Rôle du complexe Keap 1-Nrf2 dans les pathologies

Des études ont mis en évidence le rôle du complexe Keap1-Nrf2 dans les cancers (Ren *et al.* 2011 ; Singh *et al.* 2008), la sclérose latérale amyotrophique (Petri *et al.* 2012) et des pathologies neurologiques (Zhang *et al.* 2013) rénales (Saito 2013) ou hépatiques (Shin *et al.* 2013) (*cf. II.C.2 p.157*).

b. Autres facteurs de transcription

b.1 Nuclear Factor-κB (NF-κB)

La famille NF-κB comprend, chez les vertébrés, cinq facteurs de transcription : NF-κB1, NFκB2, c-Rel, RelA et RelB. Cet ensemble de facteurs de transcription étant activé notamment par des EROs, il est considéré comme un « sensor » du stress oxydant (Storz *et al.* 2003). NF-κB induit entre autres la translocation de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD, NQO1, HO-1 et agents de l'inflammation dont l'interleukine 6 (Il-6) et le Tumor necrosis Factor α (TNF α) (Pahl 1999).

b.2 Activated Protein-1 (AP-1)

AP-1 est un facteur de transcription hétérodimérique qui comprend des protéines de la famille de Fos, Jun, Maf et d'ATF qui sont des activateurs de transcription. En fonction des combinaisons entre ces protéines, AP-1 va induire la transcription de gènes différents. Il est activé suite à des stimuli dont le peroxyde d'hydrogène (Valko *et al.* 2006). L'induction d'AP-1 met en jeu les voies de JNK, p38 et des MAP kinases (Pinkus *et al.* 1996). AP-1 intervient notamment dans des processus de prolifération et d'apoptose comme inducteur ou inhibiteur (Valko *et al.* 2006), de cancérogénèse (Hsu *et al.* 2000).

b.3 p53

p53 est un facteur de transcription qui est activé suite à des stimuli de stress cellulaire. Il peut se fixer dans la région promotrice de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence (Levine *et al.* 2009). p53 induit la transcription de Bax, enzyme pro-apoptotique, entraînant alors une augmentation de la perméabilité mitochondriale libérant le cytochrome c dans le cytoplasme. Le relargage du cytochrome c constitue le point départ de la voie intrinsèque de l'apoptose qui aboutira à l'activation des capsases comme le montre la *Figure 21.*

En cas de faible quantité d'EROs, p53 a une activité anti-oxydante en induisant notamment la GPx, alors qu'en cas d'excès d'EROs, il aura un effet pro-oxydant (Bensaad *et al.* 2005).

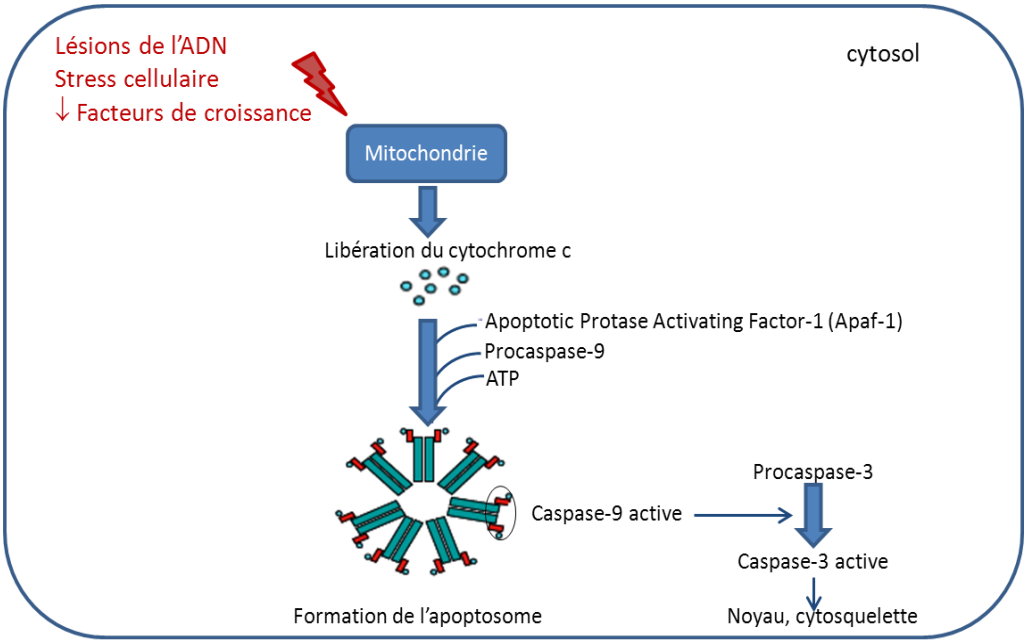

Figure 21 : Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose

Une fois la caspase 3 activée, elle ira se fixer sur ses substrats dont la Poly ADP Ribose Polymérase pour l'empêcher de réparer l'ADN ; les protéines du cytosquelette entraînant la rétraction de la cellule ; l'endonucléase qui activée clive l'ADN.

5. Les anti-oxydants «naturels »

a. Les vitamines

a.1 La vitamine A

Ce terme regroupe les rétinoïdes et les provitamines A aussi appelés caroténoïdes. Ces derniers sont majoritairement connus comme étant des précurseurs de la vitamine A tels que le β-carotène. Les caroténoïdes sont de puissants agents antiradicalaires qui neutralisent tant des espèces électroniquement que chimiquement actives. Ils ont également un rôle de protection vis-à-vis des réactions de photosensibilisation. En fonction de la concentration en caroténoïdes, leurs effets sont différents : à faible concentration, ils ont une action anti-oxydante alors qu'à plus forte concentration, ils se comportent comme des agents pro-oxydants (Valko *et al.* 2006).

Dans l'alimentation, les caroténoïdes sont présents entre autres dans les carottes (β-carotène) et le melon (lycopène) alors que les rétinoïdes sont retrouvés dans les aliments d'origine animale (lait, jaunes d'œuf).

a.2 La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'anti-oxydant naturel le plus puissant. Les aliments ayant la plus grande teneur en vitamine C sont les agrumes, les kiwis et les légumes (brocolis, chou-fleur).

Présente sous sa forme ascorbate, elle piège les radicaux peroxyles en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines. La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques (Gulcin 2012) dont Fe^{3+} pour le réduire en Fe^{2+} qui pourra ensuite catalyser différentes réactions dont celle de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + Fe^{3+} + OH^{-}$ générant ainsi de nouvelles EROs.

La vitamine C régulerait aussi le facteur de transcription AP-1 en interagissant avec Fos et Jun (Valko *et al.* 2006).

a.3 La vitamine E

Le terme « vitamine E » comprend deux classes : les tocophérols et les tocotriénols. Le composé principal est l'α-tocophérol (Gulcin 2012) qui est synthétisé par les plantes. En revanche, les êtres humains ne peuvent pas en synthétiser, son apport se fait donc exclusivement *via* l'alimentation. La vitamine E est retrouvée dans les huiles végétales, les noix, les graines. L'α-tocophérol est localisé au niveau membranaire et dans les lipoprotéines circulantes où il réagit majoritairement avec les radicaux peroxyles en formant un radical tocophéryle. La régénération de l'α-tocophérol se fait selon 2 voies : soit *via* la vitamine C, soit en mettant en jeu la tocophéryle réductase qui en présence de GSH redonne de l'α-tocophérol. La vitamine E agit en synergie avec entre autres le GSH, la vitamine C et le sélénium. Un déficit en vitamine E peut être à l'origine de déficiences neurologiques telles que les myopathies (Brigelius-Flohe *et al.* 1999).

b. Les oligo-éléments

b.1 Le Cuivre

Le cuivre est le co-facteur de nombreuses enzymes étant donné sa facilité à passer de sa forme réduite (Cu^{2+}) à sa forme oxydée (Cu^{+}) (Jomova *et al.* 2011 ; Laliberte *et al.* 2008). Il possède notamment des propriétés anti-oxydantes. Il va ainsi catalyser la transformation des EROs *via* la réaction d'Haber-Weiss-Fenton. Néanmoins, une d'augmentation excessive de cuivre conduit à une production de $HO^{\bullet}$ (Laliberte *et al.* 2008). Les noix, les graines, les légumes secs et les crustacés sont des produits particulièrement riches en cuivre.

b.2 Le Sélénium

C'est un constituant important de la défense anti-oxydante : il protège les cellules contre la production d'espèces radicalaires par leurs propres organites. Le Sélénium possède également une fonction de détoxification des métaux lourds dont le cadmium. C'est aussi un agent anti-mutagénique. Les effets protecteurs du Sélénium sont principalement dus à sa présence dans le site actif des GPx et des Trx. Cet oligoélément est trouvé en forte quantité dans les protéines animales, les céréales et les fruits secs.

b.3 Le Zinc

En raison de son rôle de stabilisateur de la Cu, Zn SOD, le zinc est considéré comme un anti-oxydant. Il possède également d'autres actions anti-oxydantes comme la protection des groupements thiols de certaines protéines contre l'oxydation due au fer. Une carence en zinc peut induire un stress oxydant (Prasad 2009) pouvant aboutir à des pathologies chroniques (Jomova *et al.* 2011). Une forte teneur en zinc est mesurée dans les fruits de mer, les huitres et la viande.

c. Les polyphénols

Le groupe des polyphénols compte plus de 8000 composés dont les flavonoïdes tels que les anthocyanes, catéchines ou isoflavones ; les acides phénoliques (acide caféique, curcuma par exemple), les stilbènes (resvératrol) ou les lignanes. Les flavonoïdes se différencient structuralement par le nombre de noyaux benzène ainsi que par les éléments qui lient ces noyaux (Valko *et al.* 2006 ; Yoshihara *et al.* 2010). Trouvés dans les plantes et dans les graines telles que le sésame, ils sont donc très présents dans notre alimentation (fruits, légumes, chocolat, boissons telles que le vin, le thé). Les polyphénols possèdent des propriétés anti-oxydantes. Effectivement, il a été démontré qu'ils inhiberaient ou préviendraient la peroxydation lipidique et notamment la formation des Low Density Lipoprotein (LDL) oxydés (Osakabe *et al.* 2001 ; Schroeter *et al.* 2002 ; Valko *et al.* 2006 ; Wu *et al.* 2009 ; Yoshihara *et al.* 2010). Les polyphénols présentent également un effet protecteur vis-à-vis de certaines pathologies cardiovasculaires ou de cancers (Damianaki *et al.* 2000 ; Ding *et al.* 2013 ; Valko *et al.* 2006 ; Yoshihara *et al.* 2010).

C. Conséquences physiopathologiques

A travers les deux paragraphes précédents, les principales espèces pro- et anti-oxydantes ont été abordées. L'équilibre qui s'exerce entre les deux étant finement régulé, un dysfonctionnement peut avoir des répercussions sur la santé. Nous abordons dans cette partie différentes pathologies liées à ce déséquilibre.

1. Théorie radicalaire du vieillissement

Décrite dans les années 50 par Harman (Harman 1956), la théorie radicalaire du vieillissement explique que les phénomènes de dégénérescence liés au vieillissement sont dus à l'accumulation d'éléments oxydés et à leurs conséquences sur l'organisme comme la peroxydation lipidique ou la carbonylation des protéines. Ainsi, plus l'âge augmente, plus les attaques radicalaires sur les différentes cibles biologiques seront importantes.

La théorie radicalaire du vieillissement serait impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le diabète de type II, les maladies neurodégénératives (dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson) et l'athérosclérose. Le *Tableau 9* représente des marqueurs d'oxydation mis en évidence dans les pathologies.

Pathologies humaines	Biomarqueurs de stress oxydant							
	MDA	GSH/GSSG	Acroléine	F2-Isoprostanes	4-HNE	8-OH-dGuanosine	AGE	Protéines carbonylées
Cancer	x	x	x			x		
Maladies Cardiovasculaires		x	x		x			
Arthrite rhumatoïde		x		x				
Maladie d'Alzheimer	x	x		x			x	
Maladie de Parkinson		x			x			x
Ischémie/Reperfusion		x		x				
Athérosclérose	x		x	x	x			
Diabète non insulinodépendant	x	x		x			x	

Tableau 9 : Biomarqueurs de stress oxydant associés à des pathologies (d'après Valko 2007)

MDA : Malondialdéhyde ; GSH/GSSG : Rapport Glutathion réduit sur glutathion oxydé ; 4-HNE : 4-hydorxy-2-nonenal ; AGE : Produits de Glycation avancés

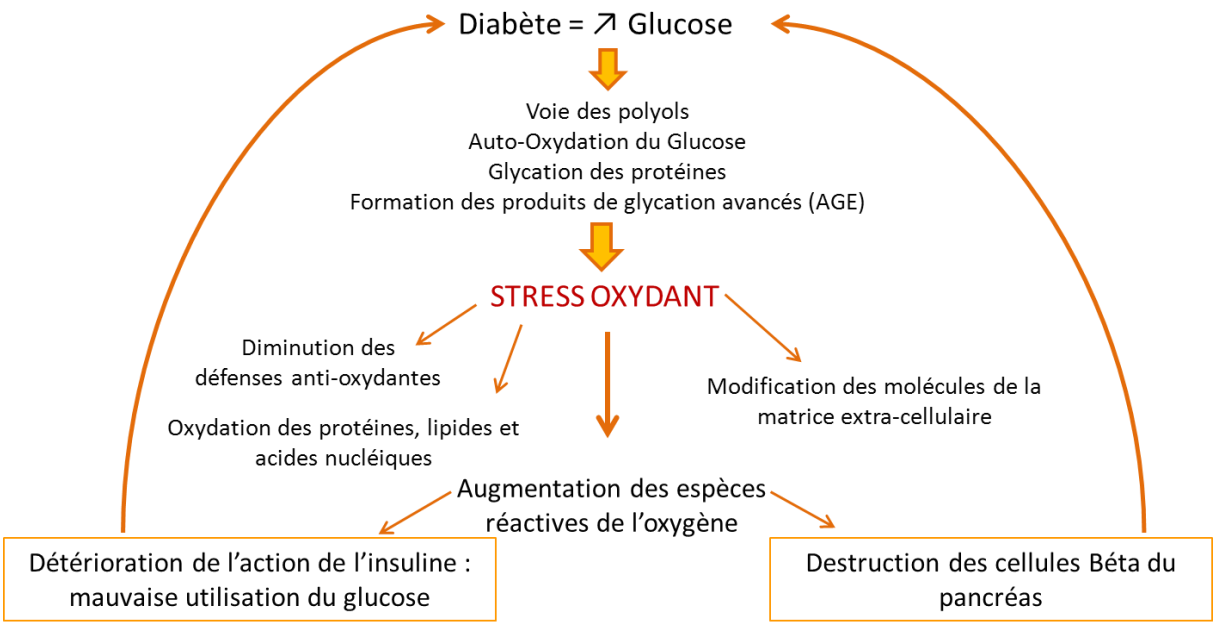

Figure 22 : Diabète et stress oxydant (modifié d'après (Bonnefont-Rousselot *et al.* 2004)

Le diabète se traduit par une augmentation du glucose qui va entraîner l'activation de différentes voies dont la formation de produits de glycation avancés qui aboutissent à un stress oxydant à long terme. Les défenses anti-oxydantes sont diminuées et les réactions pro-oxydantes augmentées (production d'espèces réactives de l'oxygène, oxydation des lipides…). Cela va induire une destruction des cellules béta du pancréas, cellules sécrétrices d'insuline, ainsi qu'une altération de l'action de l'insuline qui vont provoquer une augmentation de glucose et donc du diabète.

2. Pathologies chroniques liées à un excès d'EROs

La production excessive d'espèces réactives a été identifiée comme étant impliquée dans certaines pathologies.

Ces pathologies peuvent se diviser en deux groupes : le premier regroupant celles liées principalement à une production excessive d'EROs au niveau mitochondrial telles que le cancer ou le diabète de type 2; le second concerne les cas où une stimulation excessive des NOX ou de la xanthine oxydase entraîne une augmentation de la production d'ER. Dans ce dernier groupe, une forte composante inflammatoire est également décrite.

Les pathologies chroniques concernées sont notamment les maladies cardiovasculaires (l'athérosclérose, maladies cardiaques ischémiques) ou neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson) et la polyarthrite rhumatoïde (Droge 2002 ; Valko *et al.* 2007).

Pour illustrer ces différences, deux exemples seront détaillés ci-après: le diabète de type 2 et l'athérosclérose.

a. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant se caractérise notamment par une hyperglycémie chronique liée une diminution de l'absorption du glucose au niveau des tissus adipeux et musculaire. La production des EROs peut avoir différentes origines : la phosphorylation oxydative, l'auto-oxydation du glucose, les CYP 450 monooxygénases, les lipo-oxygénases et les NOS (Valko *et al.* 2007).

La *Figure 22* représente au niveau cellulaire les voies de l'équilibre pro/anti-oxydant impliquées dans cette pathologie, et notamment la formation de produits de glycation avancée *(cf. II.A.1.b.2 p. 123)*.

b. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle qui se caractérise par un épaississement de la paroi des artères au niveau de l'intima. Les LDL circulantes vont pénétrer par transcytose dans l'intima où elles vont être oxydées par les EROs. Les LDL oxydées vont ensuite stimuler au niveau des cellules endothéliales la production de molécules VCAM, ICAM, MCP-1, entraînant le recrutement de monocytes qui une fois dans l'intima vont se différencier en macrophages.

Ces derniers possèdent des récepteurs qui reconnaissent les LDL oxydées. Ils vont donc être internalisés par les macrophages formant ainsi des cellules spumeuses qui aboutiront à la formation de stries lipidiques, première étape du développement de la plaque d'athérosclérose.

3. Toxicité liée à une exposition environnementale

Les différentes sources exogènes de production d'EROs telles que le tabac, les rayonnements ultra-violets (UV), l'irradiation ou encore les métaux lourds peuvent également être à l'origine de toxicité tissulaire ou de pathologies. Ainsi des études réalisées chez l'Homme et l'animal ont mis en évidence un lien entre la production excessive d'EROs induite par une exposition au plomb et l'apparition d'hypertension (Abadin *et al.* 2007). Le fer qui possède des fonctions physiologiques peut induire une augmentation d'EROs soit *via* la réaction de Fenton, soit comme catalyseur de la réaction de peroxydation lipidique. Les EROs ainsi formées sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer (Droge 2002).

L'exposition au Cadmium (Cd), qui est un agent cancérogène, entraîne la formation indirecte d'EROs par remplacement du fer ou du cuivre par du cadmium, les deux autres métaux ainsi « libres » vont catalyser la réaction de Fenton (Price *et al.* 1983 ; Watjen *et al.* 2004). Les EROs ainsi formés sont impliqués dans des dommages cellulaires observés dans le rein, les poumons, les testicules (Waalkes 2000). Une étude a montré que la supplémentation en vitamines C et E chez le rat exposé au Cd entraîne un retour à la normale du fonctionnement du testicule (Sen Gupta *et al.* 2004).

4. Les anti-oxydants : une nouvelle classe thérapeutique ?

a. Anti-oxydants « naturels »

Différentes études de supplémentation en anti-oxydants ont été réalisées en laboratoire mais également chez l'Homme notamment dans le cas de pathologies cardio-vasculaires (Cherubini *et al.* 2005 ; Suzuki 2009). L'étude contrôlée et randomisée en double aveugle SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Anti-oXydants) réalisée en France chezdes hommes et des femmes âgés de 35 à 60 ans a montré que la supplémentation avec de faibles quantités d'anti-oxydants entraîne une diminution de l'incidence totale des cancers et de la mortalité uniquement chez les hommes (Bertrais *et al.* 2004).

Néanmoins, la supplémentation est efficace chez l'homme car le niveau de base en anti-oxydant était plus faible. En revanche aucun effet bénéfique n'a été montré pour les cardiopathies ischémiques.

b. Les facteurs de transcription : exemple de Nrf2

Les facteurs de transcription de par leur rôle cytoprotecteur sont souvent évoqués comme étant de potentielles cibles thérapeutiques. Ainsi, des composés naturels ou synthétiques qui stimulent l'activation de Nrf2 sont à l'étude. En effet, le BG 12 (diméthyl fumarate) est actuellement en phase II et administré à des patients atteints de sclérose en plaques avec rechute. Les résultats montrent une diminution de l'activité cérébrale et des lésions associées à la sclérose en plaque par imagerie par résonnance magnétique (IRM) (Gold *et al.* 2012). La prise d'un complément alimentaire regroupant cinq activateurs naturels de Nrf2 a montré un renforcement des défenses anti-oxydantes (SOD1 et CAT) et une diminution de la peroxydation lipidique chez des personnes âgées de 20 à 78 ans après un mois de traitement à faible dose (Hybertson *et al.* 2011 ; Nelson *et al.* 2006). D'autres composés tels que des inhibiteurs du protéasome permettant l'augmentation de l'activité de Nrf2 sont également à l'étude (Cui *et al.* 2013 ; Luo *et al.* 2011).

Malgré ces différentes études aux résultats prometteurs, les anti-oxydants présentent des effets secondaires. En effet, s'ils sont administrés en trop grande quantité, ils peuvent devenir toxiques (Bjelakovic *et al.* 2004 ; Bjelakovic *et al.* 2008). De plus, en cas d'excès, les anti-oxydants peuvent inhiber la production d'EROs qui initialement ont un rôle physiologique, d'où les effets toxiques d'une forte supplémentation en anti-oxydant.

PROBLEMATIQUE

L'uranium est un radioélément et un métal lourd présent dans la croûte terrestre qui présente des utilisations civiles et militaires. Il existe un risque d'exposition pour la population générale dans le cas d'une contamination environnementale. Afin de mieux évaluer les risques liés à l'exposition chronique de radionucléides, dont l'uranium, sur l'environnement et l'Homme, l'IRSN a mis en place le programme de recherche expérimentale ENVIRHOM (de l'ENVIRonnement à l'HOMme), au sein duquel s'inscrit ce travail de thèse.
Il est connu depuis plusieurs décennies que l'uranium s'accumule de façon hétérogène dans les organes. L'accumulation est particulièrement importante dans le rein, organes clé de la détoxification. Le rein étant donc l'organe cible d'accumulation de l'uranium, de nombreuses études ont décrit les effets néphrotoxiques de l'uranium après exposition aiguë. Des études ont ainsi été réalisées sur des systèmes de défense de l'organisme suite à une exposition à l'uranium. Cependant, les effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le rein en général et sur les systèmes de défense en particulier sont encore mal connus. Ces lacunes de connaissances sont encore plus flagrantes quand on s'intéresse aux effets de l'uranium sur d'autres organes, notamment le foie, le deuxième organe clé de la détoxification. Parmi les différents mécanismes de défense mis en place suite à une contamination par une substance, le système pro/anti-oxydant est le plus souvent cité après exposition à un métal lourd, et notamment l'uranium. L'objectif de cette thèse est d'étudier *in vivo* et *in vitro* l'implication de ce système après contamination chronique à l'uranium dans le foie et les reins.

Dans un premier temps, étant donné le faible nombre d'études expérimentales réalisées sur l'animal cherchant à déterminer la relation « effet-dose » après exposition chronique à l'uranium par ingestion, nous avons cherché à déterminer i) le seuil de néphrotoxicité et/ou une hépatotoxicité de l'uranium après contamination chronique et ii) les perturbations du système pro/anti-oxydant induites par l'uranium tant au niveau rénal qu'hépatique. Pour ce faire, nous avons réalisé un protocole de contamination à différentes concentrations d'uranium (0 à 600 mg/L) et à différents temps (3 et 9 mois) chez des rats. Cela permet ainsi de se placer dans des conditions d'exposition environnementale (1 mg/L) jusqu'à des conditions décrites comme toxiques après exposition chronique (600 mg/L).

Ces études effectuées chez le rat, modèle de référence en toxicologie rénale et hépatique, permettront d'identifier les effets majeurs de l'uranium en fonction de la concentration et donneront suite à des études plus spécifiques sur le système pro/anti-oxydant.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets d'une contamination chronique à l'uranium chez un modèle déficient pour le système anti-oxydant, en faisant l'hypothèse qu'une telle déficience pouvait conduire à une augmentation des effets délétères de l'uranium. Afin de répondre à cette question, des souris KO pour Nrf2 ainsi que des souris sauvages ont été contaminées pendant 4 mois à différentes concentrations d'uranium (0 à 160 mg/L). En effet, de nombreuses études ont montré le rôle clé du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation du système anti-oxydant. Le choix des concentrations a été fait d'après la littérature et en vue d'obtenir une quantité d'uranium à l'organe qui soit comparable à celle mesurée chez les rats. La bioaccumulation de l'uranium dans les différents organes en fonction de la concentration en uranium ainsi que l'équilibre pro/anti-oxydant ont été étudiés plus spécifiquement dans cette deuxième partie du travail.

Enfin, en complément de ces études chez l'animal et de la littérature où une localisation et des effets toxiques de l'uranium avaient été décrits pour de fortes concentrations d'uranium, des analyses *in vitro* ont été entreprises afin d'étudier la corrélation entre la localisation cellulaire de l'uranium et les effets d'une contamination sur le système pro/anti-oxydant. Une approche *in vitro* a donc été réalisée sur une lignée de cellules hépatiques humaines après contamination à différentes concentrations (0-1000 µM) pendant plusieurs temps (15 minutes à 24 heures).

MATERIELS & METHODES

I. Matériels

A. Modèles animaux

Les études expérimentales réalisées sur les animaux sont en accord avec la réglementation française (Ministère de l'Agriculture Act No. 2001-464, Mai 2001) imposant l'obtention d'une autorisation d'expérimenter sur les animaux vivants (n° 92-267) et le comité d'éthique local de l'IRSN.

Les animaux sont deux par cage avec un libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture. Ils sont soumis à un cycle lumière/obscurité de 12h/12h (éclairage de 8 heures à 20 heures). La température est maintenue à 22°C ± 1°C dans les pièces d'hébergement. L'hygrométrie est également stable.

Les animaux suivent une phase d'acclimatation d'une semaine avant de débuter l'expérimentation proprement dite. Un suivi hebdomadaire des animaux est effectué durant toute la période de contamination : poids, consommation alimentaire et hydrique, état général (prostration…).

1. Modèle Rat

Les rats mâles Sprague Dawley de souche OFA (Charles River, L'Arbresle, France) pèsent environ 250 grammes et sont âgés de 3 mois au début de l'expérimentation.

2. Modèle Souris transgénique invalidée pour le facteur de transcription Nrf2

Les études ont été réalisées sur de souris adultes C57BL/6, mâles et femelles, pesant entre 25 et 30 grammes au début de l'expérimentation. Les souris présentent deux génotypes : « sauvage » (*Wild Type*, WT) ou KO (*Knock-out,*). Dans ce cas, les souris sont homozygotes pour la mutation $Nrf2^{-/-}$, c'est-à-dire que le gène codant pour Nrf2 a été inactivé (KO).

Les élevages, sauvage et KO, ont été réalisés au CNRS-TAAM (Orléans, France).

Par ailleurs, l'institut de recherche japonais, le RIKEN, et Monsieur Yamamoto qui a mis au point ce modèle KO nous ont accordé l'autorisation de travailler sur ces souris transgéniques (Material Transfer Agreement (MTA) n°RBRC01390).

B. Modèle cellulaire : cellules hépatiques HepG2

Les cellules HepG2 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (réf. HB-8065 ; Molsheim, France). Elles sont issues d'un carcinome hépatique d'un jeune homme d'origine caucasienne âgé de 15 ans. Elles sont adhérentes et présentent une morphologie épithéliale. Les cellules HepG2 expriment différentes protéines typiques des hépatocytes comme le retinol binding protein (RBP) ou encore le CYP 3A7.
Cette lignée hépatique humaine est un modèle très utilisé comme modèle dans de nombreuses études de toxicologie cellulaire (Lawal *et al.* 2010 ; Park *et al.* 2013) ainsi qu'au laboratoire après exposition à l'uranium (Rouas 2010 ; Rouas *et al.* 2010).

C. Préparations des solutions

1. Uranium appauvri

a. Contamination des animaux

Les rats contaminés ont été exposés à une solution d'UA obtenue par dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté de formule chimique : $UO_3(NO_3)_2$: 6 H_2O issus de pastilles d'UO_2 (AREVA-NC, Pierrelatte, France). La composition isotopique en uranium est la suivante : ^{238}U= 99,74 %, ^{235}U= 0,26 %, ^{234}U= 0,001 %. La préparation de l'eau de boisson pour les animaux à partir de ce nitrate d'uranyle nécessite tout d'abord la neutralisation. Les cristaux sont donc tout d'abord dissous dans une solution de bicarbonate de sodium puis dans de l'eau de source de composition constante afin d'obtenir la concentration en UA désirée (1, 40, 120 ou 400 mg/L).

b. Contamination cellulaire

Dans le cas des contaminations cellulaires, la poudre de cristaux de nitrate d'uranyle (PM : 518 $g.mol^{-1}$) est dissoute dans une solution de bicarbonate de sodium (PM : 84 $g.mol^{-1}$; pH = 8,1) à raison de 5 mg de poudre d'UA dans un millilitre de bicarbonate à 100 mM. La solution mère obtenue a donc une concentration de 10 mM. Cette nouvelle solution est ensuite filtrée (0,22 µm) et ajoutée à du milieu de culture en vue d'obtenir des concentrations finales de 10, 50, 100, 300, 500, 700 et 1000 µM de nitrate d'uranyle. L'uranium étant dissout dans du bicarbonate de sodium comme c'est le cas pour les eaux de boisson, il est important de préciser que toutes les concentrations des solutions ont été ajustées en fonction de la présence de bicarbonate de sodium.

2. Uranium naturel

La solution d'uranium naturel a été préparée à partir d'une dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté de formule chimique : $UO_3(NO_3)_2$: 6 H_2O issus de pastilles d'UO_2 (AREVA-NC, Pierrelatte, France). La composition isotopique est la suivante : ^{238}U: 99 %, ^{235}U: 0,76 %, ^{234}U: 0,051 %.

Les cristaux sont tout d'abord dissous dans une solution de bicarbonate de sodium puis dans de l'eau de source afin d'obtenir la concentration en uranium naturel désirée : 1, 40, 120 ou 600 mg/L pour les rats et 1, 20 ou 160 mg/L pour les souris.

3. Solutions de culture cellulaire

a. Préparation du milieu de culture

La lignée HepG2 nécessite un milieu de culture spécifique du Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640, réf. 21875034, Life Technologies, Saint Aubin, France) qui est enrichi à 10% en sérum de veau fœtal (SVF, réf. 10270-106, Life Technologies), L-Glutamine (réf. 25030-024, Life Technologies) et une solution de Pénicilline/Streptomycine 10000U/mL (PS, réf. 15140122, Life Technologies). Le SVF est décomplémenté au bain-marie pendant 30 minutes à 56°C puis filtré (µm) avant d'ajouter la quantité nécessaire au milieu de culture.

b. Substances pro ou anti-oxydantes

b.1 Sulforaphane

Le Sulforaphane (SFN) est connu comme étant un inducteur spécifique de Nrf2 (Lee *et al.* 2005b ; McMahon *et al.* 2003 ; Thimmulappa *et al.* 2002).

Une solution de SFN (50 mM) (réf. S4441, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, réf. D2650, Sigma Aldrich). Une solution fille à 5 mM est ensuite préparée par dilution au 1/10ème de la solution mère dans du Phosphate Buffer Saline (PBS, réf. 10010-015, Life Technologies) stérile. Cette dernière solution est ensuite diluée dans du milieu de culture afin d'obtenir les concentrations souhaitées. La concentration finale en DMSO est inférieure à 0,1% et identique au sein d'une même expérience.

b.2 Cadmium

Le Cadmium est un inducteur de stress oxydant par déplétion des cellules en glutathion et inhibition des enzymes anti-oxydantes (Bertin *et al.* 2006 ; Cuypers *et al.* 2010).

Une solution de Cadmium (5 mM) (réf. 202908, Sigma Aldrich) est préparée par dissolution de la poudre dans de l'eau distillée. La solution mère est ensuite filtrée puis diluée dans du milieu de culture aux concentrations désirées.

b.3 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est une ERO. A partir d'une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène à 30% (réf. 216763, Sigma Aldrich), une solution de 500 µM est préparée dans du milieu de culture puis diluée aux concentrations souhaitées.

c. Solution de DiHydroEthidium (DHE)

Une solution de DHE (0,02 mM) est préparée par dissolution de 6,3 mg de poudre (réf. D-1168, Life Technologies) dans 1 mL d'acétonitrile (réf. 1000302500, Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) à laquelle 100 mL d'eau stérile sont ajoutés. A partir de cette solution stock conservée à – 20°C et à l'abri de la lumière, une solution fille à 2 µM est préparée dans du milieu de culture.

II. Méthodes

A. Modèle expérimentaux

1. Contamination animale

Pour les expérimentaux sur les rats, les animaux sont répartis de façon aléatoire entre lots témoins et lots contaminés en veillant à avoir un nombre équivalent d'animaux. Pour le modèle souris, les groupes ont été établis en fonction du nombre d'animaux disponibles car il n'a pas été possible d'obtenir un nombre de souris KO Nrf2 suffisant pour l'étude prévue en une seule fois. Un protocole de contamination en trois phases a donc dû être réalisé pour le modèle souris.

a. Contamination des rats

Les deux protocoles réalisés chez le rat sont des protocoles « effet-dose ». Les animaux sont répartis en quatre groupes (n = 12), chacun recevant une concentration différente en uranium dans l'eau de boisson. Un groupe d'animaux témoins (n =12) qui reçoit de l'eau de source est également inclus dans le protocole. Dans le premier protocole, les animaux sont contaminés pendant 3 mois aux concentrations en uranium de 1, 40, 120 ou 400 mg/L. Dans le second protocole où les animaux sont contaminés pendant 9 mois à l'uranium, les concentrations sont les suivantes : 1, 40, 120 et 600 mg/L. Le choix des concentrations permet d'une part d'encadrer la concentration 40 mg/L pour laquelle le laboratoire a de nombreuses données correspondant au double de la concentration la plus importante (20 mg/L) mesurée dans un puits d'eau (Salonen 1994). Les concentrations choisies comprennent également des concentrations environnementales (1 mg/L) (Magdo *et al.* 2007) et des concentrations décrites comme toxiques (120, 600 mg/L) (Gilman *et al.* 1998b).

Au regard des nombreuses études réalisées antérieurement au laboratoire où l'UA était utilisé (Gueguen *et al.* 2007 ; Racine *et al.* 2009 ; Rouas *et al.* 2011); le premier protocole d'exposition pendant 3 mois a été réalisé avec de l'UA. Par la suite, tous les protocoles ont été réalisées avec de l'UN en raison des nouvelles questions apparues au sein du laboratoire autour de l'UN.

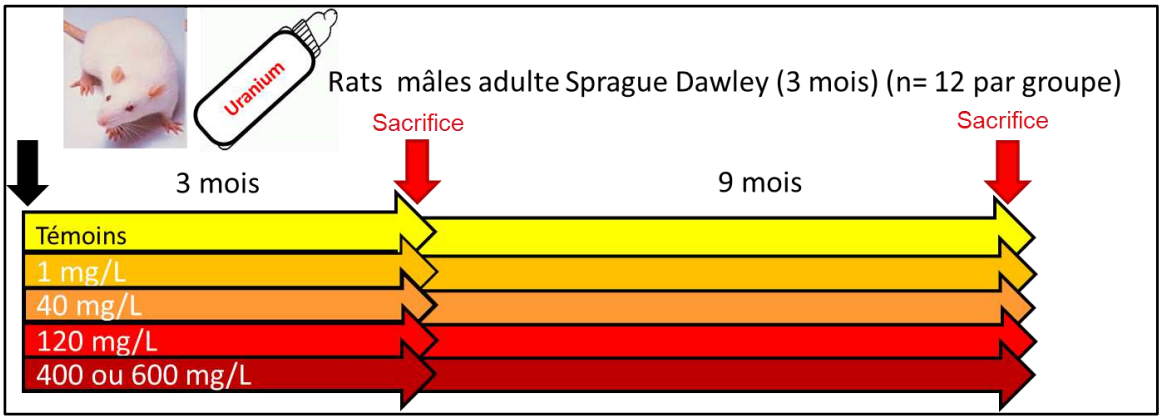

Figure 23 : Le protocole de contamination des rats pendant 3 et 9 mois à différentes concentrations d'uranium

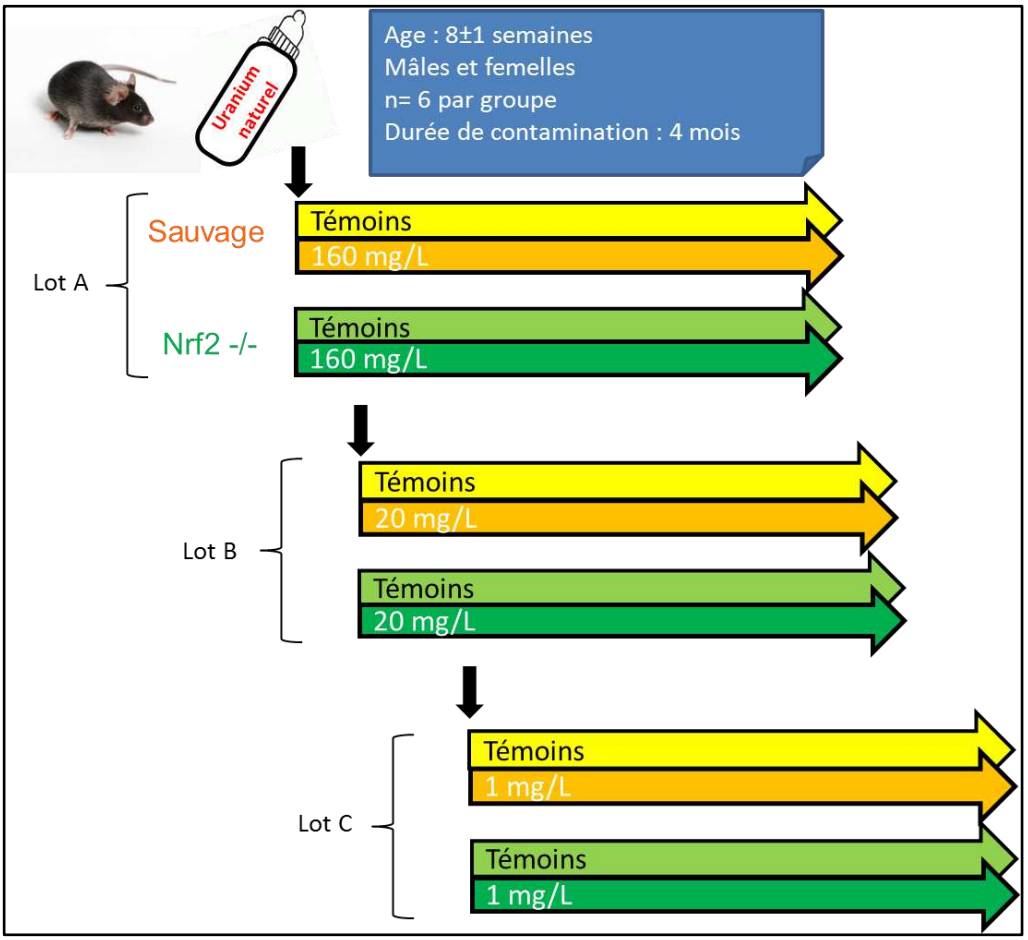

Figure 24 : Le protocole de contamination des souris KO Nrf2 et WT à l'uranium pendant 4 mois.

Il faut noter qu'en raison de leur isotopie proche et de leur toxicité décrite comme essentiellement chimique, lors de ces 2 protocoles les rats ont été contaminés par des concentrations quasiment similaires.

Par ailleurs, durant ces deux périodes de contamination, un suivi régulier de la fonction rénale a été réalisé : les animaux sont mis en cage à métabolisme soit toutes les deux semaines dans le cas de la contamination pendant 3 mois, soit de façon mensuelle dans le second protocole. Les animaux sont alors placés individuellement dans la cage à métabolisme pendant 48 heures, seules les urines des 24 dernières heures étant collectées. La *Figure 23* représente les deux protocoles « effet-dose ».

b. Contamination des souris

Le protocole de contamination des souris se déroule en trois phases, chacune correspondant à une concentration en UN différente (1, 20 ou 160 mg/L), pendant un temps de contamination identique de 4 mois. Comme indiqué précédemment, ces trois phases incluant chacune un lot d'animaux différents sont liées à la difficulté d'obtention d'un élevage de souris KO Nrf2 suffisamment conséquent pour réaliser la contamination en seule phase. Ceci est dû au faible taux de reproduction des femelles Nrf2 $^{-/-}$ et au taux de mortalité élevé des petits.

A chaque fois, il y a un groupe d'animaux témoins qui reçoivent de l'eau de source. Le choix des concentrations présente un double objectif : i) encadrer la concentration maximale d'uranium retrouvée dans un puits d'eau en Finlande (Salonen 1994) ; ii) se placer dans des conditions similaires à une étude réalisée précédemment au laboratoire où des perturbations de l'équilibre pro/anti-oxydant avaient été observées (Taulan *et al.* 2004).

Nombre de cellules par puits	Ensemencement	Durée de traitement								Contamination par l'Uranium (en µM)							Traitement (en µM)						Analyses
		15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	0	10	50	100	500	700	1000	SFN 10	SFN 20	Cd 150	Cd 300	H_2O_2 250	H_2O_2 500	
10 000	Plaque 96 puits					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x		Activité des caspases 3/7
150 000	Plaque 96 puits	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					Expression génique et LDH
100 000	Plaque 12 puits					x				x			x	x		x						x	Formation des anions superoxydes
4 millions	Plaque 6 puits			x	x	x			x	x			x	x	x	x		x					Expression protéique de Nrf2
1 million	Boite de pétri	x	x	x	x				x	x		x	x										SIMS

Tableau 10 : Les différents protocoles de traitement sur les cellules HepG2

Pour chaque phase du protocole, dite Lots A (160 mg/L), B (20 mg/L) et C (1 mg/L), il y a 8 groupes d'animaux comme le montre la *Figure 24*:

- un groupe WT non contaminé mâle,
- un groupe WT non contaminé femelle,
- un groupe Nrf2$^{-/-}$ mâle non contaminé,
- un groupe Nrf2$^{-/-}$ non contaminé femelle,
- un groupe WT contaminé mâle,
- un groupe WT contaminé femelle,
- un groupe Nrf2$^{-/-}$ contaminé mâle,
- un groupe Nrf2$^{-/-}$ contaminé femelle.

Une fois par mois, les animaux sont placés par 2 ou 3 en cage à métabolisme pour collecter les urines pendant 24 heures.

2. Contamination et traitement des cellules

Le *Tableau 10* résume les différentes contaminations et traitement réalisés sur les cellules. Le choix des concentrations en uranium dépend des analyses réalisées. La gamme des concentrations utilisées (10 - 1000 µM) s'étend de faibles concentrations à des concentrations décrites comme cytotoxiques (> 300 µM) (Rouas *et al.* 2010) et permet aussi de se placer dans des conditions expérimentales comparables aux précédentes études réalisées au laboratoire (Gueguen *et al.* 2013 ; Rouas *et al.* 2010).

La concentration en bicarbonate de sodium est de 10 mM pour toutes les cellules quelle que soit l'analyse effectuée.

a.1 Analyse de l'expression génique et de la mort cellulaire

Les cellules ont été exposées pendant 15, 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures à des concentrations en nitrate d'uranyle (UA) de 10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM *via* le milieu de culture.

a.2 Analyse de l'expression protéique de Nrf2

Les cellules sont incubées pendant 1, 2, 4 ou 24 heures avec une solution d'UA aux concentrations suivantes : 100, 300, 500, 700 et 1000 µM.

a.3 Evaluation de la production d'anions superoxydes

Les cellules HepG2 ont été mises en présence de solutions d'UA aux concentrations suivantes : 100, 300, 500 et 1000 µM durant 4 heures.

a.4 Analyse SIMS

Les cellules hépatiques ont été mises en contact avec le nitrate d'uranyle à une concentration de 50 µM d'UA pendant 30 minutes, 1, 2 et 24 heures.

a.5 Traitement des cellules

✷ Induction d'un stress oxydant

Les cellules ont été mises en culture pendant différents temps (15 minutes à 24 heures) en présence d'une part d'UA seul, d'inducteur de stress oxydant seul à différentes concentrations : cadmium (50, 100, 150 et 300 µM) ou eau oxygénée (250 et 500 µM).

✷ Induction de Nrf2

Les cellules ont été exposées pendant différents temps (15 minutes à 24 heures) en présence d'UA seul (10 à 1000µM) pour les mesures d'expression géniques. Les cellules ont été exposées uniquement à des concentrations de 100, 300, 500, 700 et 1000 µM d'UA ou de SFN seul à 20 µM pendant 1, 4 et 24 heures pour les mesures de l'expression protéique de Nrf2.

B. Analyses post-mortem

1. Prélèvement de matériel biologique

Les animaux sont anesthésiés par inhalation de 95 % d'air mélangé à 5 % d'isoflurane (Florène®, Abbot France, Rungis, France). Le sang est prélevé par ponction intracardiaque. Chez le rat, le sang est prélevé sur tube hépariné pour récupérer le plasma, alors que chez la souris le sang est prélevé grâce à une seringue préalablement héparinée puis déposé dans un tube. Les prélèvements sont ensuite centrifugés (10 minutes, 4000 g, 4°C) puis le plasma est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.

Le prélèvement du foie et des reins se fait en parallèle et sur la glace. Ils sont ensuite pesés. Une partie de chaque organe est placée dans du formaldéhyde 4 % afin d'être incluse en paraffine *(cf. II.B.4.b p. 195)*, une autre mise de côté pour le dosage de la quantité d'uranium accumulée par organe *(cf. II.B.2.a p. 191)*. Le reste est congelé à -80°C pour analyse de marqueurs de l'équilibre pro/anti-oxydant.

Pour le rein, quelques mm^3 de rein sont prélevés pour les analyses SIMS.

Chez le rat, les reins sont méticuleusement disséqués afin de séparer le cortex et la médulla. En effet, le cortex est la structure rénale qui accumule le plus d'uranium (Diamond *et al.* 1989). Chez la souris, en raison de leur petite taille et afin d'optimiser la quantité de tissu, les parties corticale et médullaire n'ont pas été dissociées.

2. Evaluation de la contamination

a. Dosage de l'uranium

La quantité d'uranium accumulée est mesurée au niveau tissulaire et urinaire grâce à un spectromètre de masse de type ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrophotometer, ICPMS-VGPQ, Excell, ThermoElectron, Courtaboeuf, France).
La mesure de l'uranium est faite à partir d'une gamme d'étalonnage et en utilisant le bismuth comme témoin interne (1 µg/L). La limite de détection de l'appareil est de 0.5 ng/L pour ^{238}U et de 0.01 ng/L pour ^{235}U.
Les tissus subissent préalablement une étape de minéralisation. Ainsi 8 mL d'acide nitrique à 70% et 2 mL de peroxyde d'hydrogène sont d'abord ajoutés aux échantillons ; puis la minéralisation est réalisée dans un four à micro-ondes de 1000 W (Ethos Touch, Milestone Microwaves Laboratory Systems, Begamo, Italy) selon le programme suivant : 20 minutes de montée en température puis 10 minutes à 180 °C. Puis l'uranium est dosé.

b. Technique SIMS

b.1 Principe

La technique de microscopie SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) permet l'analyse élémentaire et isotopique d'une surface solide par un faisceau d'ions couplé avec un spectromètre de masse. Le principe de cette technique repose sur le décollement de quelques couches atomiques de la surface d'un échantillon, provoqué par le bombardement d'ions primaires (O_2^+, O^-, Cs^+, Ar^+). Ces derniers pénètrent dans la surface solide et transfèrent une partie de leur énergie cinétique aux particules cibles créant ainsi des cascades de collision qui incitent l'émission de particules superficielles (atomes ou molécules) dans un état chargé ou non. Ces « ions secondaires » sont représentatifs de la composition élémentaire et isotopique du secteur analysé bombardé. Ils vont être accélérés et analysés par le spectromètre de masse selon le rapport masse sur charge. Les ions décollés de chaque point de la surface bombardée sont concentrés dans une image par une lentille d'objectif d'immersion.

Solution	Temps (minutes)
Formol	10
Ethanol 80°	10
Ethanol 80°	25
Ethanol 95°	10
Ethanol 95°	25
Ethanol 100°	25
Butanol	15
Butanol	15
Toluène	40
Xylène	40
Paraffine	15
Paraffine	30
Paraffine	60
Paraffine	60

Tableau 13 : Les différentes étapes de déshydratation des échantillons biologiques par le VIP.

Solution	Temps (minutes)
Xylène	3
Xylène	3
Alcool 100°	3
Alcool 100°	3
Alcool 100°	3
Eau courante	15
Triton X-100 0,1%	10
Eau courante	15
H_2O_2 3%	10
Eau courante	15

Tableau 12 : Les différentes étapes de déparaffinage avant la coloration.

Solution	Temps (minutes)
Eau courante	2
Hemalun	15
Eau courante	1,5
Eau courante	1,5
Alcool HCl 1%	0,5
Eau courante	0,5
Eau courante	1,5
Carbonate de Lithium	2
Eau courante	0,5
Eau courante	1,5
Erythrosine 1%	0,1
Eau courante	0,5
Eau courante	1,5
Alcool 100°	1
Alcool 100°	1
Safran	4
Alcool 100°	0,5
Alcool 100°	1
Xylène	1
Xylène	2

Tableau 113 : Les différentes étapes de la coloration HES.

Les analyses SIMS sont réalisées en utilisant un appareil CAMECA IMS 4F E7.
Les images d'$^{40}Ca^{+}$ permettent d'observer la structure histologique du rein et celles d'$^{238}U^{+}$ montrent la distribution de l'uranium dans ces structures.
Ces analyses ont été réalisées au laboratoire de radiochimie de l'IRSN.

b.2 Préparation des échantillons

Les échantillons de reins prélevés lors du sacrifice sont tout d'abord fixés dans une solution de cacodylate de sodium contenant 6% de glutaraldéhyde pendant 24 heures à 48°C. Puis ils subissent tout d'abord une étape de déshydratation dans différents bains d'éthanol et d'oxyde de propylène puis les tissus sont imprégnés par une solution d'oxyde de propylène et d'Epon (Clerc *et al.* 1997). Enfin, les échantillons sont inclus dans une résine de type Epon. Des coupes sériées de 0,5 µm d'épaisseur sont coupées et posées sur des supports polis de silicium ultra pur pour l'analyse SIMS ou sur des lames pour un contrôle histologique au microscope optique.

3. Dosage des paramètres biochimiques classiques

La mesure des paramètres biochimiques plasmatiques et urinaires (Calcium, Chlore, Sodium, Potassium, Magnésium, fer, ferritine, transferrine, Cholestérol, HDL cholestérol, LDL cholestérol, triglycérides, ASAT, ALAT, phosphatase alcaline, bilirubine totale, glucose, céruloplasmine, albumine, urée, acide urique, protéines totales, phosphores créatinine et créatine kinase) a été réalisée sur l'automate Konelab 20 (ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Tous les réactifs proviennent de Thermo Fisher Scientific Electron (Asnières, France).

4. Analyse histologique

a. Préparation des échantillons

Les échantillons prélevés lors du sacrifice et mis dans du formaldéhyde sont ensuite mis en cassettes de taille inférieure à 1 cm^3. Ces dernières sont disposées dans la cuve d'un automate de déshydratation (Tissue-Tek VIP, Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) qui réalise les étapes de déshydratation et d'imprégnation en paraffine comme le montre le *Tableau 11*.

Renal lesions	Scores
Glomerular damages	
Glomerulosclerosis	
None	0
Mesangial proliferation and/or sclerosis in few glomerulus (minimal)	1
Mesangial proliferation and/or sclerosis in <20% of glomerulus (mild)	2
Mesangial proliferation and/or sclerosis in 20-50% of glomerulus (moderate)	3
Mesangial proliferation and/or sclerosis in >50% of glomerulus (marked)	4
Glomerular cystic dilatation	
None	0
Minimal glomerular cystic dilatation (<3 cysts per section)	1
Mild glomerular cystic dilatation (3-5 cysts per section)	2
Moderate glomerular cystic dilatation (6-10 cysts per section)	3
Marked glomerular cystic dilatation (>10 cysts per section)	4
Tubulointerstitial damages	
Tubular necrosis	
None	0
Single tubular necrosis	1
Tubular necrosis of <20% tubules	2
Tubular necrosis of 20-50% tubules	3
Tubular necrosis of >50% of tubules	4
Tubular regeneration	
None	0
Rare foci of early regeneration	1
Some foci of early regeneration	2
Many foci of early regeneration	3
Extensive early tubular regeneration	4
Tubular dilatation / hyaline casts	
None	0
Occasional hyaline casts	1
Tubular dilatation of <20% tubules	2
Tubular dilatation of 20-50% tubules	3
Tubular dilatation of >50% of tubules	4
Interstitial inflammation	
None	0
Minimal inflammation, focal or multifocal	1
Mild inflammation, multifocal	2
Moderate inflammation, multifocal or diffuse	3
Marked inflammation, multifocal or diffuse	4
Interstitial fibrosis	
None	0
Few interstitial fibrosis foci (peri-tubular, peri-glomerular)	1
Interstitial fibrosis involving <20% of renal parenchyma	2
Interstitial fibrosis involving 20-50% of renal parenchyma	3
Interstitial fibrosis involving >50% of renal parenchyma	4

Tableau 15 : Score histologique des lésions rénales

Hepatic lesions	Scores
Inflammation (perivascular/intra-parenchymatous)	
None	0
Minimal inflammation, multifocal	1
Mild inflammation, multifocal	2
Moderate inflammation, multifocal or generalized	3
Marked inflammation, multifocal or generalized	4
Necrosis (intra-parenchymatous)	
None	0
Minimal (acidophilic bodies in <1/3 of lobules area)	1
Mild (scattered foci of necrosis in <1/3 of lobules area)	2
Moderate (involvement of 1/3-2/3 of lobules area)	3
Marked (involvement of >2/3 of lobules area)	4
Cytoplasmic vacuolation (micro-vacuoles, macro-vacuoles)	
None	0
Minimal (vacuoles in few scattered cells)	1
Mild (some foci of vacuolated cells)	2
Moderate (many foci of vacuolated cells, coalescing)	3
Marked (diffuse vacuolation of hepatocytes)	4
Fibrosis	
No fibrosis	0
Rare fibrous foci	1
Some fibrous foci	2
Bridging fibrosis	3
Cirrhosis	4

Tableau 14 : Score histologique des lésions hépatiques

En effet, la première étape de déshydratation consiste à remplacer l'eau présente dans les cellules par de l'alcool 100 %, lequel sera ensuite substitué par du toluène qui lui-même sera remplacé par de la paraffine.

b. Inclusion en paraffine des tissus et coupe histologique

Après l'étape de déshydratation, les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur seront ensuite réalisées grâce à un microtome (Accu-Cut SRM, Sakura). Puis les coupes sont déplissées dans un bain à 37°C et déposées sur des lames en verre.

c. Déparaffinage et coloration Hématoxyline Eosine Safran

L'étape de déparaffinage des coupes est faite par un automate (DRS 601, Sakura) selon le programme décrit dans le *Tableau 12*.
Ensuite, une coloration Hématoxyline Esoine Safran (HES) est réalisée avec le même automate et en suivant le programme détaillé dans le *Tableau 13*.
La coloration HES permet de marquer en violet les noyaux des cellules, en rose le cytoplasme et en orange le collagène.

d. Lecture histologique des lames

Les lames ont été lues en aveugle par un laboratoire d'anatomopathologie (Biodoxis, Romainville, France). Les différents critères d'évaluation sont répertoriés dans les *Tableau 14 &Tableau 15*.

5. Quantification de l'expression génique

a. Extraction des ARN messagers tissulaires

La totalité des ARNs est extraite, à partir des tissus conservés à -80°C, avec le Rneasy total RNA isolation kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant *(Figure 25)*.

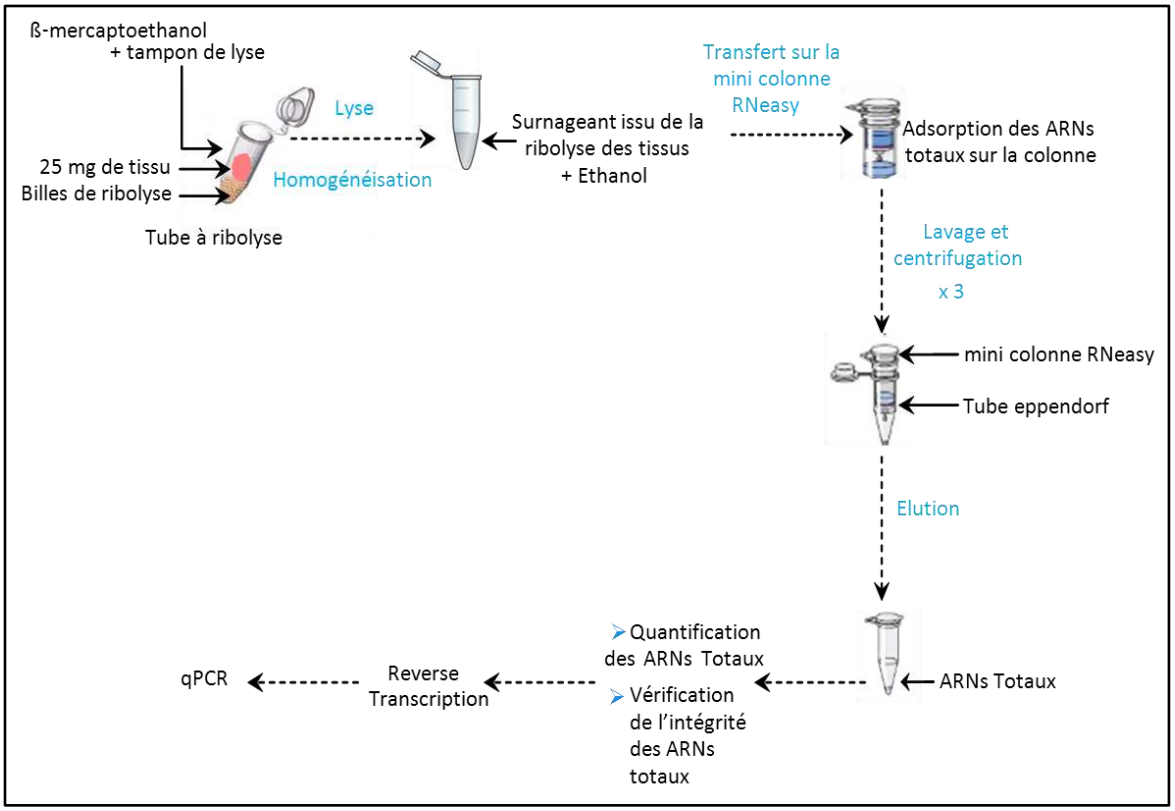

Figure 25 : L'extraction des ARN d'après le kit Qiagen®

Le tissu, environ 25 mg par échantillon, est tout d'abord lysé dans un tampon de lyse à 1% de β-mercaptoéthanol (tampon contenant de la guanidine-thiocyanate qui a un fort pouvoir dénaturant) puis ribolysé. Après centrifugation (16000 g pendant 3 minutes) le surnageant est homogénéisé en ajoutant 350 µL d'éthanol à 70% afin d'augmenter la spécificité de liaison des ARNs avec la membrane de la colonne. Le mélange est ensuite transféré sur une mini colonne Rneasy en résine de silice.

Celle-ci est centrifugée 1 minute à 16000 g. Un premier rinçage est effectué et la colonne est de nouveau centrifugée 1 minute à 16000 g. Afin d'éliminer les traces d'ADN, de la DNAse est ajoutée à la colonne. Après incubation pendant 15 minutes, différents rinçages sont effectués avec deux tampons successifs. Suite au troisième et dernier rinçage, 50 µL d'eau dépourvue de RNAse sont ajoutés à la colonne afin d'éluer les ARN. Celle-ci est ensuite centrifugée pendant 1 minute à 16000 g afin de récupérer les ARN.
La détermination de la concentration d'ARN se fait par lecture de l'absorbance à 260 nm (NanoDropTM 1000, Thermo Scientific, logiciel : ND-1000 V3.5.1, Labtech, France). La mesure du rapport DO 260/DO 280 permet de vérifier la pureté des ARNs, ce rapport doit être compris entre 1,75 et 2,00. L'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en condition dénaturante, avec révélation au bromure d'éthidium. Les ARNs sont conservés à -20°C.

b. Reverse-transcription (RT)

La reverse transcription ou transcription inverse est l'étape qui permet la synthèse d'ADNc à partir d'un brin d'ARN, réaction catalysée par l'ARN Polymérase.
Elle est réalisée en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life, Division Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Dans chaque puits, il y a un volume d'ARNs totaux correspondant à 1 µg d'ARN, le volume est complété par de l'eau dépourvue de RNAse de telle sorte que le volume soit de 10 µL puis 5,8 µL d'un mix réactionnel contenant des dNTP, des amorces, de la reverse transcriptase et 4,2 µL d'eau dépourvue de RNAse sont ajoutés. Le volume final est de 20 µL.

Gène	Sens	Anti-sens	Référence
HPRT	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC	Ropenga *et al.,* 2004
GAPDH	GGCCAAGGTCATCCATGA	TCAGTGTAGCCCAGGATG	Primer express
CAT	GAGAGGAAACGCCTGTGTGAG	AAGAGCCTGGACTCGGGCCC	Singh *et al.*, 2004
Cu, Zn SOD	GATTAACTGAAGGCGAGCAT	CCGCCATGTTTCTTAGAGT	Itoh *et al.*, 2004
GCS	GGAACGATGTCCGAGTTCAA	GTTATCGTGCAAAGAGCCTGAT	Primer express
GGT	AGAGCCTTGGACAAAAAACGG	TGCAACGTATCGGCCAACT	Primer express
GPx	TGCAATCAGTTCGGACATCA	ACCATTCACCTCGCACTTC	Itoh*et al.*, 2004
GR	TTGCTGGCCTCTATTCACTGG	ATTACCTCCGCCCTCTCTTTG	Poisson *et al.*, 2013
GS	TTGTGCCTCTATTCACTGG	ATTACCTCCGCCCTCTCTTTG	Poisson *et al.*, 2013
GSTA2	TTGACATGTATTCAGAGGGT	TTGTTTTGCATCCATGGCTG	Rouas *et al.*, 2009
HO-1	ATGCCCCACTCTACTTCCCTGA	TGCTGTGTGGCTGGTGTGTAAG	Poisson *et al.*, 2013
Mn SOD	ACGCGACCTACGTGAACAATCT	CAGTGCAGGCTGAAGAGCAA	Chen *et al.,* 2003
NQO1	AACGTCATTCTCTGGCCAATTC	GCCAATGCTGTACACCAGTTGA	Wierinckx *et al.*, 2005
Nrf2	TGGGTTCAGTGACTCGGAAAT	TGGCTGTGCTTTAGGTCCATT	Primer express

Tableau 16 : Séquences des gènes évalués chez le rat

Dans le thermocycleur, le mélange est incubé pendant 10 minutes à 25°C puis la synthèse d'ADNc s'effectue pendant 120 minutes à 37°C. La réaction se termine par dénaturation de l'enzyme durant 5 minutes à 85°C puis retour à 4°C.
Les ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

c. Réaction de polymérisation en chaine en temps réel

La Polymerase Chain Reaction (PCR) semi-quantitative en temps réel a été utilisée pour déterminer l'expression de nombreux gènes dont les séquences sont reportées dans le *Tableau 16* pour le rat et le *Tableau 17* pour les études réalisées chez la souris. Les séquences d'amorces utilisées proviennent soit directement de la littérature (Chaudhari *et al.* 2009 ; Chen *et al.* 2003 ; Hiramatsu *et al.* 2007a ; Itoh *et al.* 2004 ; Lungato *et al.* 2013 ; Maher *et al.* 2007 ; Poisson *et al.* 2013 ; Ropenga *et al.* 2004 ; Singh *et al.* 2004 ; Sugimoto *et al.* 2010 ; Ungvari *et al.* 2010 ; Wierinckx *et al.* 2005 ; Xu *et al.* 2012 ; Zhang *et al.* 2012 ; Zhao *et al.* 2012), soit elles sont préalablement déterminées au sein du laboratoire à l'aide du logiciel Primer Express et commandées chez Life technologies.
Dans une plaque 384 puits, 6 µL d'ADNc (préalablement dilué au 1/50ème soit 1 ng/µL) sont déposés dans chaque puits. Puis 4 µL d'un mélange réactionnel sont ajoutés. Ce mélange est constitué d'eau stérile (14,5 % v/v), des amorces sens et antisens (Invitrogen, France) (2,5 % v/v) et du Power SYBR® Green Master Mix (Life, France) (83 % v/v). Ce dernier a la particularité de s'incorporer de façon non spécifique au sein d'un double brin d'ADN et d'émettre une fluorescence à 530 nm. Le volume total dans chaque puits est de 10 µL.
L'amplification est réalisée *via* un système de détection AbiPrism 7900 Sequence (Life Technologies) selon le programme suivant : 1 cycle à 50°C pendant 2 minutes, suivi d'1 cycle à 95°C durant 10 minutes, puis 40 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C et 1 minute d'hybridation – élongation à 60°C, enfin l'étape de dissociation avec deux fois 15 secondes à 95°C puis à 60°C.
Les gènes rapporteurs, l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) et la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase (GAPDH) permettent de normaliser l'expression des gènes cibles.

Gène	Sens	Anti-sens	Référence
HPRT	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	Primer Express
GAPDH	AGCTTGTCATCAACGGGAAG	TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	Guerrot *et al.*, 2011
CAT	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	GGGTGACCTCAAAGTATCCAAA	Zhao *et al.*, 2011
Cu, Zn SOD	TGGTGGTCCATGAGAAACAA	GTTTACTGCGCAATCCCAAT	Xu *et al.*, 2012
GCS	AGCATCTGGAGAACTAATGACTG	CAAGTAACTCTGGACATTCACAC	Ungvari *et al.*, 2010
GGT	GGTGTTCTGCCGCCAAGGGAAGG	GAGACACATCGACAAACTTTGGG	Hiramatsu *et al.*, 2007
GPx	GGGACTACACCGAGATGAACG	TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC	Zhao *et al.*, 2011
GR	CGGCGATCTCCACAGCAATG	ACCGCTCCACACATCCTGATTG	Chaudhari *et al.*, 2009
GS	ACGCTTTTCCCCTCACCAGTACC	GTCGGTGCACAGCTGGAGTCC	Chaudhari *et al.*, 2009
GSTA1	GACTGTGAGCTGAGTGGAGAAGAA	CCGGCCATTGCAGCAA	Sugimoto *et al.*, 2010
HO-1	CTGTGAACTCTGTCCAATG	AACTGTGTCAGGTATCTCC	Ungvari *et al.*, 2010
Mn SOD	ACACATTAACGCGCAGATCA	AATATGTCCCCCACCATTGA	Lungato *et al.*, 2013
NQO1	ATGAAGGAGGCTGCTGTAG	AGATGACTCGGAAGGATACTG	Ungvari *et al.*, 2010
Nrf2	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA	GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT	Zhang *et al.*, 2012

Tableau 17 : Séquences des gènes évalués chez la souris

La quantification des ARNm se fait par la méthode de comparaison des C_T (Cycle Threshold), c'est à dire le nombre de cycles réalisés à une fluorescence donnée. La moyenne des C_T des gènes de référence et la moyenne des C_T du gène d'intérêt sont comparés entre chaque groupe.

La quantification est déterminée par la formule $2^{-\Delta\Delta CT}$, où $\Delta\Delta C_T$ correspond à la différence entre le ΔC_T des animaux contaminés et celui des animaux témoins, ΔC_T étant la différence du nombre de C_T du gène d'intérêt et la moyenne géométrique des C_T des gènes de référence (Vandesompele *et al.* 2002), soit la formule suivante :

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T\ \text{gène d'intérêt}} - C_{T,\ \text{gènes de référence}})_{\text{Animaux contaminés}} - (C_T\ \text{gène d'intérêt} - C_{T\ \text{des gènes de référence}})_{\text{Animaux témoins}}$$

6. Analyse du stress oxydant

a. Dosage de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des TBARS d'après la méthode d'Ohkawa (Ohkawa *et al.* 1979) dans le plasma, le rein et le foie.

Pour les reins et foie, 25 milligrammes de tissu ont été homogénéisés dans un tampon RIPA et centrifugés à 1600 g pendant 10 minutes à 4° C (le plasma ne nécessitant pas cette préparation). Puis, 100 µL de l'échantillon ou du standard, 200 µL de solution Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, réf. L3771, Sigma-Aldrich) à 8,1%, 1,5 mL d'acide acétique à 20%, 1,5 mL d'acide thiobarbiturique 0,8 % (TBA, réf. T5500, Sigma-Aldrich) et 0,7 mL d'eau sont ajoutés dans un tube de verre. Après une heure dans l'eau bouillante, la réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans la glace pendant 10 minutes. Puis une extraction par le mélange butanol/pyridine (réf. 270970, Sigma-Aldrich) (15 : 1 v/v) a été réalisée. Après ajout de 1 mL d'eau, les tubes ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4° C. 100 µL de surnageant ont été prélevés en triplicat et déposés dans une plaque. L'absorbance est lue à 530 nm. Les résultats sont comparés à une gamme d'étalonnage de MDA.

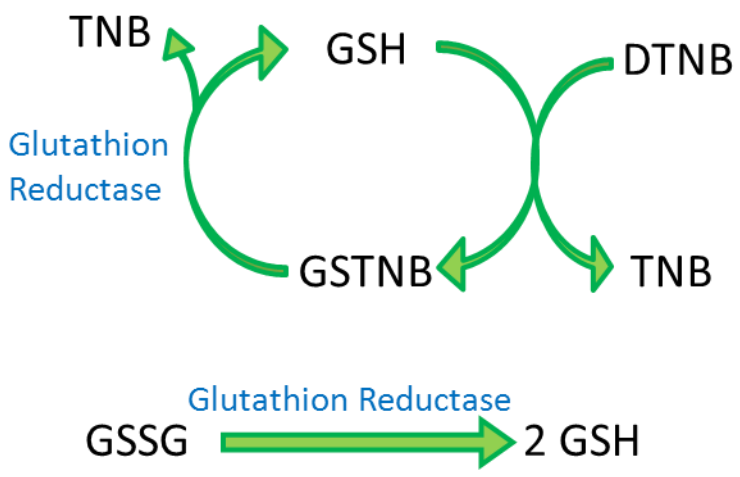

Figure 26 : Principe du dosage du glutathion

DTNB : acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque

GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GSTNB : glutathion réduit + acide 5-thio-2-nitrobenzoïque ; TNB : acide 5-thio-2-nitrobenzoïque

b. Préparation des échantillons et mesure de la concentration protéique

Pour chaque dosage d'activité, environ 25 mg de tissu (foie ou rein) ont été homogénéisés dans 10 volumes de tampon dont la composition est identique quel que soit le dosage et dont la composition est la suivante : 50 mM phosphate de potassium, pH 6-7, et éthylène diamine acide tétraacetique 1 mM (EDTA, réf. ED2SS, Sigma Aldrich).
Puis les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont prélevés et conservés à -80°C si le dosage n'est pas fait le jour même.

La quantité de protéines présente dans chaque échantillon est évaluée par la méthode Bradford utilisant l'albumine de sérum bovin comme étalon. Ce dosage utilise un colorant, le bleu de Coomassie (Protein Assay, Biorad, Marnes la Coquette, France) dont l'absorbance passe de 465 à 595 nm lorsqu'il se complexe avec les protéines.

c. Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)

Les dosages du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) ont été réalisés en utilisant le kit #703002 (Cayman Chemical, Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). Ce kit permet de doser séparément les deux formes du glutathion. Le dosage du GSH se fait selon une réaction mettant en jeu le groupement sulfhydrile du GSH. En effet ce dernier réagit avec l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) en produisant un composé jaune : l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) et le GSTNB (GSH + DTNB). Ce dernier est réduit par la glutathion réductase pour recycler le GSH et augmenter la production de DTNB *(Figure 26)*. La production de TNB étant directement proportionnelle la réaction de recyclage et donc au taux de GSH dans l'échantillon, la mesure de son absorbance à 405 nm permet de connaitre le taux de GSH dans l'échantillon. Le GSH est facilement oxydé en GSSG, mais en raison de la présence de GR, les deux formes sont dosées avec le kit.
Le dosage du glutathion nécessite après la préparation des échantillons décrite ci-dessus une étape supplémentaire de déprotéinisation pour éviter toute interférence. Cette étape consiste à ajouter au surnageant un volume équivalent d'acide métaphosphorique dilué au 1/10ème (réf. 23927-5, Sigma Aldrich) puis après centrifugation à 2000 g pendant 2 minutes les surnageants sont prélevés et le glutathion peut ensuite être dosé.

d. Dosage des activités enzymatiques : GR, GPx, GST

d.1 Glutathion Peroxydase

L'activité de la GPx est dosée de manière indirecte en utilisant le kit #703102 (Cayman Chemical) : il couple la réaction à celle de la GR. Le glutathion oxydé, produit lors de la réduction des hydroperoxydes par la GPx, est recyclé en glutathion réduit par la GR et le NADPH, H^+. L'oxydation du NADPH, H^+ en $NADP^+$ s'accompagne d'une diminution de l'absorbance à 340 nm qui est directement proportionnelle à l'activité de la GPx dans l'échantillon.

d.2 Glutathion Reductase

Le dosage de l'activité de la GR s'effectue avec le kit #703202 (Cayman Chemical) en utilisant l'oxydation du NADPH, H^+ : $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$. L'oxydation du NADPH s'accompagne d'une diminution de l'absorbance à 340 nm et est directement proportionnelle à l'activité de la GR dans l'échantillon.

d.3 Glutathion-S-Transférase

L'activité totale de la GST totale est mesurée en utilisant le kit #702202 (Cayman Chemical). La réaction de conjugaison entre le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène et le glutathion réduit s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance à 340 nm. Cette dernière est directement proportionnelle à l'activité de la GST.

Les activités enzymatiques sont exprimées en nmol/min/mg de protéines.

7. Dosages ELISA et EIA

a. KIM-1

Le dosage urinaire de KIM-1 a été effectué chez le rat et la souris en utilisant respectivement les kits « Rat TIM-1/KIM-1/HAVCR DuoSet» (réf. DY3689 Duo Set), et « Mouse TIM-1/KIM-1/HAVCR DuoSet » (réf. DY1817 Duo S) en respectant les indications du fournisseur (R&D Systems Europe, Lille, France). Les urines ont été préalablement diluées dans du PBS au 1/10ème pour le rat et au 1/5ème chez la souris.

b. Clusterine

Le dosage de la clusterine dans les urines de rats contaminés pendant 3 mois a été réalisé en utilisant le kit « Clusterin Rat ELISA » (réf. CS101 VA, BioVendor R&D, Euromedex, Souffelweyersheim, France) en respectant les indications du fournisseur. Les échantillons ont auparavant été dilués au 1/10ème dans un tampon de dilution fourni avec le kit.

c. GSTa-1

Le dosage urinaire de la GSTa 1 chez les rats contaminés pendant 3 mois a été effectué grâce au kit « ELISA GSTa1 » (réf. SEA609Ra, USCN, Euromedex, Souffelweyersheim, France) en suivant les instructions du fournisseur. Les urines sont dosées pures.

d. Thromboxane B2

Le dosage du Thromboxane B2 (TxB2) dans les urines de rat après 9 mois de contamination a été réalisé en utilisant le kit « TxB2 ELISA Kit » (réf. ADI-901-002, Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) en suivant les indications du fournisseur. Les urines sont diluées au 1/50ème avant d'être dosées.

e. Vitamine D

La vitamine D a été dosée sous deux formes - la 25-hydroxy vitamine D et la 1,25-di-hydroxy vitamine D au niveau plasmatique - chez le rat après 9 mois de contamination. La 25-hydroxy vitamine D est métabolisée par le foie et est ensuite elle–même métabolisée par le rein en 1, 25-di-hydroxy vitamine D qui constitue la forme active de la vitamine D.

Les deux dosages EIA (respectivement réf. AC-57F1 et réf. AC-62F1) ont été réalisés en utilisant les kits de chez Immuno Diagnostic System (Paris, France) et selon les indications du fournisseur.

HepG2	
RPMI 1640	500 mL
SVF (décomplémenté et filtré)	50 mL
L-Glutamine	Milieu initialement supplémenté
Pénicilline/ Streptomycine	5 mL

Tableau 18 : Composition du milieu de culture des cellules HepG2

C. Techniques d'analyse *in vitro*

1. Culture cellulaire

Les cellules sont toutes cultivées dans une étuve à 37°C, 5 % de CO_2.

a. Mise en culture

Les cellules sont conservées à -150 °C dans du milieu de culture et 20 % de DMSO. Lors de la mise en culture, les cellules sont décongelées le plus rapidement possible et déposées dans du milieu de culture préalablement chauffé à 37°C. Après centrifugation des cellules pendant 10 minutes à 1500 rpm afin d'éliminer le DMSO qui devient toxique à température ambiante, le culot est repris dans du milieu de culture propre. Les cellules sont ensuite dispersées dans des flasques de culture de 75 cm^2.

Il est possible après amplification des cellules de les congeler afin de garder la lignée cellulaire. Le milieu de culture est tout d'abord aspiré et un lavage avec du PBS stérile est réalisé. Une fois ce dernier retiré, les cellules sont décollées par ajout de 2 mL de Trypsine (réf.25300-054, Life Technologies) dont l'effet sera ensuite inhibé par ajout de milieu de culture. Les cellules sont ensuite culottées par centrifugation et reprises dans une solution contenant du milieu de culture et du DMSO 20%. Les cellules (1 mL) sont déposées dans des ampoules de congélation à raison de deux ampoules par flasque. Les ampoules sont enfin congelées de manière progressive : 3 heures à - 20 °C, 1 nuit à - 80°C puis conservation à -150°C.

b. Préparation du milieu

La composition du milieu de culture est spécifique à chaque lignée et détaillée dans le *Tableau 18.*

Etape	Volume déposé (mL)	Solution déposée	Temps de contact
1	8	Solution d'uranium	15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 16 et 24 heures
2	8	Fixateur	30 minutes
3	8	PBS	5 minutes
	8	PBS	5 minutes
	8	PBS	5 minutes
4	8	Éthanol 50°	5 minutes
	8	Éthanol 70°	5 minutes
	8	Éthanol 95°	5 minutes
	8	Éthanol 100°	5 minutes
	8	Éthanol 100°	5 minutes
	8	Éthanol 100°	5 minutes
5 (ICP-MS)	1	HNO_3 2%	Gratter les cellules et prélever 1 mL
5 (SIMS)	8	Résine Epon®	Inclusion en résine

Tableau 19 : Protocole de préparation des échantillons en vue des analyses SIMS et ICP-MS

c. Entretien des lignées

Quand les cellules atteignent 80% de confluence, soit tous les 3-4 jours, elles sont repiquées. Pour ce faire, le milieu de culture est tout d'abord retiré et remplacé par du PBS stérile, étape de lavage permettant l'élimination des débris cellulaires et du milieu contenant du SVF qui pourrait inhiber l'action ultérieure de la trypsine pour décoller le tapis cellulaire. Le PBS est ensuite remplacé par une solution de trypsine. Une fois les cellules décollées, elles sont culotées par centrifugation pendant 10 minutes à 1500 rpm puis reprises dans du milieu de culture à 37°C. Elles sont enfin redistribuées dans de nouvelles flasques (repiquage au 1 : 3).

d. Traitement des cellules

La majorité des analyses effectuées sur les cellules sont réalisées sur des microplaques de 6, 12 ou 96 puits à raison de 10 000 cellules et 4 000 000 cellules/puits. A 80% de confluence, les cellules sont traitées en duplicat ou triplicat pendant les temps d'exposition souhaités.

2. Dosage et localisation de l'uranium

a. Préparation des échantillons

Les cellules hépatiques sont ensemencées en boite de Pétri de 90 mm de diamètre à raison d'un million de cellules par millilitre. Quand la confluence atteint 80 %, les cellules sont ensuite contaminées par une solution de 100 µM d'UA pendant 15 minutes à 24 heures. Au terme du temps de contamination, les cellules subissent différents lavages comme indiqué dans le *Tableau 19* avant d'être soit incluses en résine pour les analyses SIMS, soit grattées dans de l'acide nitrique à 2 % et remises en suspension dans 4 mL d'acide nitrique à 69 % avant d'être conservées à 4°C pour des mesures quantitatives de l'uranium par ICP-MS.

b. Analyse SIMS

Les cellules incluses en résine permettent de réaliser des coupes soit de 800 nm pour les observations au SIMS, soit de 30 nm pour une observation au microscope optique. Dans ce cas, les coupes sont ensuite colorées pendant une minute dans un bain de bleu de toluidine. Le principe est le même que celui décrit précédemment *(cf. II.B.2.b.1 p. 191)*.

3. Test de cytotoxicité : mesure de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme libérée par les cellules lorsque leur membrane est rompue. Sa quantification dans le surnageant cellulaire permet d'estimer la mortalité cellulaire. Ce dosage est réalisé grâce au kit « Cytotoxicity Detection Kit PLUS » (réf. 047449260001, Roche-Applied-Science, Meylan, France) et en suivant les indications données par le fournisseur.

4. Evaluation du stress cellulaire

a. Extraction d'ARN messagers cellulaires et PCR

L'extraction d'ARNm et la RT sont réalisées en utilisant le kit « Power SYBR Green Cell to C_t » (réf. 4402954, Life Technologies). Une fois les cellules préalablement ensemencées en plaque 96 puits à raison de 150 000 cellules par puits et traitées aux conditions désirées, le milieu de culture est retiré et le tapis cellulaire est rincé au PBS stérile. Celui-ci est ensuite éliminé et remplacé par 50 µL d'une solution réactionnelle contenant 0,5 µL de DNAse et 49,5 µL de solution de lyse. Après homogénéisation par pipetage suivi d'une incubation de 5 minutes à température ambiante, 5 µL de solution stop sont ajoutés dans chaque puits et homogénéisés par pipetage. L'ARN est ainsi extrait directement des cellules dans la plaque. Le tout est ensuite conservé à -20°c si la RT n'est pas faite tout de suite.

La réaction de RT est réalisée en déposant dans une nouvelle plaque 10 µL des ARN précédemment extraits auxquels sont ajoutés 40 µL d'un mélange réactionnel dit « Master Mix » qui comprend les nucléotides et les amorces nécessaires à la RT. La plaque est ensuite incubée dans le thermocycler où elle subit le cycle suivant : 1 heure à 37°C puis 5 minutes à 95°C.

L'ADNc ainsi obtenu se conserve à -20°C jusqu'à utilisation.

Gène	Sens	Anti-sens	Référence
GAPDH	TCAACGGATTTGGTCGTATTG	TCTCGCTCCTGGAAGATGG	Muller *et al.*, 2007
CAT	CGCCTGGGACCCAATTATCT	GCCGTCACGCTGGTAGTTG	Primer express
Cu, Zn SOD	GGGCAATGTGACTGCTGACA	TGCGGCCAATGATGCA	Primer express
HO-1	TACCGCTCCCGCATGAA	CGCAGTCTTGGCCTCTTCTATC	Primer express
Mn SOD	CATCAACGCGCAGATCATG	TCGGTGACGTTCAGGTTGTTC	Primer express
Nrf2	CTCCTACACCAACGCCTTTCC	GGAGTTCGGACGCTTTGAAAC	Primer express

Tableau 20 : Séquences des gènes évalués au niveau cellulaire

La mesure de l'expression génique par PCR se fait selon le protocole détaillé précédemment (*cf. B.5.c p. 199*). Les séquences d'amorces de gènes utilisés sont rapportées dans le *Tableau 20*. Elles sont soit conçues au laboratoire à l'aide du logiciel Primer Express, et seules quelques-unes proviennent soit de références bibliographiques (Muller *et al.* 2007).

b. Mesure de l'activité des Caspases 3/7

L'activité des caspases 3/7 est mesurée en suivant les instructions fournies avec le kit « Caspase-Glo®3/7 » (réf. G-8091, Proméga, Charbonnieres, France). Les cellules ont été préalablement ensemencées à raison de 10 000 cellules par puits en plaque luminescence 96 puits.

c. Evaluation de la production d'anion superoxyde par le marquage au DHE

Le marquage au DHE permet d'évaluer la production d'anions superoxyde. Le DHE, molécule pouvant traverser librement les membranes cellulaires, est oxydé en présence d'$O_2^{\cdot -}$ en éthidium. Ce dernier est un produit fluorescent qui marque les noyaux en s'intercalant dans l'ADN. La fluorescence de l'éthidium est spécifique d'$O_2^{\cdot -}$ car les autres espèces réactives n'oxydent pas significativement le DHE.
Les cellules sont ensemencées en plaque 12 puits, à raison de 100 000 cellules par puits. Après 48 heures de croissance, les cellules sont traitées ou contaminées pendant 4 heures sauf un qui servira de témoin négatif. Après deux lavages au PBS stériles, la solution réactive de DHE est ajoutée dans chaque puits sauf dans le contrôle négatif où du milieu de culture seul est ajouté. La plaque est placée 30 minutes dans l'incubateur à 37°C. Ensuite, deux rinçages successifs au PBS stérile sont réalisés avant la lecture par microscopie à fluorescence (excitation : 488 nm, émission : 610 nm) avec un objectif x 20. Le logiciel de traitement des images Histolab® (Histolab Product, Suède) est couplé au microscope permettant l'acquisition des images.
Ce marquage est délicat à mettre en œuvre en raison de l'extinction rapide (environ 1 heure) de la fluorescence.

	Gel de concentration	Gel de séparation	Fournisseurs
Eau distillée	2,7 mL	4 mL	
Acrylamide	670 µL	3,3 mL	Biorad
Tris 1,5 M pH 8,8		2,5 mL	
Tris 0,5 M pH 6,6	500 µL		
SDS 10 %	40 µL	100 µL	Life Technologies
APS 10 %	40 µL	100 µL	Biorad
Temed	5 µL	5 µL	Biorad

Tableau 21 : Composition du gel d'acrylamide à 10 %

Antigène	Poids moléculaire (kDa)	Anticorps primaire		Anticorps secondaire		
		Réf.	Fournisseur		Réf.	Fournisseur
Nrf2 (H-300)	100	sc-13032	Santa Cruz	Anti IgG de lapin	Sc-2004	Santa Cruz
GAPDH	37	sc-25778	Santa Cruz	Anti IgG de lapin	Sc-2004	Santa Cruz

Tableau 22 : Références des anticorps utilisés pour le Western Blot

5. Analyse de l'expression protéique de Nrf2

a. Extraction et dosage des protéines totales

Les homogénats des protéines tissulaires totales sont obtenus après extraction des protéines grâce au tampon de lyse du kit « Mammalian cell lysis kit » provenant de chez Sigma Aldrich, en ajoutant 50 µL par culots de cellules. Le tampon de lyse est déposé sur le tapis cellulaire et à l'aide d'un grattoir les cellules sont décollées.
L'ensemble (tampon de lyse et cellules) est prélevé. Après homogénéisation et centrifugation (20 minutes, 11000 rpm, 4°C), le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.
Les protéines issues de culots cellulaires sont dosées par la technique Bradford *(cf. II.B.6.b p. 203)*.

b. Western Blot

Les protéines sont tout d'abord chargées par ajout de tampon Laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 20 % de glycérol ; 4 % de SDS ; 0,02 % de bromophénol ; 10 % de ß-mercaptoéthanol) puis dénaturées (95°C, 5 minutes) et enfin déposées sur un gel d'acrylamide à 10 % dont la composition est indiquée dans le *Tableau 21*.
Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un courant de 50 mA pendant 30 minutes puis 120 mA pendant 1h30 min. La révélation de la membrane avec du rouge ponceau permet de s'assurer de l'efficacité du transfert. Les sites aspécifiques sont saturés par un bain de TBS (Tert-Butyldiméthylsilyle) et lait écrémé 5 % durant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps (Ac) primaire pendant une nuit à 4°C. Après une succession de 5 rinçages par une solution de TBS-Tween 0,025 %, la membrane est incubée avec l'Ac secondaire couplé à la HorseRadish Peroxidase pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est à nouveau rincée par la solution de TBS-Tween 0,025 %, avant de révéler le marquage grâce au mélange Luminol/peroxyde du kit « Immobilon Western » (réf. WBKLS0500, Merck Millipore) reconnu par électro-chimioluminescence. Le signal de chimiluminescence est détecté par une caméra CDD (Las-3000, Fujifilm) et quantifié grâce au logiciel Multigauge.
Les Ac primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans le *Tableau 22*. Les valeurs ont été normalisées par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

D. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± l'écart-type à la moyenne. Ce dernier correspond en anglais au terme SEM (*Standard Error of Mean*).

Trois types de tests statistiques ont été utilisés au cours de ce travail. Ainsi, une analyse à un ou deux paramètres (One ou Two Way ANOVA) a été choisie pour les études menées chez l'animal. Au niveau cellulaire, un test *t* de student a été utilisé.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigma Plot version 11.0 (Systat Software, Inc). La différence entre les groupes est considérée comme significative dès que p est inférieur à 0,05.

RESULTATS

I. Etude des effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système anti-oxydant chez le rat selon un protocole « effet-dose »

A. Contexte

Le rein, et plus particulièrement le TCP, est décrit comme la cible préférentielle d'accumulation de l'uranium et donc de sa toxicité (La Touche *et al.* 1987 ; Leggett 1989). L'uranium, après exposition aiguë à très forte dose, induit une néphrite tubulaire chez le rat aboutissant à la mort de l'animal (Domingo *et al.* 1987). Cependant, une seule étude de contamination chronique a été réalisée avec des concentrations d'uranium comprises entre 0,96 mg/L et 600 mg/L pendant 3 mois (Gilman *et al.* 1998b) : des lésions histologiques tubulaires et glomérulaires ont été décrites.

La fonction hépatique est également prépondérante dans le métabolisme des xénobiotiques : c'est le siège de réactions de détoxification. L'uranium, comme toutes les substances, subit un passage hépatique même s'il s'y accumule en moins grande quantité que dans le rein.

Dans le cas d'une exposition à l'uranium, différents mécanismes de toxicité ont été évoqués et notamment la perturbation de l'équilibre pro/anti-oxydant (Banday *et al.* 2008 ; Lestaevel *et al.* 2009 ; Taulan *et al.* 2006 ; Yapar *et al.* 2010). Néanmoins, il existe peu de données sur l'activation de ce système au niveau hépatique et rénal dans le cas d'une contamination chronique par l'uranium.

Ce travail présente un double objectif : i) déterminer à partir de quelle concentration des effets néphrotoxiques sont observés dans le cas d'une contamination chronique par l'uranium et ii) étudier le système pro/anti-oxydant suite à une contamination chronique à l'uranium pour déterminer s'il est impliqué dans la néphrotoxicité précédemment décrite.

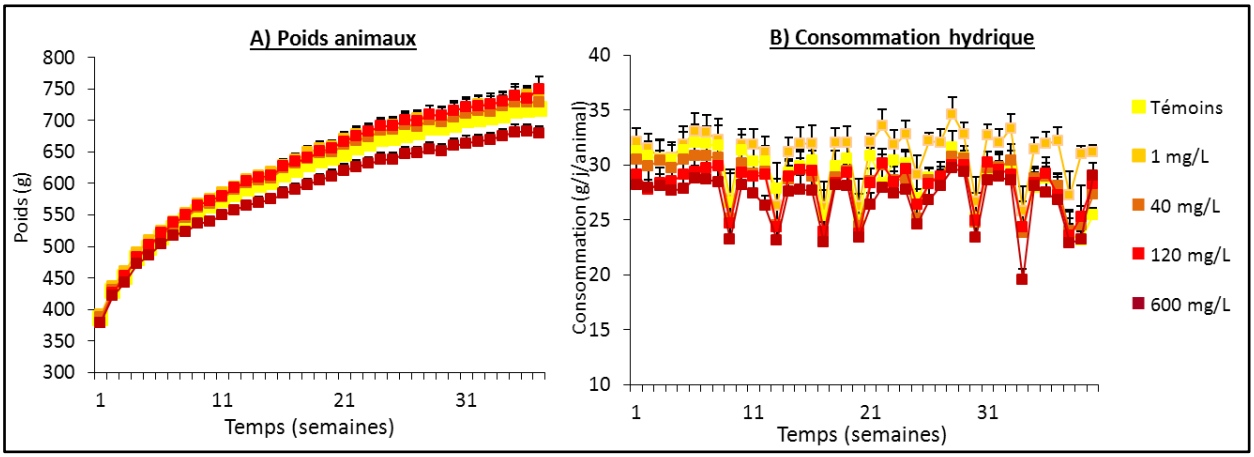

Figure 27 : Suivi longitudinal des animaux pendant 9 mois de contamination par l'uranium *via* la pesée (A) et la consommation hydrique (B) hebdomadaires

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12).

A)

Concentration en Uranium (mg/L)	Quantité d'Uranium (ng/g d'organe)		
	Foie	Fémur	Rein
0	0,3 ± 0,02	7,3± 1,7	7,1 ± 1
1	0,6 ± 0,2	7,5 ± 0,3	11,6 ± 1,1
40	1,2 ± 0,1	61 ± 5,5	208 ± 10,8
120	3,5 ± 0,3*	386 ± 24,7*	1056 ± 185,7*
400	7 ± 0,63*	987 ± 72,6*	2669 ± 362,5*

B)

Concentration en Uranium (mg/L)	Quantité d'Uranium (ng/g d'organe)		
	Foie	Fémur	Rein
0	0,2 ± 0,02	6,99 ± 0,8	6,584 ± 1,1
1	0,2 ± 0,02	9,99 ± 0,9	12,893 ± 1,4
40	1,9 ± 0,6*	176 ± 19,1*	217 ± 34,7*
120	3,6 ± 0,2*	525± 39,4*	1038 ± 246,4*
600	24 ± 1,9*	2626 ± 342,2*	6132 ± 768*

Tableau 23 : Mesure de l'uranium dans le foie, l'os (fémur) et le rein après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium (1,40, 120, 400 ou 600 mg/L)

La concentration est mesurée dans les tissus par ICP-MS et est exprimée en ng/g de tissu. Les valeurs sont représentées par la moyenne ± l'écart-type à la moyenne. Tableau A, n=6 pour chaque condition. Tableau B, n=12 pour chaque groupe. La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120, 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

Pour répondre à ces questions, deux protocoles « effet-dose » de contamination chronique par l'uranium pendant 3 et 9 mois chez le rat ont été mis en place. Dans les deux cas, les animaux ont été contaminés *via* l'eau de boisson à différentes concentrations d'uranium incluant des concentrations environnementale (1 mg/L), supra-environnementale (40 mg/L) et potentiellement toxiques (120, 400 ou 600 mg/L).

B. Résultats

1. Suivi longitudinal

Tout au long de la contamination, un suivi des animaux est réalisé à travers une pesée hebdomadaire des animaux et de leur consommation alimentaire et hydrique. Dans cette partie, les résultats obtenus étant similaires après 3 et 9 mois de contamination, seules les données concernant la contamination de 9 mois sont présentées sur la *Figure 27*.

a. Poids

Dans nos conditions expérimentales, la contamination par l'uranium ne conduit pas à une modification du poids des animaux après 3 et 9 mois *(Figure 27A)*. La prise de poids est similaire quelle que soit la concentration en uranium dans l'eau de boisson, même si une diminution non significative est observée pour les animaux contaminés avec une solution contenant 600 mg/L d'uranium.

b. Consommation hydrique

La consommation hydrique est exprimée par jour par gramme de poids corporel. Les différents groupes d'animaux ont une consommation hydrique similaire. Ils sont donc exposés, selon le groupe, à la même quantité journalière d'uranium pendant 9 mois, concentration calculée par rapport au poids moyen d'un rat après 9 mois de contamination (450 grammes), à savoir :

- Groupe 1 mg/L : 0,07 mg/kg/jour
- Groupe 40 mg/L : 2,67 mg/kg/jour
- Groupe 120 mg/L : 8 mg/kg/jour
- Groupe 600 mg/L : 40 mg/kg/jour.

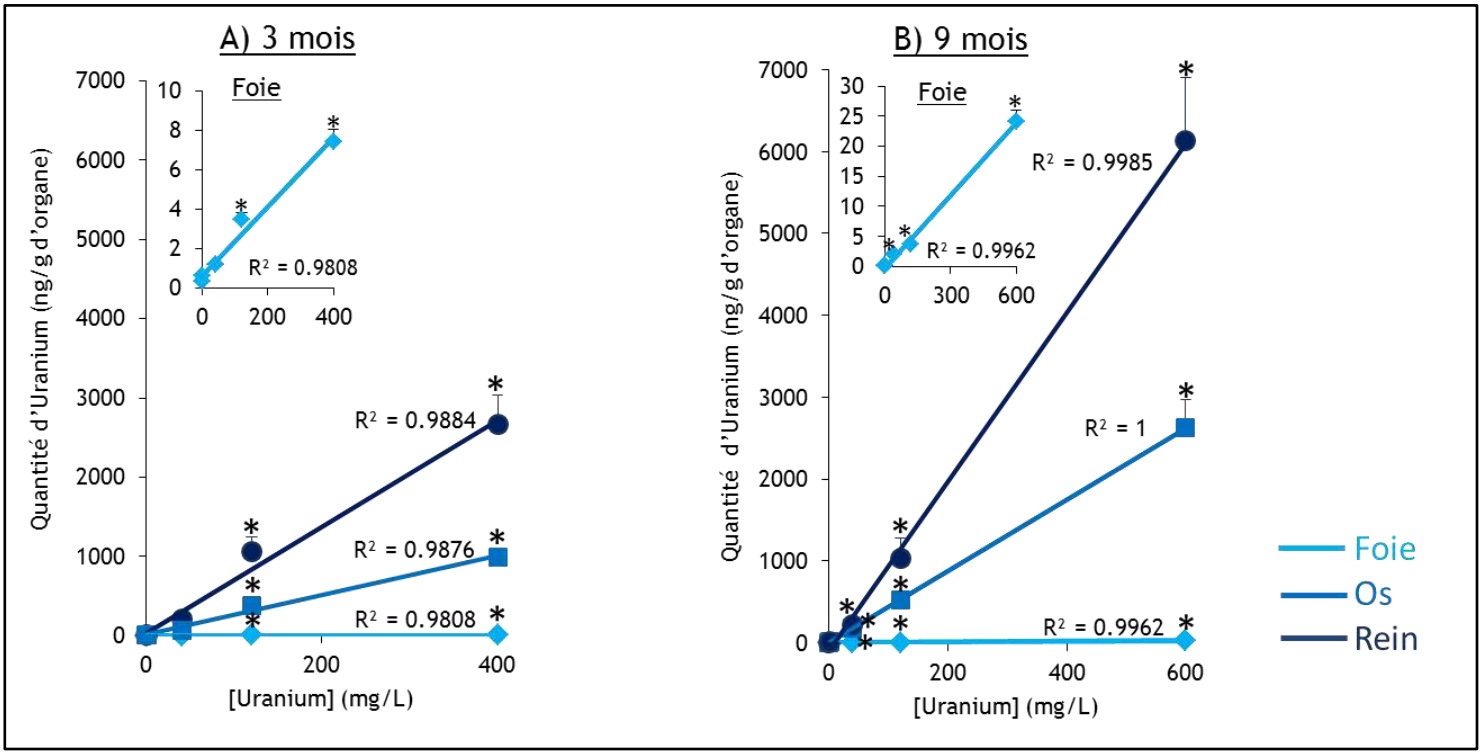

Figure 29 : Accumulation d'uranium dans les organes (foie, os et rein) pendant 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium via l'eau de boisson (1,40, 120,400 ou 600 mg/L)

Les résultats sont exprimés en nanogrammes d'uranium par gramme d'organe. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =6 (A) ou 12 (B)). La quantité d'uranium a été déterminée par ICP-MS après minéralisation des échantillons. La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120,400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative quand *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

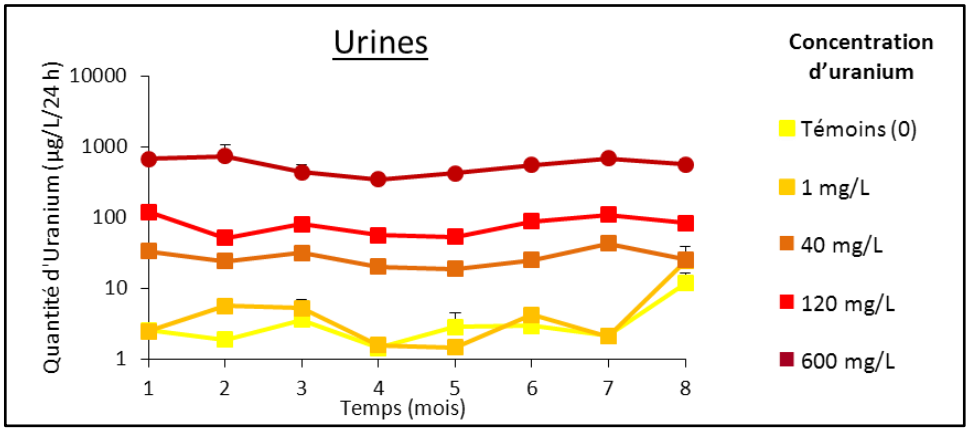

Figure 28 : Suivi longitudinal de la quantité d'uranium dans les urines de rat pendant 9 mois de contamination

Les résultats sont exprimés en µg/L d'urine par 24 heures. Les prélèvements urinaires ont été réalisés tous les mois. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12).

Sur la *Figure 27*, les décrochements observés correspondent à la mise en cage à métabolisme des rats tous les mois et donc à une diminution de la consommation alimentaire et hydrique pendant 48 heures. La contamination par l'uranium n'induit pas de modification de la consommation hydrique des animaux.
La consommation alimentaire n'est pas indiquée, mais elle suit les mêmes variations que la concentration hydrique.

2. Distribution de l'uranium

a. Quantification de l'uranium

L'accumulation de l'uranium a été mesurée dans trois organes d'intérêt : le foie, organe de détoxification ainsi que le rein et l'os, organes d'accumulation de l'uranium. Les mesures ont été effectuées par ICP-MS après 3 et 9 mois de contamination. Les valeurs sont exprimées en nanogramme d'uranium par gramme d'organe.
Dans le *Tableau 23A*, une augmentation significative de la quantité d'uranium est observée pour les groupes ayant ingéré une concentration de 120 mg/L et 400 mg/L pendant 3 mois pour les trois organes étudiés. Ainsi, la quantité d'uranium mesuré au niveau du rein est multipliée par 376 entre le groupe témoin et le groupe ayant reçu 400 mg d'uranium par litre.
Après 9 mois de contamination, l'accumulation d'uranium est significativement augmentée dans les trois organes d'intérêt à partir de la concentration de 40 mg/L (*Tableau 23B*). Dans le rein, la quantité d'uranium est supérieure à 6 µg/g de rein pour les animaux contaminés à la plus forte concentration d'uranium.
La régression linéaire pour chaque organe (foie, rein et fémur) est comprise entre 0,98 et 1 : l'accumulation d'uranium dans les trois organes est proportionnelle à la quantité de radioélément ingérée ($p < 0,05$) comme le montre la *Figure* .
De plus, l'excrétion urinaire d'uranium mesurée pendant 24 heures *(Figure 29)* confirme que plus les animaux ingèrent une eau avec une forte concentration en uranium, plus la quantité d'uranium excrétée est importante et ce tout au long de la contamination.

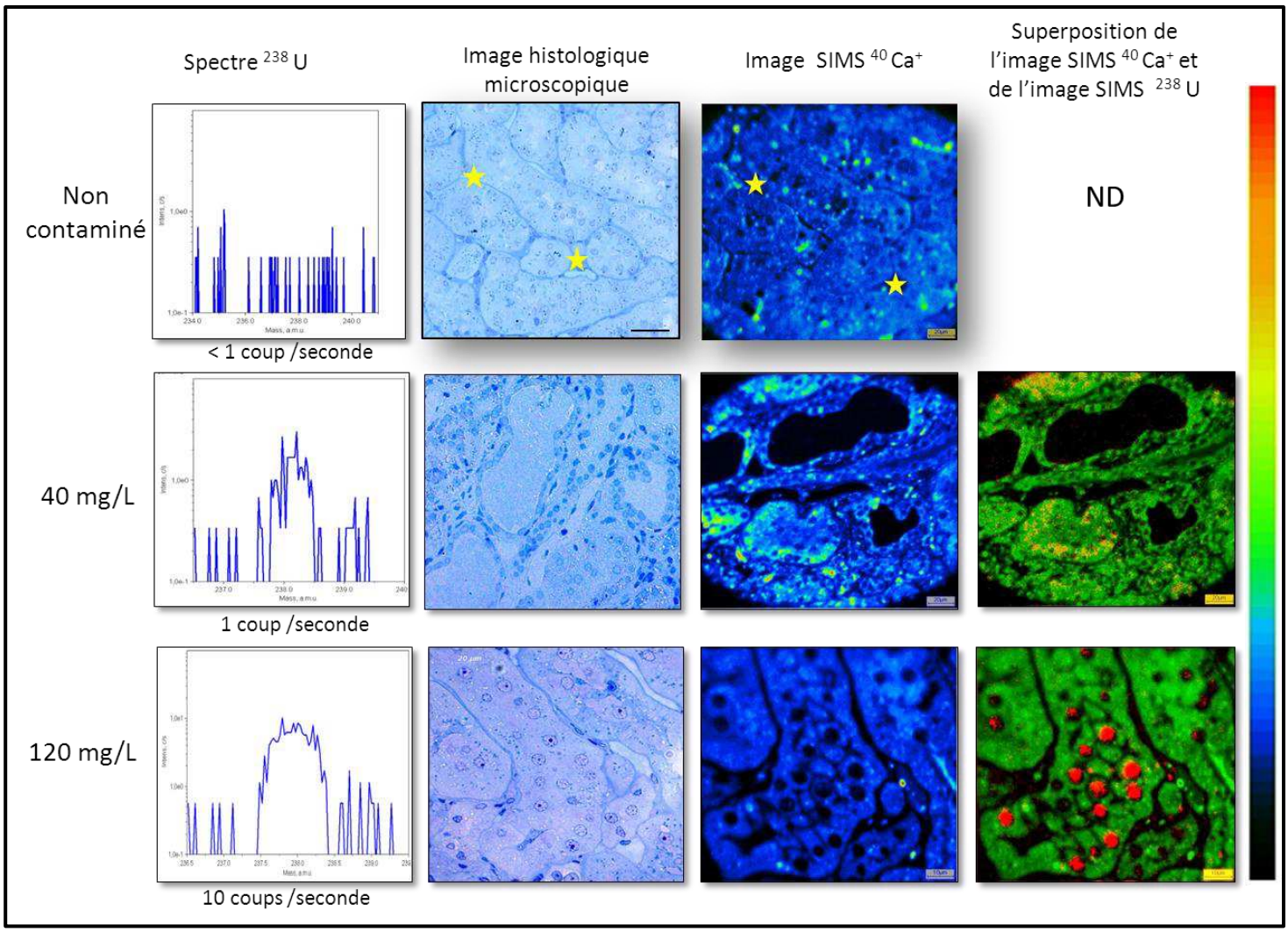

Figure 30 : Observations microscopiques et SIMS de cortex rénal provenant de rats témoins ou de rats contaminés pendant 9 mois à 40 et 120 mg/L d'uranium

Le spectre de masse est présenté pour toutes les conditions. Les images optiques microscopiques ont été obtenues après coloration des cellules au bleu de toluidine. L'image calcium a été obtenue après analyses SIMS. La dernière image représente la superposition des images calcium et uranium issues des analyses SIMS. Les zones rouges correspondent à la présence d'uranium. Pour les images concernant les animaux non contaminés, les étoiles jaunes servent de repères et la superposition des images SIMS calcium et uranium n'est pas disponible (ND).

b. Distribution de l'uranium

La technique d'imagerie SIMS nous a permis de visualiser la distribution de l'uranium dans les TCP. La *Figure 30* représente les images obtenues suite aux analyses de microscopie optique et ionique (SIMS) sur des coupes de cortex rénal de rats témoins et de rats contaminés pendant 9 mois à 40 et 120 mg/L à l'uranium.

Les analyses réalisées chez les animaux contaminés à une solution d'uranium à 600 mg/L sont similaires à celles obtenues pour les animaux du groupe 120 mg/L et ne sont donc pas présentés dans cette figue. Ces images ont été effectuées par le laboratoire de radiochimie de l'IRSN.

Les trois spectres de masse présentés confirment que plus la concentration en uranium ingérée par le rat est importante, plus le nombre de coups correspondants à l'^{238}U augmente. Ceci est cohérent avec les mesures d'uranium dans le rein obtenues par ICP-MS.

Les images obtenues par microscopie optique montrent les zones de la structure rénale étudiées en parallèle de celles observées en SIMS. La superposition des images SIMS calcium et uranium permet de localiser l'uranium (en rouge) au sein de cette structure. **Ainsi, dans le cas des animaux du groupe 40 mg/L, l'uranium est localisé dans les cellules du TCP. Aux concentrations les plus fortes (120 et 600 mg/L), l'uranium est observé dans le TCP mais avec une localisation préférentielle dans les noyaux des cellules tubulaires.**

3. Analyse biochimique

a. Plasmatique et urinaire

L'uranium s'accumulant préférentiellement dans les reins, les électrolytes, la créatinine et l'urée ont été mesurés dans le plasma et les urines afin d'évaluer l'atteinte rénale suite à la contamination. Des paramètres plus spécifiques du foie (ASAT, ALAT) ont également été mesurés pour vérifier que la faible accumulation d'uranium dans cet organe n'induit de modifications des paramètres hépatiques. Enfin, d'autres paramètres dont le cholestérol ont aussi été évalués en vue d'avoir un bilan sanguin et urinaire de l'état général des animaux. Les *Tableau 24 & Tableau* 25 rassemblent l'ensemble de ces différents paramètres évalués au niveau plasmatique et urinaire après 3 et 9 mois de contamination.

A) 3 mois de contamination					
Concentration en uranium (mg/L)	*0*	*1*	*40*	*120*	*400*
ALAT (U/L)	50 ± 4	65,5 ± 9,7	57,8 ± 9,8	61,4 ± 9,6	61,8 ± 10,9
ASAT (U/L)	136 ± 13	168 ± 31,6	128 ± 15,5	136 ± 17,5	180 ± 24,5
Albumine (g/L)	29,4 ± 0,5	29,7 ± 0,4	30 ± 0,3	30,6 ± 0,3	30 ± 0,2
Cholestérol (mM)	1 ± 0,2	2,3 ± 0,13	1 ± 0,12	2,15 ± 0,0	2,12 ± 0,06
HDL (mM)	1,2 ± 0,11	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,07	1,2 ± 0,1
LDL (mM)	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,06	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,03
Triglycérides (mM)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,21	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Créatinine (µM)	45,6 ± 1	46 ± 2,45	45 ± 1,3	48 ± 1,2	44,6 ± 0,86
Urée (mM)	6 ± 0,2	6 ± 0,2	5,7 ± 0,13	6 ± 0,2	5,8 ± 0,14
Ca (mM)	2,3 ± 0,08	2,4 ± 0,05	2,37 ± 0,06	2,45 ± 0,05	2,54 ± 0,05
Cl (mM)	93,7 ± 1,3	94,6 ± 0,7	97,6 ± 0,6	96,6 ± 0,6	97 ± 0,6
K (mM)	5,3 ± 0,5	5 ± 0,3	5 ± 0,4	5 ± 0,3	5,1 ± 0,3
Na (mM)	135 ± 1,2	136,5 ± 0,8	138,7 ± 0,7***	138,6 ± 0,6**	138,7 ± 0,24***

B) 9 mois de contamination					
Concentration en uranium (mg/L)	*0*	*1*	*40*	*120*	*600*
ALAT (U/L)	40 ± 3	54 ± 7,7	49 ± 6,3	59 ± 8,6	48,6 ± 8
ASAT (U/L)	184 ± 16,7¤¤¤	211 ± 44¤¤¤	192 ± 37¤¤¤	202 ± 31¤¤¤	176 ± 22,5¤¤¤
Albumine (g/L)	29 ± 0,3	30 ± 1,1	30,2 ± 1,1	30 ± 0,9	29,8 ± 0,33
Cholestérol (mM)	3,17 ± 0,2 ¤¤¤	3,8 ± 0,3* ¤¤¤	3,3 ± 0,22¤¤¤	3,3 ± 0,3 ¤¤¤	2,5 ± 0,14*
HDL (mM)	1,8 ± 0,15¤¤	2,24 ± 0,33¤¤¤	2 ± 0,22¤¤	1,85 ± 0,2 ¤	1,5 ± 0,1
LDL (mM)	0,75 ± 0,13¤¤	1 ± 0,2¤¤¤	0,8 ± 0,11¤	0,85 ± 0,18¤¤¤	0,53 ± 0,05
Triglycérides (mM)	2,35 ± 0,4¤¤	2,3 ± 0,3¤	2,3 ± 0,3¤¤	2,1 ± 0,4¤	1,8 ± 0,23
Créatinine (µM)	48,3 ± 0,10	48 ± 1,9	48 ± 1,8	50 ± 1,5	50 ± 1,7¤
Urée (mM)	6,15 ± 0,2	6 ± 0,2	6,5 ± 0,3¤	6,15 ± 0,2	6,1 ± 0,22
Ca (mM)	1,65 ± 0,3¤	1,3 ± 0,3¤¤¤	1,4 ± 0,35¤¤	2 ± 0,4	1,6 ± 0,4¤¤
Cl (mM)	98 ± 08	95,6 ± 3,3	94,4 ± 3,8	95 ± 3,55	98,25 ± 0,74
K (mM)	4,6 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,07	4,7 ± 0,06	4,6 ± 0,1
Na (mM)	138,2 ± 0,7¤¤	137 ± 0,7	137 ± 0,5	135,8± 1,2* ¤¤	136,7 ± 0,6

Tableau 24 : Analyses des paramètres plasmatiques après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par uranium

Le plasma a été prélevé au moment du sacrifice de l'animal. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n=12 ou 10). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre 3 et 9 mois de contamination est significative si ¤= $p < 0,05$; ¤¤= $p < 0,01$; ¤¤¤= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration et le temps de contamination).

a.1 Paramètres plasmatiques

Les analyses de biochimie clinique plasmatiques montrent quelques modifications ponctuelles *(Tableau 24)*. Les taux plasmatiques des paramètres d'intégrité hépatique (ASAT et ALAT) ne sont pas modifiés après 3 ou 9 mois de contamination par rapport aux rats témoins, comme cela est attendu étant donné la faible quantité d'uranium accumulé dans cet organe.

En revanche, les taux des ASAT sont significativement augmentés entre les deux temps de contamination qu'elle que soit la concentration en uranium considéré ($p < 0,001$). Cette différence serait liée à une légère inflammation chronique hépatique due au vieillissement de l'animal.

Le bilan lipidique a également été évalué. Seul le taux de cholestérol total est augmenté après 9 mois de contamination chez les animaux des groupes 1 et 600 mg/L ($p < 0,01$). Le vieillissement des animaux serait également à l'origine de l'augmentation des différents paramètres du bilan lipidique (Cholestérol total LDL, HDL et triglycérides) entre 3 et 9 mois de contamination. En effet, au terme des 9 mois de contamination, les rats sont âgés d'un an et des dysfonctionnements tels que des modifications des paramètres biochimiques liés à l'âge peuvent apparaître.

Au niveau rénal, les taux plasmatiques de créatinine et d'urée ne sont pas modifiées suite à la contamination par l'uranium et ce indépendamment de la durée de contamination et de la concentration en uranium ingérée. En revanche, le taux de ces deux paramètres est légèrement augmenté entre 3 et 9 mois : la créatinine augmente de 12 % chez les animaux ayant reçu la plus forte concentration d'uranium ($p < 0,05$), et l'urée de 14 % pour les animaux du groupe 40 mg/L ($p < 0,01$).

Parmi les différents ions étudiés (chlore, potassium, sodium et calcium), aucune concentration plasmatique n'est modifiée après contamination à l'uranium et ce après 3 et 9 mois de contamination.

A) 3 mois de contamination					
Concentration en Uranium (mg/L)	*0*	*1*	*40*	*120*	*400*
Clairance à la créatinine (mL/min/kg)	4 ±0,2	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,1	3,4 ± 0,4	4 ± 0,12
Amylase (U /mM Ucreat)	600,7 ± 58,3	616,9 ± 29	664 ± 40,2	605,9 ± 33,4	582,3 ± 46
Calcium (µmol /mM Ucreat)	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Acide urique (mmol /mM Ucreat)	153,7 ± 6,24	155 ± 10,5	153,6 ± 5,4	147,1 ± 7,7	151 ± 5,2
Glucose (mmol /mM Ucreat)	0,27 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,23 ± 0,05
Potassium (mmol /mM Ucreat)	9,26 ± 1,3	2,7 ± 0,34***	2,74 ± 0,34***	2,87 ± 0,4***	2,8 ± 0,34***
Sodium (mmol /mM Ucreat)	8,75 ± 0,99	6,4 ± 0,4	6,6 ± 0,3	5,7 ± 0,7**	5,63 ± 0,5**
Phosphore (mmol /mM Ucreat)	3,8 ± 0,23	3,7 ± 0,2	3,63 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Protéines (g /mM Ucreat)	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,1 ± 0,02
Urée (mmol /mM creat U)	83,8 ± 3,8	75 ± 2,7	76,4 ± 3	68,35 ± 2,4**	72,3 ± 3**
B) 9 mois de contamination					
Concentration en Uranium (mg/L)	*0*	*1*	*40*	*120*	*600*
Clairance à la créatinine (mL/min/kg)	3,4 ± 0,24	3,5 ± 0,3	2,9 ± 0,14	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,16
Amylase (U /mM Ucreat)	909,9 ± 53¤¤¤	945 ± 70¤¤¤	974,7 ± 63¤¤¤	949,14 ± 70¤¤¤	925 ± 74¤¤¤
Calcium (µmol /mM Ucreat)	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,01
Acide urique (mmol /mM Ucreat)	146,3 ± 9,34	147,5 ± 6,3	145,5 ± 4,5	141,8 ± 3,4	135,7 ± 8,4
Glucose (mmol /mM Ucreat)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,14 ± 0,01
Potassium (mmol /mM Ucreat)	8,4 ± 0,9¤¤	6,65 ± 0,5 ¤¤	6,6 ± 0,8¤	6,2 ± 0,5	6,9 ± 1¤
Sodium (mmol /mM Ucreat)	7,5 ± 0,8	5,11 ± 0,45	5,86 ± 0,7	6 ± 0,44	6,2 ± 1
Phosphore (mmol /mM Ucreat)	3,26 ± 0,35	3,12 ± 0,2	3,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,4 ± 0,2**¤
Protéines (g /mM Ucreat)	0,44 ± 0,13 ¤	0,31 ± 0,05	0,5 ± 0,2 ¤¤¤	0,4 ± 0,15¤¤¤	0,3 ± 0,03
Urée (mmol /mM creat U)	73,5 ± 3,7	68 ± 2,4	71,5 ± 3,4	68,15 ± 2	71,7 ± 4,7

Tableau 25 : Analyses des paramètres urinaires après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium

Les résultats sont exprimés en pmol/nmol de créatinine urinaire. Les prélèvements urinaires ont été réalisés soit toutes les deux semaines (A), soit mensuellement (B). Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =6 ou 12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative si *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre 3 et 9 mois de contamination est significative si ¤= $p < 0,05$; ¤¤= $p < 0,01$; ¤¤¤= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration et le temps de contamination).

a.2 Paramètres urinaires

En parallèle des paramètres plasmatiques, des mesures ont également été réalisées dans les urines et ce tous les 15 jours chez les animaux contaminés pendant 3 mois et mensuellement chez ceux contaminés pendant 9 mois. Afin de pouvoir comparer avec les analyses plasmatiques, seules les mesures effectuées après 3 et 9 mois sont présentées dans le *Tableau 25.*

L'étude des paramètres urinaires montre qu'une contamination chronique après 3 et 9 mois par l'uranium entraîne des variations ponctuelles de certains paramètres de biochimie clinique.

Après 3 mois de contamination, une diminution de la concentration urinaire en potassium est observée chez tous les animaux contaminés : le taux de potassium urinaire est divisé par 3,4 par rapport aux animaux non contaminés ($p < 0,001$).

Cette diminution est surprenante car des études réalisées au laboratoire (Rouas *et al.* 2011) montrent que le taux de potassium urinaire reste constant entre les animaux contaminés et les témoins. Un paramètre technique pourrait être à l'origine de cet effet.

La contamination par l'uranium induit une diminution de 35 % du taux de sodium urinaire chez les animaux contaminés aux plus fortes concentrations (120 et 400 mg/L) pendant 3 mois ($p < 0,01$). L'uricémie est aussi diminuée après 3 mois de contamination de respectivement 10,5 ; 18 ; 13,7 % chez les animaux contaminés par ingestion d'une solution de 1, 120 et 400 mg/L d'uranium. ($p < 0,05$; 0,01 ou 0,001).

Après 9 mois de contamination, seule la concentration de phosphore urinaire est diminuée de 20 % chez les animaux ayant ingéré une solution à 600 mg/L d'uranium ($p < 0,01$).

Une différence entre les deux temps de contamination est observée pour certains marqueurs. Les taux urinaires d'amylase, de potassium et de protéines sont significativement diminués entre 3 et 9 mois de contamination.

Cette différence étant présente également chez les groupes témoins, elle serait due au vieillissement de l'animal et non à la contamination par l'uranium.

Pour d'autres paramètres –le sodium et le phosphore-, cette différence n'est observée que pour un groupe (groupe témoin ou groupe ayant reçu la plus forte concentration d'uranium). Cela peut s'expliquer par le fait qu'après 9 mois de contamination, les rats sont âgés d'un an et des dysfonctionnements physiologiques liés au vieillissement peuvent apparaître.

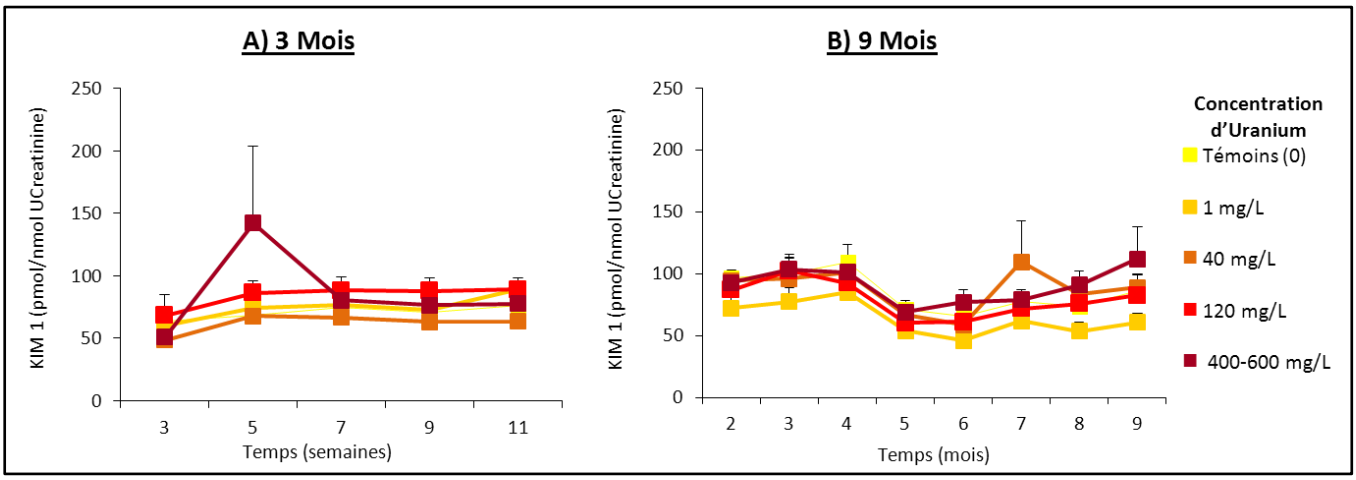

Figure 32 : Suivi longitudinal urinaire de KIM-1 pendant 3 (A) et 9 (B) mois de contamination

Les résultats sont exprimés en pmol/nmol de créatinine urinaire. Les prélèvements urinaires ont été réalisés soit toutes les deux semaines (A), soit mensuellement (B). Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =6 (A) ou 12 (B)). L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

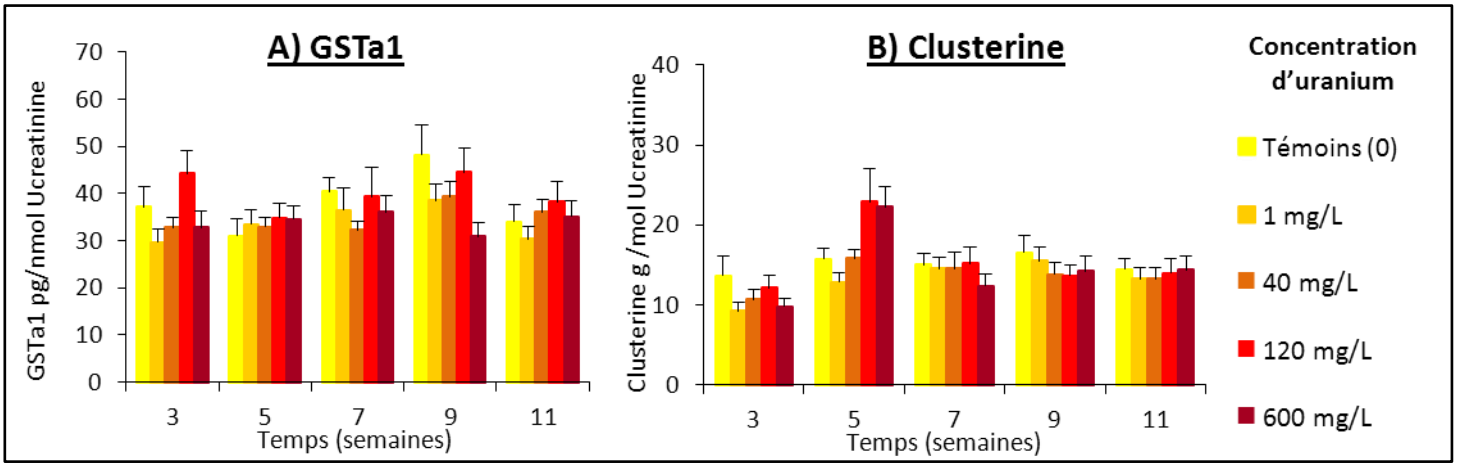

Figure 31 : Suivi longitudinal urinaire pendant 3 mois de contamination par la mesure de GSTa1 (A) et de la clusterine (B)

Les résultats sont exprimés en pmol/nmol de créatinine urinaire. Les prélèvements urinaires ont été réalisés toutes les deux semaines. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =6 (A) ou 12 (B)). L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

b. Biomarqueurs de néphrotoxicité

Les reins étant l'organe d'accumulation préférentielle de l'uranium et donc de sa toxicité, un suivi régulier de la fonction rénale a été réalisé tout au long de la contamination en mesurant de nouveaux marqueurs d'atteinte rénale qui sont plus spécifiques et plus sensibles que la clairance à la créatinine notamment (Gueguen *et al.* 2012). En effet, la clairance à la créatinine a été calculée (*Tableau 25)* suite aux deux protocoles de contamination et aucune modification n'a été observée d'où le choix d'étudier ces nouveaux paramètres d'intégrité rénale.

b.1 KIM-1

KIM-1 est une protéine de bas poids moléculaire qui est augmentée précocement en cas de dysfonctionnement tubulaire (Bonventre *et al.* 2010). La mesure urinaire de KIM-1 a été effectuée tout au long des 3 et 9 mois de contamination. Comme l'indique la *Figure 31* aucune différence du taux urinaire de cette protéine n'a été observée entre le groupe témoin et les groupes contaminés pendant 3 ou 9 mois de contamination.

b.2 GSTa1 et Clusterine

Ces deux biomarqueurs ont été mesurés au niveau urinaire chez les animaux ayant été contaminés pendant 3 mois à l'uranium.

La GSTa1 est une enzyme dont l'augmentation urinaire est le reflet d'une atteinte aiguë des tubules proximaux (Gueguen *et al.* 2012). Dans notre étude, la contamination par l'uranium n'induit pas de modification du taux urinaire de la GST entre les différents groupes *(Figure 32A)*.

La clusterine est une glycoprotéine qui est sécrétée par le TCP. Son augmentation urinaire permet de détecter une atteinte rénale tubulaire précoce (Gueguen *et al.* 2012).

Le dosage de la clusterine dans les urines durant les 3 mois de contamination n'a pas montré de variations entre les différents groupes *(Figure 32B)*.

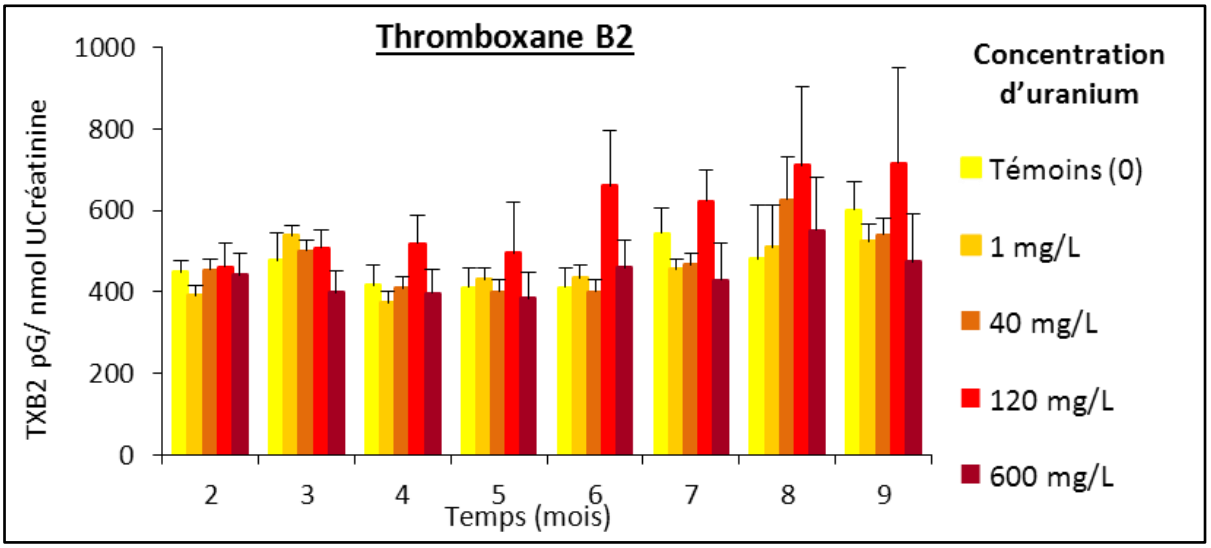

Figure 33 : Suivi longitudinal urinaire pendant 9 mois de contamination par la mesure du Thromboxane B2

Les résultats sont exprimés en picogrammes/nmol de créatinine urinaire. Les prélèvements urinaires ont été réalisés tous les mois. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

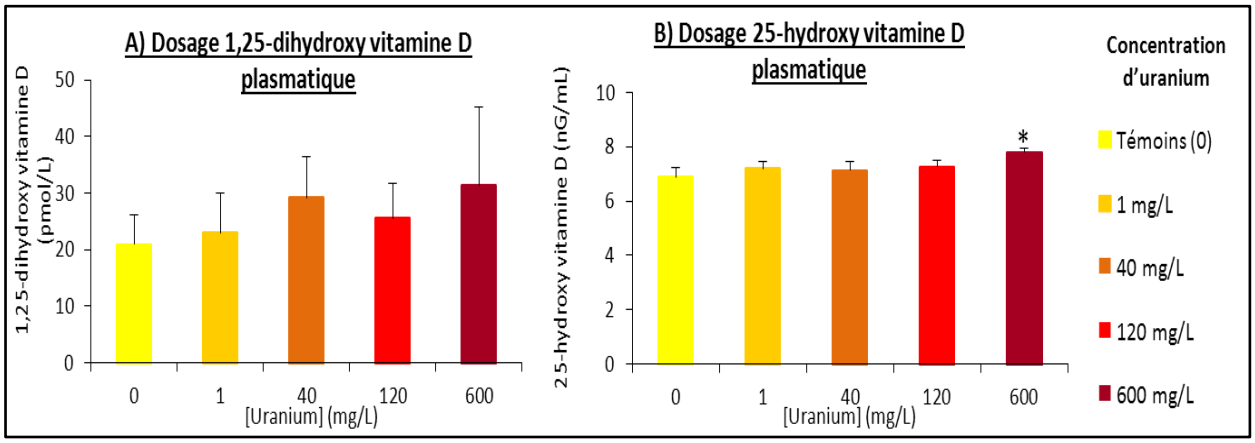

Figure 34 : Mesure plasmatique de la Vitamine D sous ses deux formes inactive 1,25-dihdyroxy (A) - et active -25-hydroxy (B)- après 9 mois de contamination par l'uranium

Les résultats sont exprimés soit en picomoles/ litre (A), soit en nanogrammes / mililitre (B). Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (■) est significative si *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

b.3 Thromboxane B2

Le Thromboxane B2 (Tbx B2) provient du catabolisme du Thromboxane A2 vasoconstricteur, un des produits issus de la cascade de l'acide arichidonique. Différentes études ont montré qu'une augmentation urinaire de Tbx B2 était corrélée à une atteinte rénale précoce (Benabe *et al.* 1980 ; Papanikolaou *et al.* 1992 ; Tsipas *et al.* 2003).

Le Tbx B2 a été mesuré au niveau urinaire chez les animaux ayant été contaminés pendant 9 mois à l'uranium.

Dans notre étude, le taux urinaire de TBx B2 n'est pas modifié suite à cette contamination à l'uranium *(Figure 33)*.

b.4 Vitamine D

La vitamine D (Vit D) a été dosée sous deux formes : la 25-hydroxy Vit D et la 1,25 di-hydroxy Vit D ; issue du métabolisme hépatique de la Vit D et qui une fois dans le rein est métabolisée en 1,25 di-hydroxy Vit D, forme active de la Vit D. La mesure de la Vit D est utilisée comme marqueur d'atteinte rénale et notamment des insuffisances rénales chroniques (Benabe *et al.* 1980 ; Querfeld *et al.* 2010).

La Vit D a été mesurée dans le plasma chez les animaux ayant été contaminés pendant 9 mois à l'uranium *(Figure 34)*. Seule la 25-hydroxy Vit D est augmentée pour le groupe ayant ingéré la plus forte concentration d'uranium (600 mg/L) (+ 15 %, $p < 0,05$) *(Figure 34B)*.

4. Analyses histologiques

Des analyses histologiques ont été effectuées après 3 ou 9 mois de contamination par l'uranium sur les deux organes d'intérêt de notre étude : le rein et le foie.

Des microphotographies représentatives des lésions hépatiques et rénales observées après 9 mois de contamination par l'uranium sont présentées dans la *Figure 35,* les résultats obtenus après 3 mois de contamination étant similaires, ne sont pas présentés.

Au niveau hépatique, de faibles lésions inflammatoires sont retrouvées chez tous les animaux. La présence de fibrose est également observée chez tous les animaux et ne permet pas de discriminer les différents groupes entre eux.

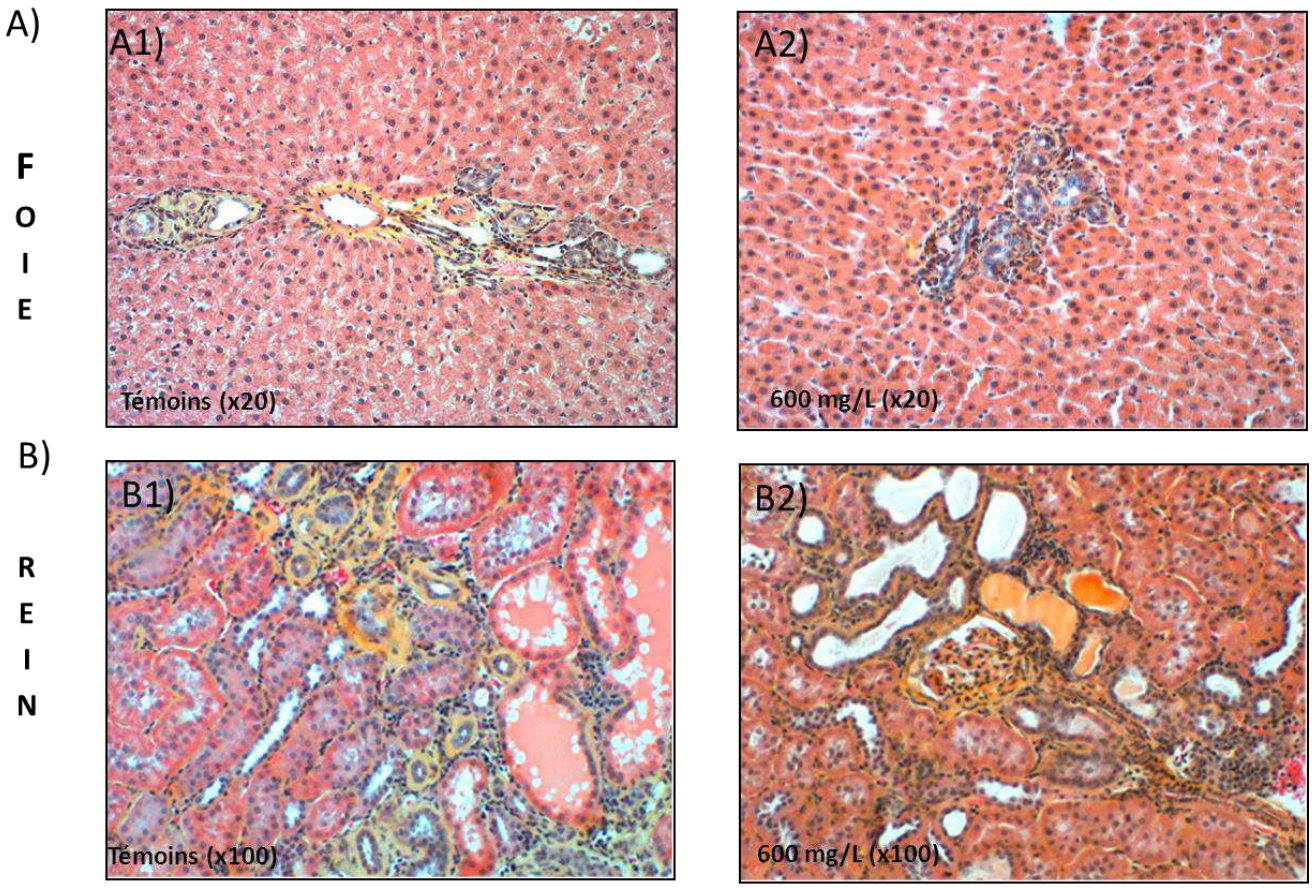

Figure 35 : Microphotographies représentatives du foie (A) et du rein (B) après 9 mois de contamination par l'uranium chez des animaux témoins et contaminés à 600 mg/L.

Sur la microphotographie A1), une légère hyperplasie biliaire, périportale et intralobulaire, une fibrose peribiliaire et une inflammation sont observées.

Sur la microphotographie A2), les altérations suivantes sont observées : une hyperplasie minimale des conduits biliaires, une fibrose et une inflammation.

Sur la microphotographie B1), une régénération tubulaire, une dilatation tubulaire, de la fibrose et de l'inflammation sont visibles.

Sur la microphotographie B2), une régénération tubulaire, une glomérulosclérose, une fibrose et une inflammation sont observées.

Dans les reins, une inflammation et une fibrose interstitielle sont observées dans tous les groupes. Chez les animaux ayant reçu la plus forte concentration en uranium (600 mg/L), la régénération tubulaire semblerait plus importante mais non significativement augmentée par rapport aux animaux non contaminés.
La contamination par l'uranium n'entraîne donc pas d'aggravation des lésions histologiques mineures qui semblent majoritairement liées au vieillissement de l'animal. Ces résultats sont en accord avec l'absence de modification observée lors des mesures des paramètres biochimiques urinaires et des biomarqueurs d'atteinte rénale

D'après les résultats obtenus, aucune atteinte délétère n'est décrite suite à la contamination chronique par l'uranium. Ces résultats sont surprenants par rapport aux connaissances sur la toxicité de l'uranium et notamment en cas d'exposition aiguë pour laquelle des effets néphrotoxiques ont été décrits (Domingo *et al.* 1987 ; Ortega *et al.* 1989). Il est donc nécessaire d'approfondir notre travail en étudiant un des mécanismes de défense souvent impliqué après exposition à l'uranium : le système pro/anti-oxydant.

5. Système pro/anti-oxydant

L'étude des effets d'une contamination par l'uranium sur l'aspect « pro-oxydant » a été évaluée par le dosage de la peroxydation lipidique. Les mesures de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes ainsi que celles des activités des différents acteurs du métabolisme du glutathion ont permis d'évaluer les effets d'une contamination chronique à l'uranium sur le système anti-oxydant.

a. Dosage de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique évaluée par le dosage des TBARS est exprimée en MDA (µM).

a.1 Mesure dans le plasma après 3 et 9 mois de contamination par l'uranium

Après 3 mois de contamination par l'uranium, le taux de MDA ne varie pas entre les différents groupes d'animaux contaminés comme le montre la *Figure 36*.

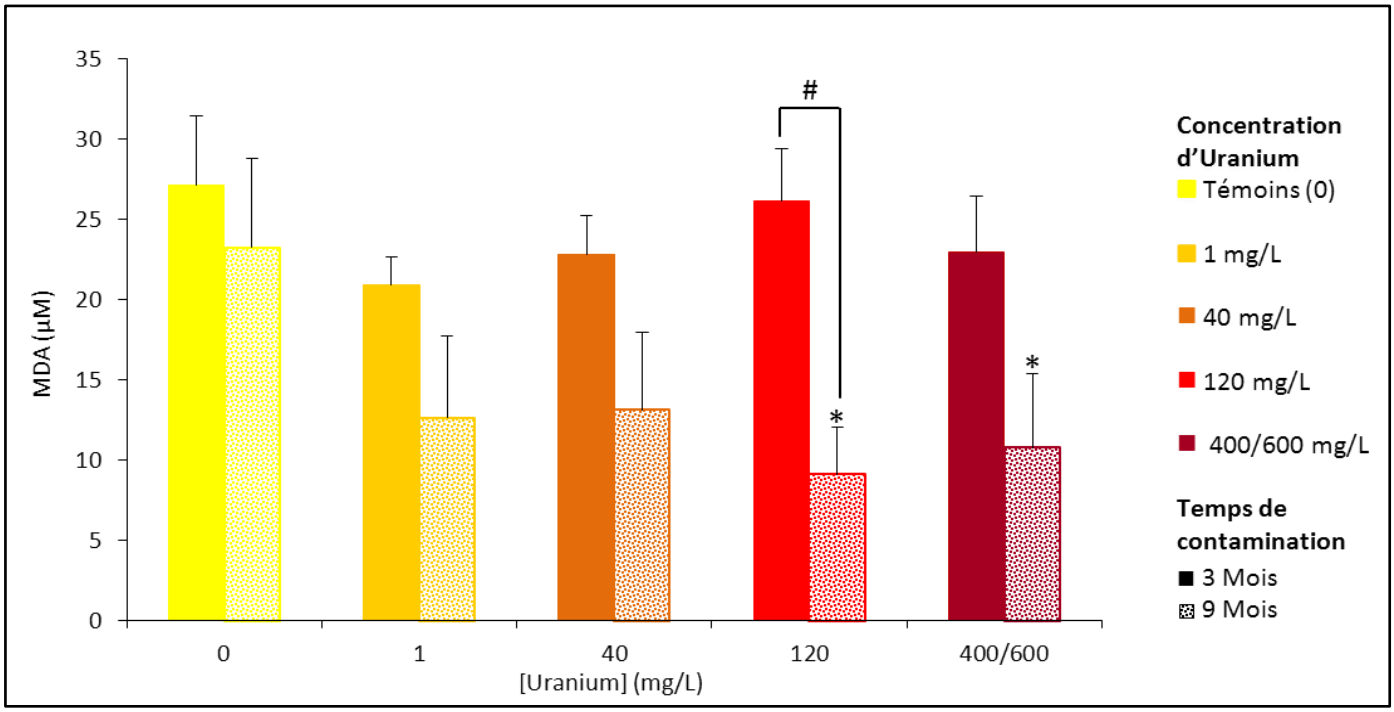

Figure 36 : Mesure des TBARS dans le plasma après 3 et 9 mois de contamination par l'uranium

Les TBARS sont un marqueur de peroxydation lipidique, reflet d'une atteinte pro-oxydante. Les résultats sont exprimés en microcomoles de MDA/ litre. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (■) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La différence entre 3 et 9 mois de contamination est significative pour #= $p < 0,05$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA (les deux paramètres sont le temps de contamination et la concentration en uranium).

En revanche, après 9 mois de contamination, une diminution significative du taux de MDA est observée chez les animaux ayant reçu de l'eau à 120 et 600 mg/L d'uranium ($p < 0,05$).

Une diminution du taux de TBARS est observée à 9 mois de contamination par rapport à une contamination de 3 mois mais elle est significative uniquement pour les animaux ayant ingéré une eau à 120 mg/L d'uranium.

a.2 Mesure dans le foie et les reins après 9 mois de contamination par l'uranium

La *Figure 37* représente le dosage des TBARS après 9 mois de contamination au niveau du foie (*A*) et du rein (*B*). La peroxydation lipidique hépatique diminue non significativement à partir de 40 mg/L d'uranium ; une diminution de près de 50 % est observée après une contamination à 600 mg/L d'uranium.

Au niveau du cortex rénal, le taux de MDA diminue significativement chez les animaux ayant reçu les plus fortes concentrations d'uranium (120 et 600 mg/L) (respectivement $p < 0,05$ et $p < 0,01$).

Après contamination chronique *via* l'eau de boisson, l'uranium induit donc une diminution de la peroxydation lipidique au niveau tissulaire qui est plus importante après 9 mois de contamination. Les taux tissulaires des marqueurs pro-oxydants semblent être diminués à la fois dans le foie et le rein dans les conditions expérimentales de notre étude.

Afin de comprendre cette diminution de la peroxydation lipidique, le système « anti-oxydant » a également été étudié suite à une contamination chronique par l'uranium. Il a été caractérisé par l'étude d'une part de l'expression génique de nombreuses enzymes anti-oxydantes et d'autre part du métabolisme du glutathion (taux de GSH et GSSG) et de l'activité des enzymes associées (GR, GPx et GST).

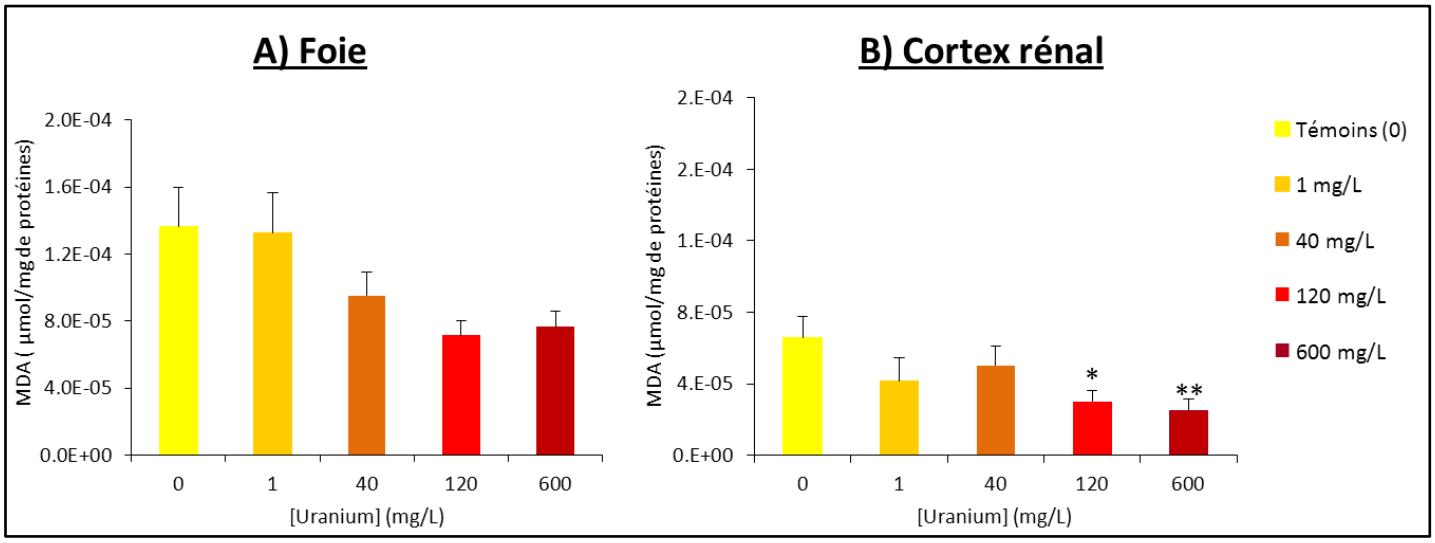

Figure 37 : Mesure des TBARS dans le foie (A) et le cortex rénal (B) après 9 mois de contamination par l'uranium

Les TBARS sont un marqueur de peroxydation lipidique, reflet d'une atteinte pro-oxydante. Les résultats sont exprimés soit en microcomoles de MDA/ miligramme de protéines. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 40, 120 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (■) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

b. Expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2

L'expression des enzymes anti-oxydantes suivantes : CAT, Cu, Zn SOD, GCS, GGT, GPx, GR GS, GSTA2, HO-1, Mn SOD et NQO1 ainsi que celle de Nrf2 a donc été évaluée après 3 et 9 mois de contamination par l'uranium au niveau hépatique *(Figure 38)* et rénal *(Figure 39)*. Les résultats sont exprimés par rapport au gène de référence (GAPDH et HPRT) en unités arbitraires (UA).

b.1 Le foie

Après 3 mois de contamination *(Figure 38A)*, l'expression génique des enzymes anti-oxydantes est diminuée uniquement pour la GSTA2 et la GPx pour le groupe 1 mg/L (respectivement -27 % et -39 %; $p < 0,05$), un retour à la normale du taux d'expression étant observée pour les concentrations supérieures. L'expression génique des autres enzymes ni celle de Nrf2 n'est pas modifiée après 3 mois de contamination.

Sur la *Figure 38B*, après 9 mois de contamination, seule l'expression génique de la Cu, Zn SOD, de la GR et de la GS est modifiée. En effet, l'expression génique de la Cu, Zn SOD est significativement diminuée de 25 % chez les animaux contaminés par ingestion d'eau à 40 mg/L d'uranium ($p < 0,05$).
Une diminution de 30 % ($p < 0,05$) de l'expression génique de la GS et de la GR est observée pour les groupes ayant ingéré de l'uranium à 40, 120 et 600 mg/L dans l'eau de boisson. Cette diminution semble atteindre un plateau à partir de 40 mg/L.

Ces résultats nous permettent de conclure qu'au niveau hépatique, l'expression génique des enzymes anti-oxydantes étudiées est modifiée de façon plus importante après 9 mois de contamination qu'après 3 mois.

b.2 Le rein

L'étude de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes après 3 mois de contamination *(Figure 39A)* au niveau rénal montre des modifications de trois enzymes : CAT, GS et HO-1.
Une diminution de l'expression génique de la GS est ainsi observée chez les animaux ayant reçu la plus forte concentration d'uranium (-44 %, $p < 0,05$).

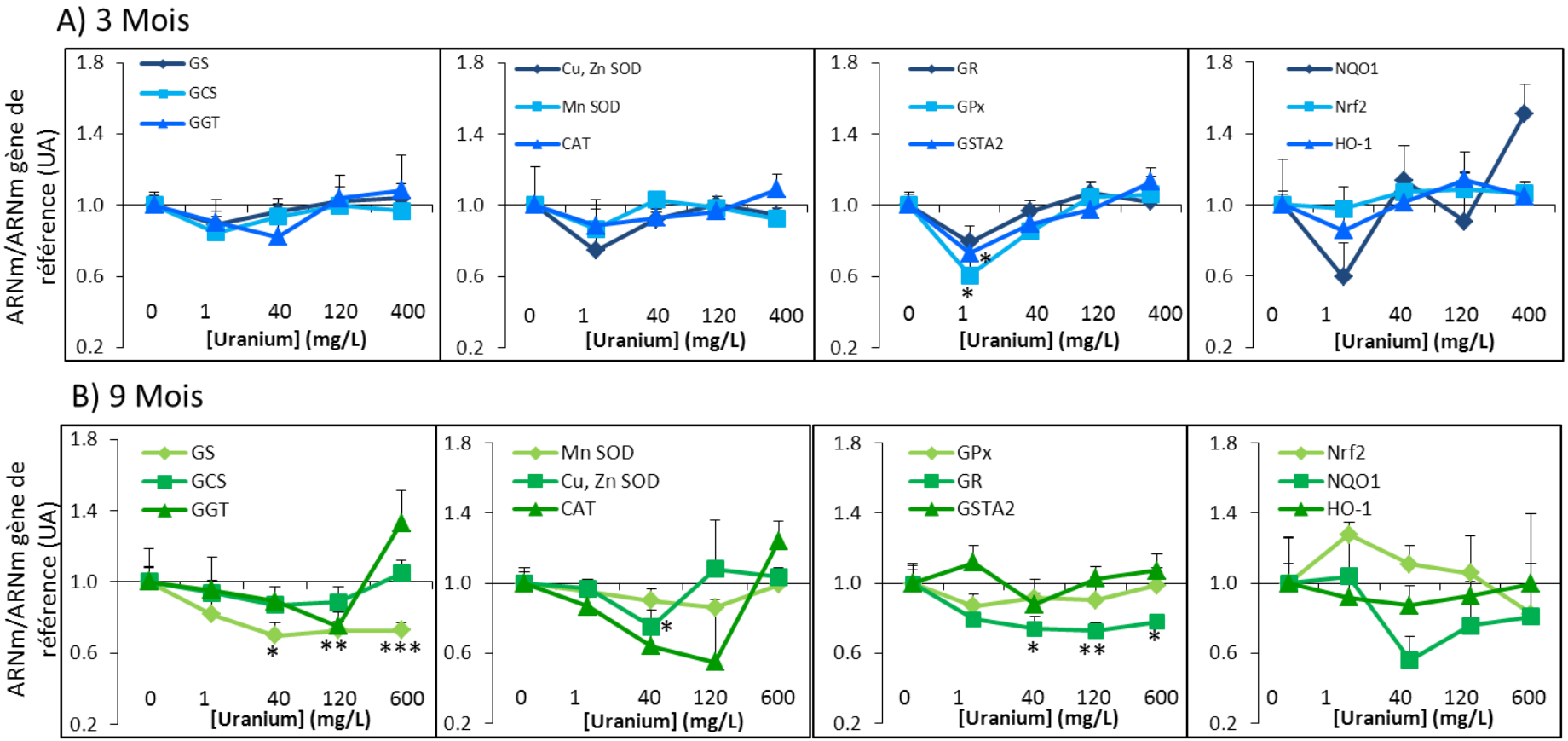

Figure 38 : Mesure de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2 dans le foie après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes codant pour l'HPRT et la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 40, 120, 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= p< 0,05 ; **= p< 0,01 ; ***= p< 0,001 L'analyse statistique a été conduite *via* un *t*-test de Student.

GCS: Gamma-Glutamyl Cystéine Synthétase ; GS : Glutathion Synthétase ; GGT : Gamma-Glutamyl Transférase ; Mn SOD : Manganèse Superoxyde Dismutase ; Cu, Zn SOD : Cuivre, Zinc Superoxyde dismutase ; CAT : Catalase ; GPx : Glutathion Peroxydase ; GR: Glutathion reductase, ; GSTA2 : Glutathion-S-Transférase A2 ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1 : Hème Oxygénase-1 ; NQO1 : NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1.

L'expression génique d'HO-1 est également diminuée (-36 %) mais uniquement à 40 mg/L ($p < 0,05$). Une augmentation de 20 % de l'expression génique de la CAT est observée chez les animaux ayant reçu une solution d'uranium à 400 mg/L ($p < 0,05$).
Après 3 mois de contamination, les effets observés sont donc peu nombreux, à l'instar de ceux décrits au niveau hépatique *(cf. Figure 38)*, et principalement décrits chez les animaux contaminés à une solution d'uranium à 400 mg/L.

La *Figure 39B* montre qu'après 9 mois de contamination, seule l'expression génique de HO-1 est diminuée chez les animaux ayant ingéré la plus forte concentration d'uranium (600 mg/L) (- 36%, $p < 0,05$).

Paradoxalement, les modifications d'expression génique des enzymes anti-oxydantes évaluées dans le rein sont plus importantes après 3 mois de contamination qu'après 9 mois de contamination. De plus, elles semblent moins importantes que celles décrites dans le foie, alors que la quantité d'uranium accumulée dans cet organe est 250 fois moins importante que dans le rein *(Cf. Tableau 23)*.

c. Métabolisme du Glutathion

Le glutathion est un anti-oxydant endogène important qui existe sous deux formes : une réduite GSH, qui est prépondérante et une forme oxydée le GSSG. Le passage d'une forme à l'autre met en jeu deux enzymes la GPx et la GR comme le montre la *Figure 13 (cf.p. 126)*. La GST permet la conjugaison du GSH avec des xénobiotiques pour former des molécules plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminées.

c.1 Le foie

Les taux hépatiques de GSH et GSSG ne varient pas après 3 mois de contamination par l'uranium à différentes concentrations comme le montre la *Figure 40A*.
De même, les activités des enzymes impliquées dans son métabolisme- GR, GST, GPx- ne sont pas modifiées suite à une contamination par l'uranium quel que soit le groupe considéré.
En revanche, après 9 mois de contamination, le taux de GSH augmente mais est significatif uniquement pour la plus forte concentration en uranium (+ 130 % ; $p < 0,05$) *(Figure 40B)*.

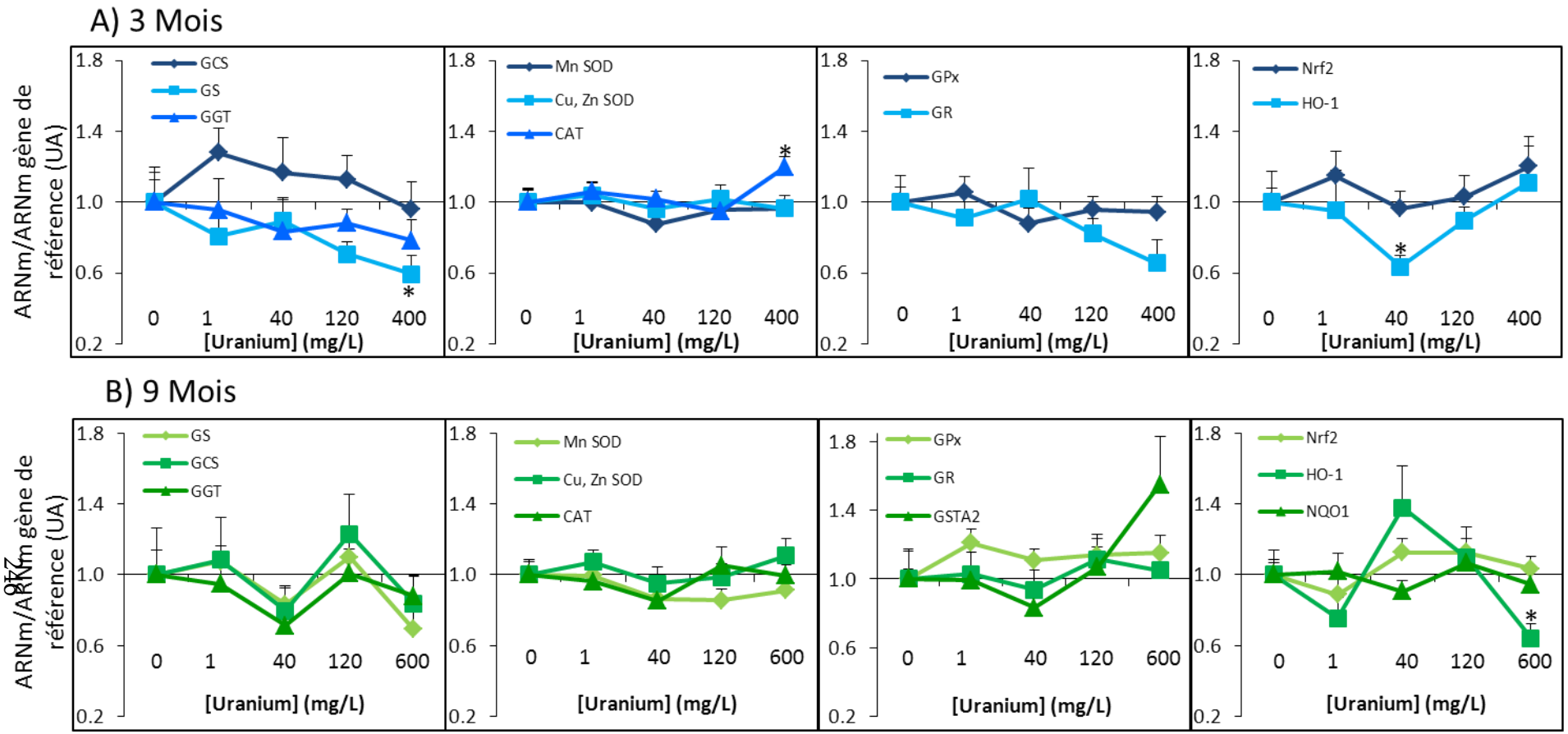

Figure 39 : Mesure de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2 dans le cortex rénal après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination par l'uranium

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes codant pour l'HPRT et la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 40, 120, 400 ou 600 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= p< 0,05 ; **= p< 0,01 ; ***= p< 0,001. L'analyse statistique a été conduite *via* un *t*-test de Student.

GCS: Gamma-Glutamyl Cystéine Synthétase ; GS : Glutathion Synthétase ; GGT : Gamma-Glutamyl Transférase ; Mn SOD : Manganèse Superoxyde Dismutase ; Cu, Zn SOD : Cuivre, Zinc Superoxyde dismutase ; CAT : Catalase ; GPx : Glutathion Peroxydase ; GR: Glutathion reductase ; GSTA2 : Glutathion-S-Transférase A2 ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1 : Hème Oxygénase-1 ; NQO1 : NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1.

Le taux de GSSG demeure quant à lui équivalent entre les différents groupes. L'activité de la GST est diminuée pour tous les animaux contaminés pendant 9 mois, mais de façon significative uniquement à 120 et 600 mg/L ($p < 0,05$). Dans ces deux groupes, l'activité hépatique de la GST est proche de la limite de détection : elle est respectivement divisée par 80 et par 100.

c.2 Le rein

Dans le rein, les variations de GSH suite à la contamination par l'uranium sont beaucoup plus importantes que dans le foie. Ainsi, après 3 mois de contamination par l'uranium *(Figure 41A)*, le taux de GSH augmente significativement (x 2,2) au niveau du cortex rénal chez les animaux contaminés par la plus forte concentration en uranium (400 mg/L) par rapport aux animaux non contaminés ($p < 0,05$) alors que le taux de GSSG ne varie pas.

La contamination par l'uranium entraîne une multiplication par 3 de l'activité de la GPx uniquement chez les animaux contaminés *via* une solution d'uranium à 40 mg/L ($p < 0,05$). L'activité de la GST est faiblement diminuée chez les animaux des groupes 1, 40 et 120 mg/L (- 20 % ; $p < 0,05$). En revanche, la contamination par l'uranium n'induit pas de modifications de l'activité de la GR.

Après 9 mois de contamination *(Figure 41B)*, une augmentation dose dépendante du GSH est observée dès 40 mg/L (x4 ; $p < 0,010$). Entre les animaux témoins et ceux ayant reçu une concentration de 120 ou de 600 mg/L d'uranium *via* l'eau de boisson, le taux de GSH rénal est multiplié de façon surprenante par un facteur compris entre 6 et 8 par rapport aux animaux non contaminés ($p < 0,001$). La contamination par l'uranium pendant 9 mois n'entraîne pas de variation du taux de GSSG ni des activités de la GR, GPx et GST.

En conclusion, le système anti-oxydant est affecté suite à une contamination chronique par l'uranium, notamment le pool de glutathion au niveau rénal. Cet effet sur le taux de GSH rénal est dose- et temps-dépendant. En effet, après 9 mois de contamination, une augmentation dose dépendante du GSH rénal est observée dès 40 mg/L alors qu'après 3 mois de contamination il est augmenté uniquement pour la plus forte concentration (400 mg/L).

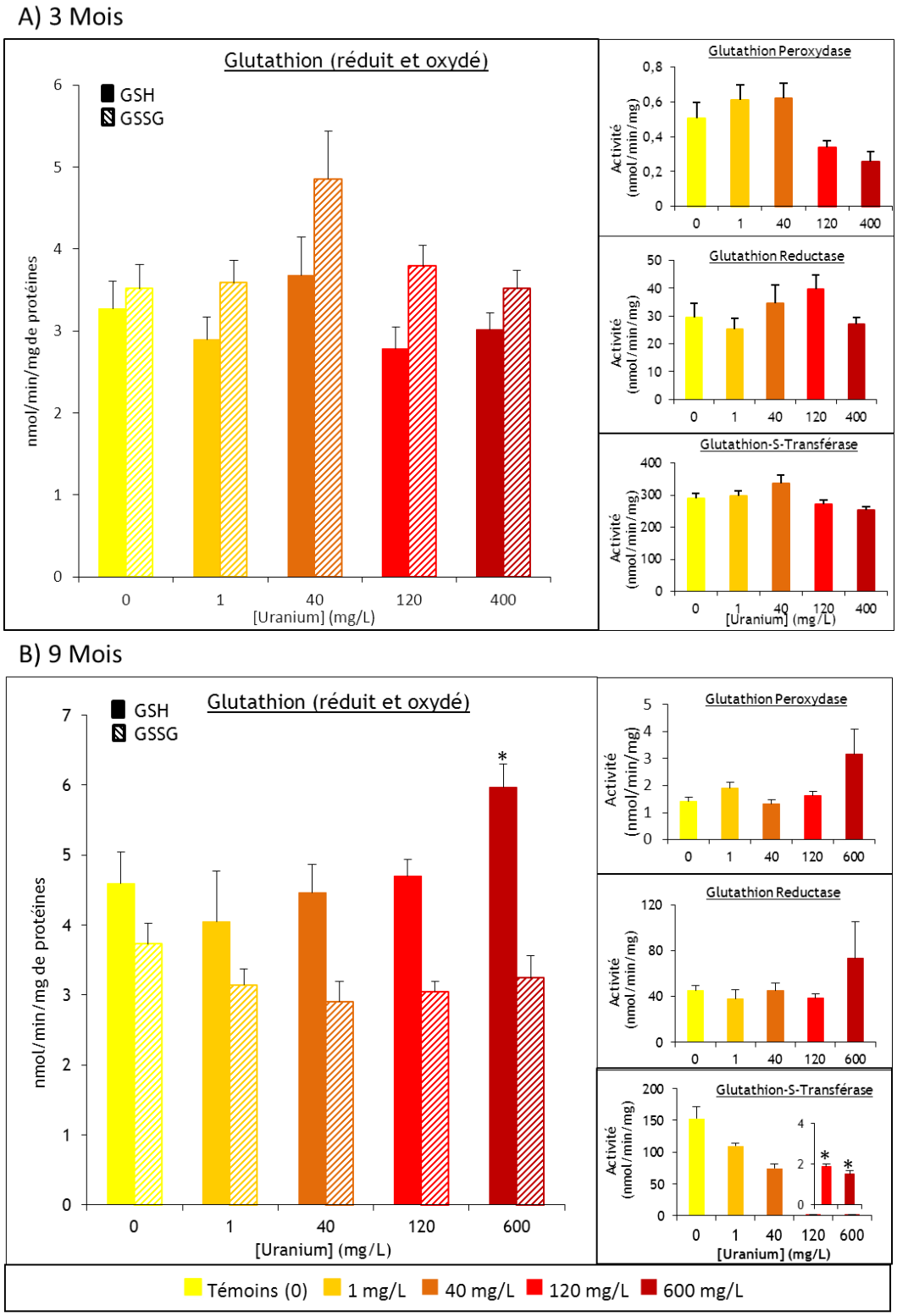

Figure 40 : Métabolisme du Glutathion dans le foie après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination à l'uranium.

Les taux de Glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG), les activités de la Glutathion Peroxydase (GPx), de la Glutathion réductase (GR) et de la Glutathion-S-Transférase (GST) ont été mesurés au niveau hépatique chez des rats témoins (0) ou contaminés à différentes concentrations d'uranium (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) (n=12 pour chaque groupe). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées et les animaux témoins est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

Au niveau hépatique, les variations sont également plus marquées après 9 mois de contamination.
Paradoxalement à ce qui est attendu dans le cas de l'induction d'un stress oxydant par l'uranium, l'expression génique des enzymes anti-oxydantes est peu diminuée suite à une contamination chronique par l'uranium. Ainsi, au niveau hépatique, l'expression génique de la GPx, GSTA2, GS, Cu, Zn SOD et GR est diminuée. Dans le rein, seules la GS, la CAT et HO-1 voient leur expression génique diminuée.

L'ensemble des résultats obtenus est résumé sur la *Figure 42* et a également donné lieu à un article *(cf. Annexe III : p. 389)*.

C. Analyses des résultats

L'étude du suivi des animaux durant la contamination a montré que l'augmentation de la concentration en uranium n'induit pas de modification sur la consommation alimentaire et hydrique et donc sur la prise de poids des animaux. Néanmoins, les résultats de la quantification par ICP-MS confirment que les animaux ont ingéré et accumulé de l'uranium *via* l'eau de boisson. Ces mesures ont mis en évidence que l'uranium s'accumule de façon dose-dépendante dans les reins, l'os et le foie sans observer de saturation. La quantité d'uranium mesurée dans les reins et l'os est très supérieure à celle évaluée dans le foie : la quantité d'uranium est de 6 µg par gramme de rein contre 0,024 µg d'uranium par gramme de foie (600 mg/L). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études d'exposition chronique à l'uranium (Gilman *et al.* 1998b ; Paquet *et al.* 2006). Le rein, cible préférentielle d'accumulation de l'uranium dans le cas d'une contamination aiguë, est donc l'organe dans lequel la plus grande quantité d'uranium est mesurée : jusqu'à 6 µg par gramme d'organe dans notre étude, soit au-delà du seuil théorique d'apparition de la néphrotoxicité tel que défini dans la littérature à 3 µg d'uranium par gramme d'organe (ATSDR 2013 ; Diamond *et al.* 1989).
L'utilisation de la technique d'imagerie SIMS a confirmé que les TCP constituent la localisation préférentielle de l'uranium récemment décrite par Tessier *et al.* à une concentration de 40 mg/L d'uranium (Tessier *et al.* 2012). Notre étude a également permis de mettre en évidence la localisation pour des concentrations plus importantes.

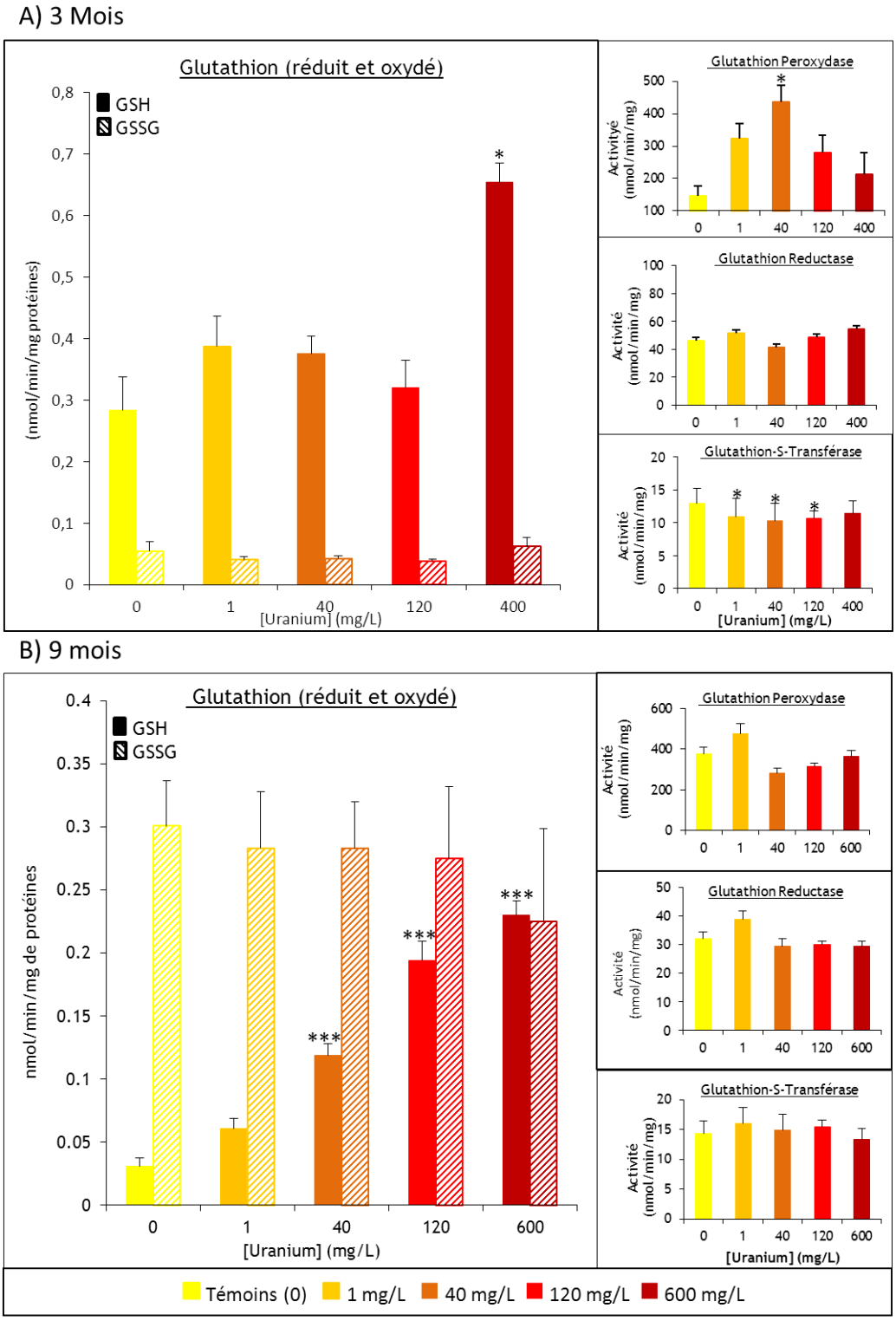

Figure 41 : Métabolisme du Glutathion dans le cortex rénal après 3 (A) et 9 (B) mois de contamination à l'uranium.

Les taux de Glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG), les activités de la Glutathion Peroxydase (GPx), de la Glutathion réductase (GR) et de la Glutathion-S-Transférase (GST) ont été mesurés au niveau hépatique chez des rats témoins (0) ou contaminés à différentes concentrations d'uranium (1, 40, 120 ou 400 ou 600 mg/L) (n=12 pour chaque groupe). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées et les animaux témoins est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à un paramètre.

En effet, la technique d'imagerie SIMS montre ainsi que l'uranium s'accumule de façon préférentielle dans les noyaux des cellules du TCP, probablement sous forme non précipitée, pour des teneurs d'uranium dans l'eau de boisson supérieures ou égales à 120 mg/L.

Suite à ces résultats sur la quantification et la localisation de l'uranium dans le rein après 9 mois de contaminations chronique à l'uranium, nous sommes donc dans les conditions expérimentales atrendues, c'est-à-dire une exposition chronique à l'uranium allant jusqu'à 6 µg/g d'uranium dans les reins pour la plus forte concentration dans l'eau de boisson.

L'étude des taux des différents paramètres biochimiques plasmatiques et urinaires a mis en évidence que la contamination par l'uranium entraîne des modifications ponctuelles mais sans altération de l'état clinique des animaux. De même, l'étude de biomarqueurs de néphrotoxicité classiquement utilisés (créatinine, urée) ou plus récents (KIM-1, Clusterine, GSTa1, Tbx B2, Vit D) n'a pas montré de variations en fonction de la concentration en uranium. Les mesures de KIM-1 effectuées après 9 mois de contamination sont en accord avec celles réalisées chez des animaux témoins et contaminés à 2,67 mg/kg/jour d'uranium lors d'une contamination pendant 9 mois avec un traitement par la gentamicine au cours de la dernière semaine pendant laquelle l'exposition à l'uranium ne modifie pas les effets propres liés au traitement par la gentamicine (Rouas *et al.* 2011). D'autre part, après exposition pendant 9 mois à l'uranium (2,67 mg/kg/j), une diminution du taux plasmatique de la forme active de la Vit D a été décrite (Tissandie *et al.* 2007). Cependant, ce résultat n'a pas été retrouvé à cette dose ni aux doses supérieures.

Cette absence de néphrotoxicité suite à une contamination chronique est confirmée par l'analyse histologique. Les lésions observées ne sont pas liées à la contamination mais au vieillissement physiologique des animaux, résultat qui est également retrouvé au niveau hépatique.

Au regard de ces résultats, une contamination chronique *via* l'eau de boisson conduit à une accumulation d'uranium dans certains organes à des concentrations considérées comme toxiques sans que celles-ci n'induisent des effets délétères, notamment au niveau rénal.

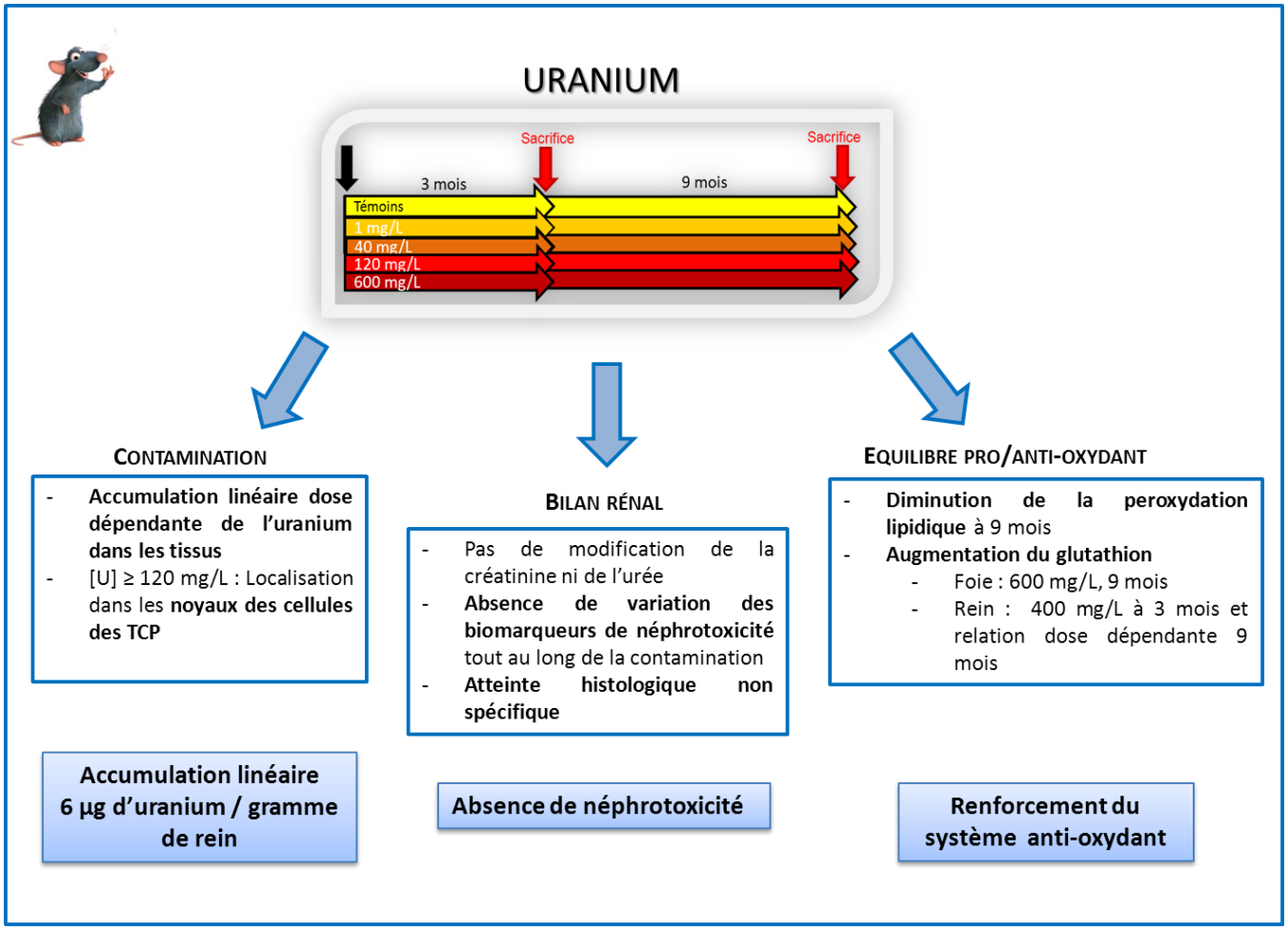

Figure 42 : Résumé des résultats obtenus après contamination chronique à l'uranium selon un protocole « Effet-dose » chez le rat.

En parallèle, l'analyse du système pro/anti-oxydant a été entreprise afin de déterminer si la contamination par l'uranium perturbe ce système dans le cas d'une contamination chronique ne conduisant pas à une néphrotoxicité avérée. La peroxydation lipidique montre une diminution au niveau plasmatique, hépatique et rénal après 9 mois de contamination chronique par l'uranium.

Cette diminution est d'autant plus surprenante qu'elle va à l'encontre des résultats des études précédentes qui ont montré une augmentation des TBARS observée dans les reins (Linares *et al.* 2006 ; Taulan *et al.* 2004). La discordance de ces études s'explique néanmoins soit par l'utilisation de concentrations d'uranium plus élevées, soit d'un changement de modèle (souris *versus* rat) modifiant la valeur d'ingestion quotidienne par poids corporel.

L'analyse du système anti-oxydant, notamment le glutathion (réduit et oxydé) a été faite après 3 et 9 mois de contamination au niveau rénal et hépatique. Une augmentation rénale du GSH est observée dès 3 mois de contamination pour la plus forte concentration en uranium alors qu'après 9 mois cette augmentation est dose-dépendante dès 40 mg/L. Dans notre étude, le taux de glutathion est d'avantage modifié suite à une contamination par l'uranium au niveau rénal qu'hépatique où il est uniquement augmenté après 9 mois de contamination chez les animaux ayant reçu la plus forte concentration d'uranium (600 mg/L). Cette disparité peut s'expliquer par l'accumulation préférentielle d'uranium dans le rein. L'augmentation du glutathion ne serait pas liée aux enzymes intervenant dans son métabolisme- GR, GPx et GST- car leurs activités étant peu ou pas de modifiées, cela ne permet pas d'expliquer les variations de GSH. Cette augmentation pourrait donc être due à une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse du GSH. Les résultats montrent une diminution de l'expression génique de la GS et de la GR au niveau du foie dès 40 mg/L après 9 mois de contamination. La diminution de taux d'ARNm de la GR n'est pas associée à une modification de l'activité enzymatique de cette enzyme. A l'inverse, l'activité hépatique de la GST est diminuée après 9 mois de contamination et pas son expression génique. Cette différence entre l'expression génique et l'activité peut s'expliquer par des modifications post-transcriptionnelles. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes conduisant à l'augmentation de taux de GSH après contamination chronique par l'uranium.

A la différence des paramètres biochimiques et histologiques, pour lesquels aucune altération n'est observée que ce soit après 3 ou 9 mois de contamination, le système pro/anti-oxydant est d'avantage affecté après 9 mois de contamination qu'après 3 mois de contamination.

Suite à ces résultats, la contamination chronique par l'uranium n'induit pas de néphrotoxicité dans nos conditions expérimentales malgré une accumulation dose dépendante d'uranium dans les tissus ; à l'inverse, cela semble renforcer le système anti-oxydant et plus particulièrement le taux de glutathion. Afin de comprendre les processus mis en jeu et de savoir si ce renforcement du système anti-oxydant est responsable de l'absence de néphrotoxicité induite par l'uranium -y compris à forte concentration- les effets d'une contamination chronique à l'uranium ont ensuite été étudiés sur un modèle déficient vis-à-vis du système anti-oxydant.

II. Etude de Nrf2 : Approche *in vivo*

A. Contexte

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle clé du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation des enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la GPx ou encore la GST qui est également impliquée dans la détoxication des xénobiotiques (Hybertson *et al.* 2011 ; Lee *et al.* 2005b ; Ma 2013). En raison de ce rôle, Nrf2 est impliqué notamment dans le développement de pathologies chroniques *(cf.II.B.4.a.4 p.145)*, ou à la réponse à des expositions environnementales comme le cadmium (Wilmes *et al.* 2011 ; Wu *et al.* 2012) ou des médicaments (Shelton *et al.* 2013).

A l'instar de la première partie des résultats décrivant une perturbation de l'équilibre pro/anti-oxydant en l'absence de néphrotoxicité ; une précédente étude réalisée au laboratoire a mis en évidence après exposition chronique à l'uranium chez la souris pendant quatre mois (80 et 160 mg/L soit 13 et 26 mg/kg/jour) une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène au niveau rénal (Taulan *et al.* 2004).

Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux effets d'une contamination chronique à l'uranium chez un modèle déficient pour Nrf2, plus sensible au stress oxydant. Deux questions se posent alors :

- Les modifications induites par une contamination chronique à l'uranium sur le système pro/anti-oxydant passent-elle par la voie de Nrf2 ?
- L'inactivation de Nrf2 va-t-elle entraîner une aggravation ou un retour à la normale des effets de l'uranium sur l'équilibre pro/anti-oxydant après contamination chronique ?

Afin d'apporter des réponses à ces questions, un deuxième protocole expérimental *in vivo* a été mis en place. Des souris (souche C57Black 6 (C57BL/6)) mâles et femelles dont Nrf2 a été inactivé (KO) ou non (sauvages (WT)) ont été contaminées à différentes concentrations d'uranium (0, 1, 20 et 160 mg/L) pendant 4 mois.

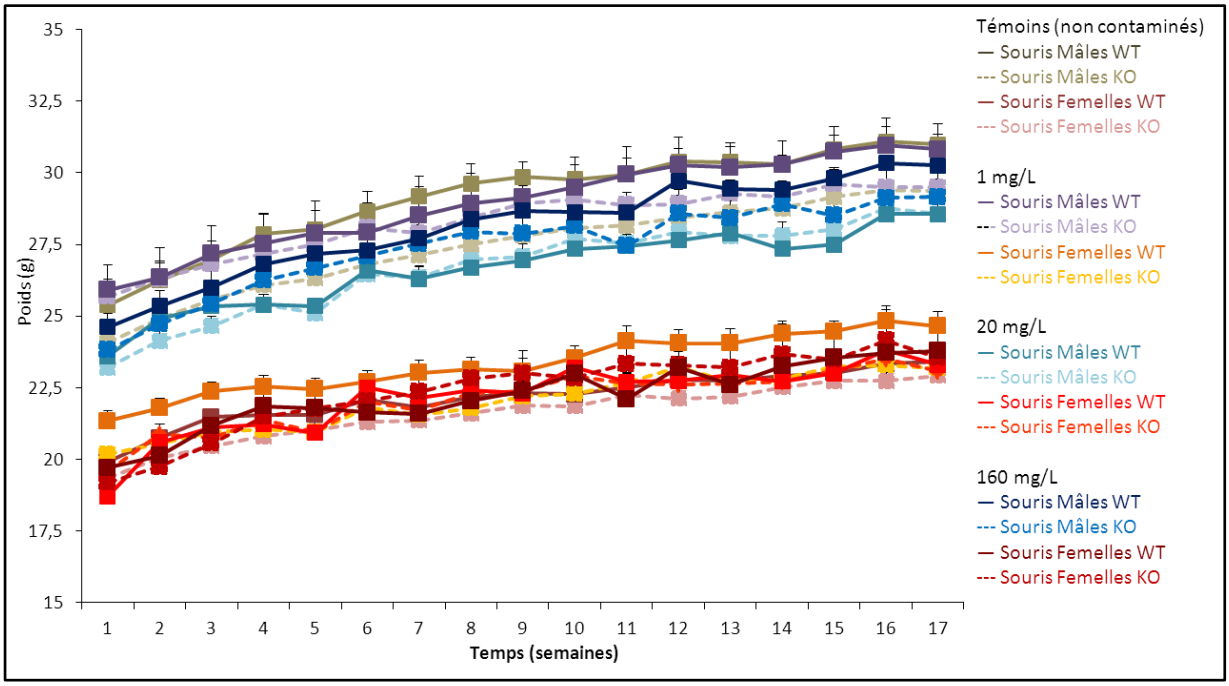

Figure 43 Suivi du poids des souris tout au long de la contamination

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne.

Le choix de la durée de contamination et des concentrations a été retenu afin de replacer notre étude dans des conditions similaires à celle de Taulan et *al.* (Taulan *et al.* 2004) et de pouvoir la comparer à celles réalisées chez le rat (*cf. I.*).

Le protocole *(cf. Figure 24 p. 182)* est subdivisé en 3 phases comprenant chacune quatre groupes témoins : non contaminés WT mâles et femelles, non contaminés KO mâles et femelles. Après analyse de la disparité des groupes témoins et pour une meilleure compréhension des résultats, les groupes témoins des trois phases expérimentales ont été regroupés, ainsi pour chaque groupe n= 18 pour les témoins et n=6 pour les autres groupes.

Un suivi longitudinal de biochimie clinique a été réalisé afin de contrôler la bonne santé des animaux durant la contamination, étant donné qu'il existe peu d'études sur la survie des souris Nrf2$^{-/-}$ en cas d'exposition chronique et aucune pour l'uranium. D'autre part, des paramètres impliqués dans l'équilibre pro/anti-oxydant ont été étudiés au niveau du rein, cible préférentielle d'accumulation de l'uranium, pour étudier les effets de l'uranium chez des animaux plus sensibles au stress oxydant.

B. Résultats

1. Suivi longitudinal

Les animaux ont été pesés de façon hebdomadaire tout au long des 4 mois de contamination. La *Figure 43* représente l'évolution du poids des souris en fonction du temps de contamination. Les femelles ont un poids inférieur à celui des mâles indépendamment de la contamination et de l'inactivation ou non de Nrf2 ($p < 0,05$). Pour les mâles et les femelles, la contamination par l'uranium ne conduit pas à une variation significative de poids par rapport aux animaux non contaminés mâles ou femelles (témoins). Enfin, l'inactivation de Nrf2 n'a pas de conséquence sur la prise de poids des animaux.

Le suivi de la consommation hydrique (données non montrées) montre que les souris boivent la même quantité d'eau quel que soit le groupe considéré.

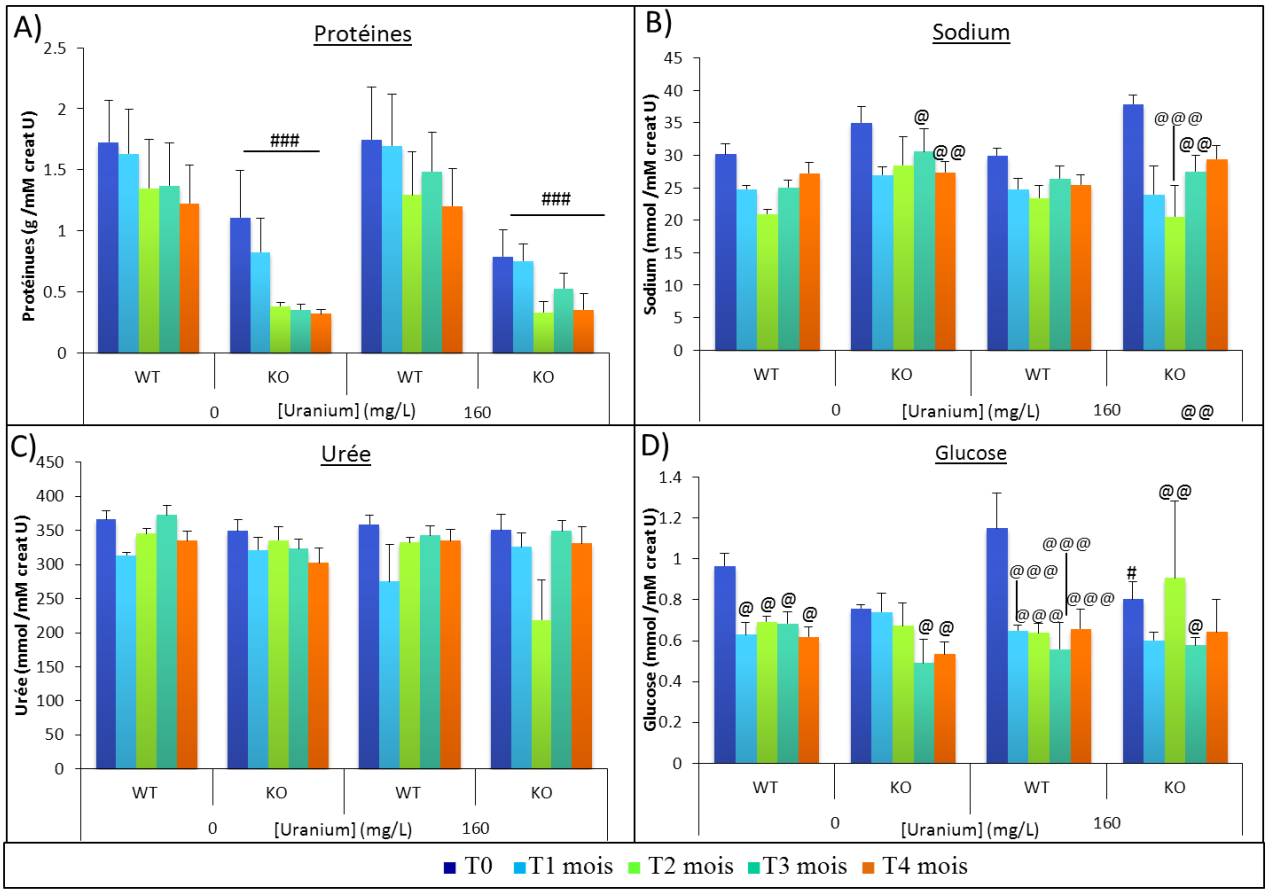

Figure 44 : Suivi des paramètres urinaires pendant 4 mois de contamination par l'uranium à 160 mg/L

Les urines ont été prélevées tous les mois après 24 heures en cage à métabolisme. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 20 ou 160 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence au cours du temps de contamination est significative pour @= $p < 0,05$; @@= $p < 0,01$; @@@= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont le temps de contamination et la contamination à l'uranium).

a. Paramètres urinaires

Durant les quatre mois de contamination, un prélèvement mensuel d'urines a été réalisé, les animaux étant placés à deux ou trois par cage. Les résultats de la *Figure 44* ne concernent que les animaux témoins et les animaux contaminés à 160 mg/L d'uranium. Afin d'avoir un effectif conséquent et étant donné l'absence de différence de valeur des paramètres mesurés entre les mâles et les femelles, ces derniers ont été regroupés. Quatre groupes d'animaux sont donc représentés : souris KO témoins, souris WT témoins, souris KO contaminées à 160 mg/L et souris WT contaminées à 160 mg/L. Les paramètres biochimiques mesurés dans les urines sont les mêmes que ceux mesurés chez le rat *(cf. Tableau 25 p. 232)*. Seuls les taux de protéines, de sodium, d'urée et de glucose sont représentés sur la *Figure 44*. Les résultats sont exprimés en unités par mole de créatinine urinaire.

✷ Protéines

D'après la *Figure 44A*, le taux de protéines urinaires est diminué chez les souris $Nrf2^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages qu'elles soient contaminées ou non ($p < 0,001$). En revanche, aucune modification n'est observée au cours du temps ni suite à la contamination par l'uranium.

✷ Sodium

La *Figure 44B* représente les variations du taux urinaire de sodium. Chez les souris sauvages, le taux de sodium ne varie pas au cours du temps chez les animaux contaminés ou non. En revanche, des modifications sont observées pour les souris KO. Ainsi, une diminution de 12 % et de 22 % du sodium urinaire est observée après respectivement 3 et 4 mois de contamination chez les souris KO témoins ($p < 0,01$ et 0,05). De même, pour les animaux KO contaminés, une diminution du sodium urinaire est observée après 2 (-46 % ; $p < 0,001$) et 3 mois de contamination (-27 % ; $p < 0,001$) par rapport au début de la contamination. En conclusion, la contamination par l'uranium n'induit pas de perturbations du taux de sodium urinaire, les diminutions observées chez les souris KO contaminés ou non étant similaires.

✷ Urée

Sur la *Figure 44C*, le taux urinaire d'urée n'est pas modifié ni au cours du temps, ni par la contamination que les souris soient ou non déficientes pour Nrf2.

✷ Glucose

Les variations du glucose urinaire sont représentées sur la *Figure 44D*. Concernant, les souris non contaminées, des modifications au cours du temps sont observées. En effet, chez les souris WT non contaminées, une diminution du taux urinaire de glucose (-35,5 %°) est observée dès un mois de contamination et reste ensuite constante tous les mois ($p<0,05$). De même, une diminution de 34,7 % et de 30 % est observée après 3 et 4 mois de contamination respectivement chez les souris témoins KO ($p < 0,05$). Dans le cas d'une contamination à 160 mg/L d'uranium, une diminution du glucose urinaire est observée dès 1 mois pour les souris sauvages (- 44% ; $p < 0,001$), la diminution restant constante à 2, 3 et 4 mois ($p < 0,001$). Après 2 et 3 mois de contamination, le taux de glucose urinaire diminue chez les souris KO (-12,5 % et -29 % ; $p < 0,001$ et 0,05). Enfin, le taux de glucose dans les urines des souris sauvages au début de la contamination est 1,4 fois supérieure à celui de souris KO ($p < 0,05$). Le taux de glucose urinaire est donc d'avantage modifié au cours du temps chez les souris WT contaminées ou non.

2. Quantification de l'uranium

La *Figure 45* représente la quantité d'uranium accumulée par organe (foie, fémur et rein) en fonction de la concentration d'uranium (0, 1, 20 et 160 mg/L).

Dans les trois organes étudiés, une accumulation linéaire d'uranium est observée et ce quel que soit le sexe (mâle ou femelle) ou le génotype (KO ou sauvage) en fonction de la concentration en uranium (0, 1, 20 ou 160 mg/L). En effet, la régression linéaire des 12 groupes considérés (4 par organe) est comprise entre 0,9 et 1. Ainsi, la quantité d'uranium accumulé est proportionnelle à celle ingérée par l'animal. La quantité mesurée dans le rein et le fémur est plus de 20 fois supérieure à celle mesurée dans le foie, comme cela était le cas pour les rats contaminés *(cf. Tableau 23 p. 224)*.

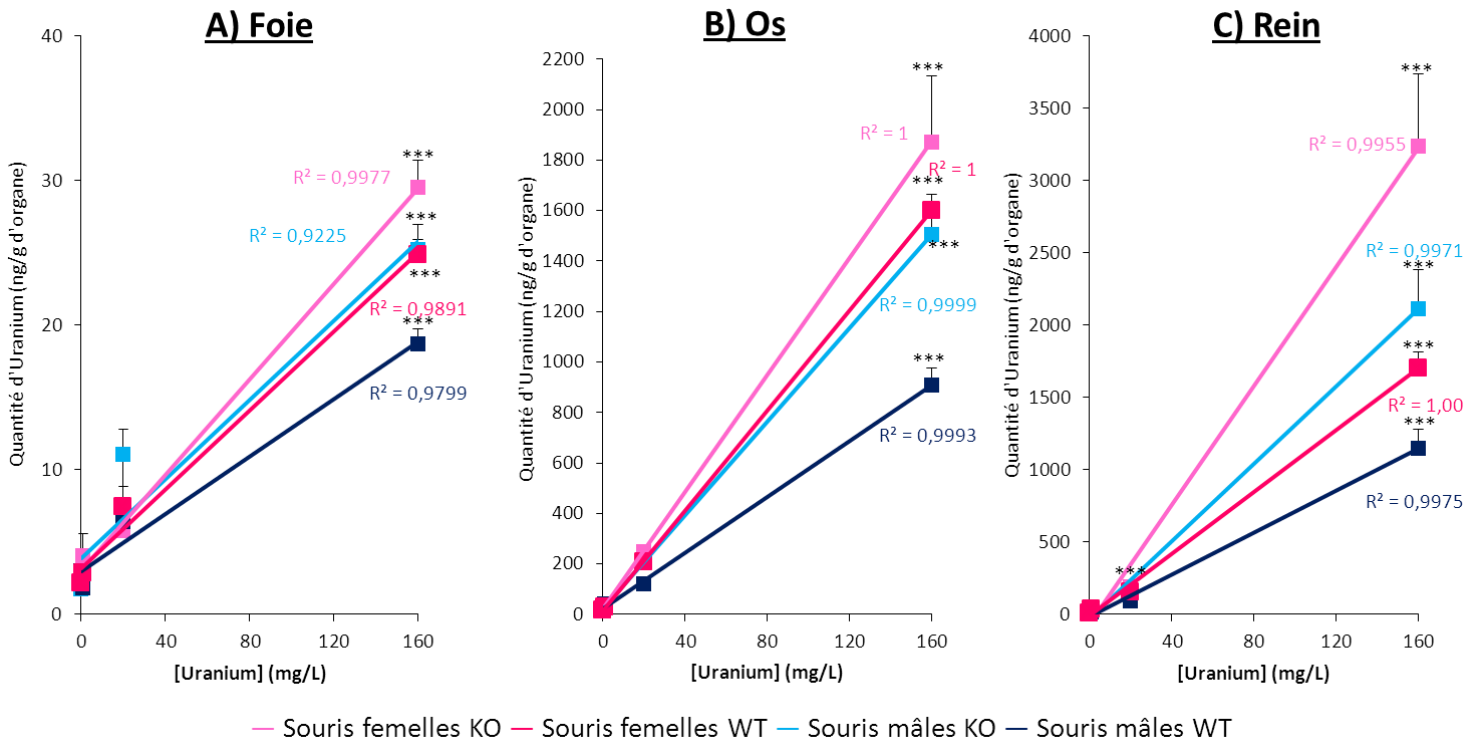

Figure 45 : Accumulation d'uranium dans le foie (A), l'os (B) et le rein (C) pendant 4 mois de contamination.

Les résultats sont exprimés en nanogrammes d'uranium par gramme d'organe. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) et les animaux témoins (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la contamination et le modèle (KO ou non)).

De plus, l'accumulation d'uranium dans les organes est augmentée pour tous les animaux contaminés à 160 mg/L d'uranium par rapport aux animaux témoins ($p<0,001$). D'autre part, dans tous ces organes, les animaux KO accumulent plus d'uranium que les animaux sauvages et ce pour les mâles et les femelles.

✷ Le foie

Pour le foie *(Figure 45A)*, l'accumulation d'uranium est la plus importante chez les femelles KO : elle est de 30 nanogrammes d'uranium par gramme de foie pour les souris contaminées à 160 mg/L, soit 12 fois plus importante que chez les non contaminées ($p < 0,001$). Chez les souris mâles, une différence significative d'accumulation est également observée entre les souris KO et les sauvages ($p < 0,05$). Ainsi, pour les souris mâles contaminées à 160 mg/L, les souris KO accumulent 25 nanogrammes d'uranium par gramme de foie contre 19 ng/ grammes pour les souris sauvages ($p < 0,05$).

✷ Le fémur

Au niveau du fémur *(Figure 45B)*, chez les animaux contaminés à 160 mg/L, l'accumulation d'uranium est la plus importante chez les femelles KO : une accumulation moindre de 15,5 ; 20 et 52 % est observée chez les femelles sauvages, les mâles KO et les mâles sauvages respectivement par rapport aux femelles KO ($p < 0,01$ ou 0,001). Une augmentation de l'accumulation d'uranium est observée dès une contamination à 20 mg/L chez les souris femelles KO ($p < 0,05$), WT ($p < 0,01$) et les males KO ($p < 0,01$) par rapport au groupe non contaminé. L'accumulation d'uranium dans le fémur chez les mâles KO est aussi supérieure à celle observée chez les mâles sauvages ($p < 0,01$).

✷ Le rein

La *Figure 45C* représente l'accumulation d'uranium dans le rein dans les quatre groupes étudiés. La quantité d'uranium accumulée au niveau rénal est plus importante chez les souris KO femelles que chez les souris WT femelles ($p < 0,001$). Cette différence est également retrouvée pour les souris mâles ($p < 0,05$).

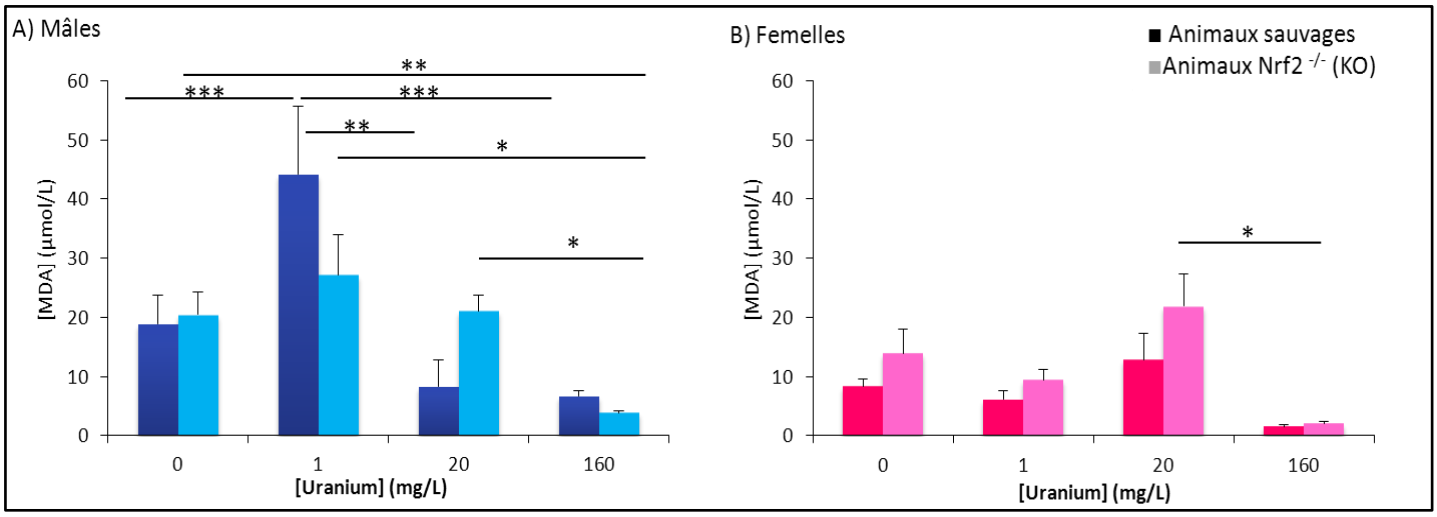

Figure 46 : Mesure des TBARS dans le plasma chez les souris sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$(■) mâles (A) et femelles (B) après 4 mois de contamination par l'uranium

Les TBARS sont un marqueur de peroxydation lipidique, reflet d'une atteinte pro-oxydante. Les résultats sont exprimés en micromolaires de MDA. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n =6 ou 12). La représentation d'une différence entre les animaux contaminées (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

Dans le cas d'une contamination à 160 mg/L d'uranium, les souris femelles KO accumulent plus de 3µg d'uranium par gramme de rein ce qui est respectivement 3 ; 2 et 1,5 fois supérieure aux souris mâles WT ($p < 0,001$), femelles WT ($p < 0,001$) et mâles KO ($p < 0,001$).

Ces premiers résultats montrent une accumulation plus importante d'uranium pour les femelles et pour les animaux KO (mâles et femelles). Nous avons donc par la suite étudié si cela a des conséquences sur le système pro/anti-oxydant, au niveau rénal.

3. Le système pro/anti-oxydant

a. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique qui est un marqueur de stress oxydant a été mesurée dans le plasma et dans les reins.

✷ Plasma

La mesure de la peroxydation lipidique dans le plasma est représentée sur la *Figure 46* Chez les mâles et les femelles, aucune différence significative n'est observée entre les souris WT et KO quelle que soit la concentration en uranium considérée. Par contre, la contamination par l'uranium entraîne des modifications plus importantes des TBARS chez les souris mâles que chez les souris femelles, KO et WT ($p < 0,001$).

MALES

Chez les souris males WT, la contamination par l'uranium augmente par 2,3 le taux de TBARS chez les souris ayant ingéré une solution à 1 mg/L d'uranium par rapport aux souris témoins ($p < 0,001$), aucune différence significative n'étant observée entre les souris contaminées à 20 et 160 mg/L et celles non contaminées. A l'inverse, le taux de TBARS est diminué de plus de 80 % chez les souris contaminées respectivement à 20 et 160 mg/L par rapport aux souris mâles WT contaminées à 1 mg/L ($p < 0,001$ ou 0,01).

Dans le cas de souris mâles KO, le taux de peroxydation lipidique plasmatique est divisé par 5 entre le groupe de souris contaminées par une solution à 160 mg/L d'uranium et le groupe témoin ($p < 0,01$).

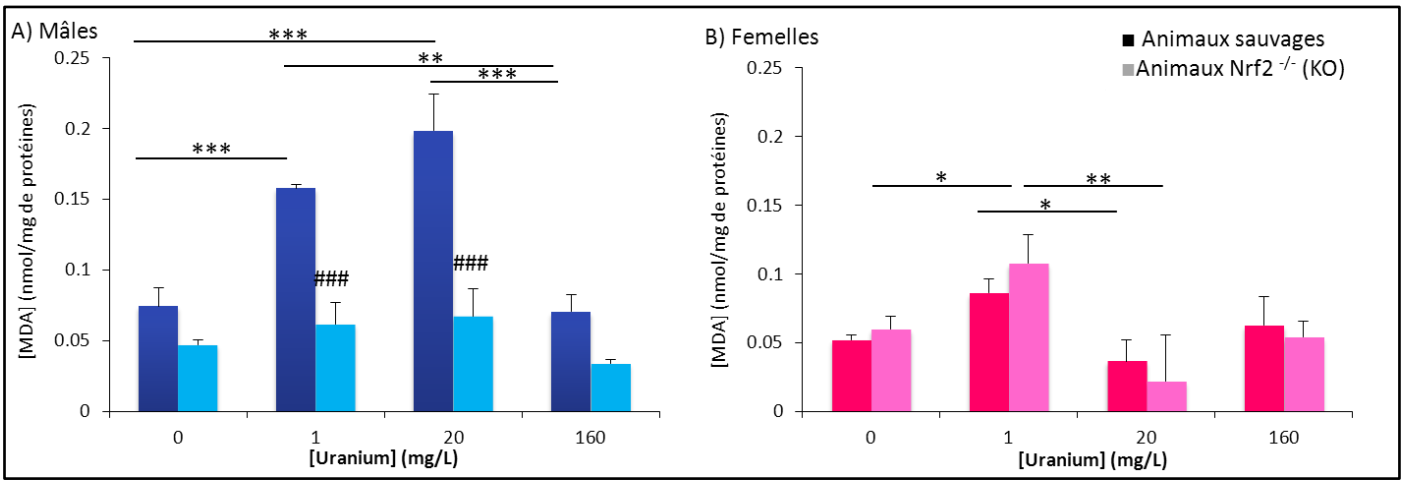

Figure 47 : Mesure des TBARS dans le rein chez les souris sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$(■) mâles (A) et femelles (B) après 4 mois de contamination par l'uranium

Les TBARS sont un marqueur de peroxydation lipidique, reflet d'une atteinte pro-oxydante. Les résultats sont exprimés en nanomoles de MDA/ miligramme de protéines. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

De même, une diminution du taux de TBARS est observée chez les animaux du groupe 160 mg/L par rapport aux groupes 1 et 20 mg/L. Le taux de TBARS est respectivement divisé par 7 ($p < 0,05$) et par 5 ($p < 0,05$).

FEMELLES

Chez les souris femelles sauvages et KO, la contamination par l'uranium n'entraîne pas de différence entre les souris contaminées et non contaminées. Une diminution de 11 fois du taux de TBARS entre les souris KO contaminées par une solution d'uranium à 20 mg/L et celles à 160 mg/L ($p < 0,05$) est observé.

✷ Rein

Au niveau rénal, la peroxydation lipidique est également modifiée suite à une contamination par l'uranium chez les souris mâles et femelles comme le montre la *Figure 47*.

Chez les animaux non contaminés, le génotype et le sexe n'induisent pas de différence significative.

MALES

La partie A) illustre les variations de TBARS au niveau rénal chez les souris mâles selon la concentration en uranium. Le taux de TBARS est divisé par 2,5 entre les souris mâles WT et KO contaminées à1 mg/L ($p < 0,001$). Cette diminution liée au génotype -/- est également observée pour les souris mâles contaminées par une solution à 20 mg/L d'uranium ($p < 0,001$). Chez les souris mâles WT, une augmentation de la peroxydation lipidique est observée entre les animaux contaminés par une solution d'uranium à 1 mg/L (x 2 ; $p < 0,001$) ou à 20 mg/L (x 3 ; $p < 0,001$) par rapport aux animaux non contaminés.

A l'inverse, le taux de TBARS est diminué entre ces mêmes groupes (1 et 20 mg/L) et le groupe des animaux contaminés à 160 mg/L d'uranium. Une diminution de 53 et de 65 % est respectivement observée pour les animaux contaminés à 1 ($p < 0,01$) et 20 ($p < 0,001$) mg/L. En revanche, la contamination par l'uranium n'induit pas de variation des TBARS chez les souris mâles KO.

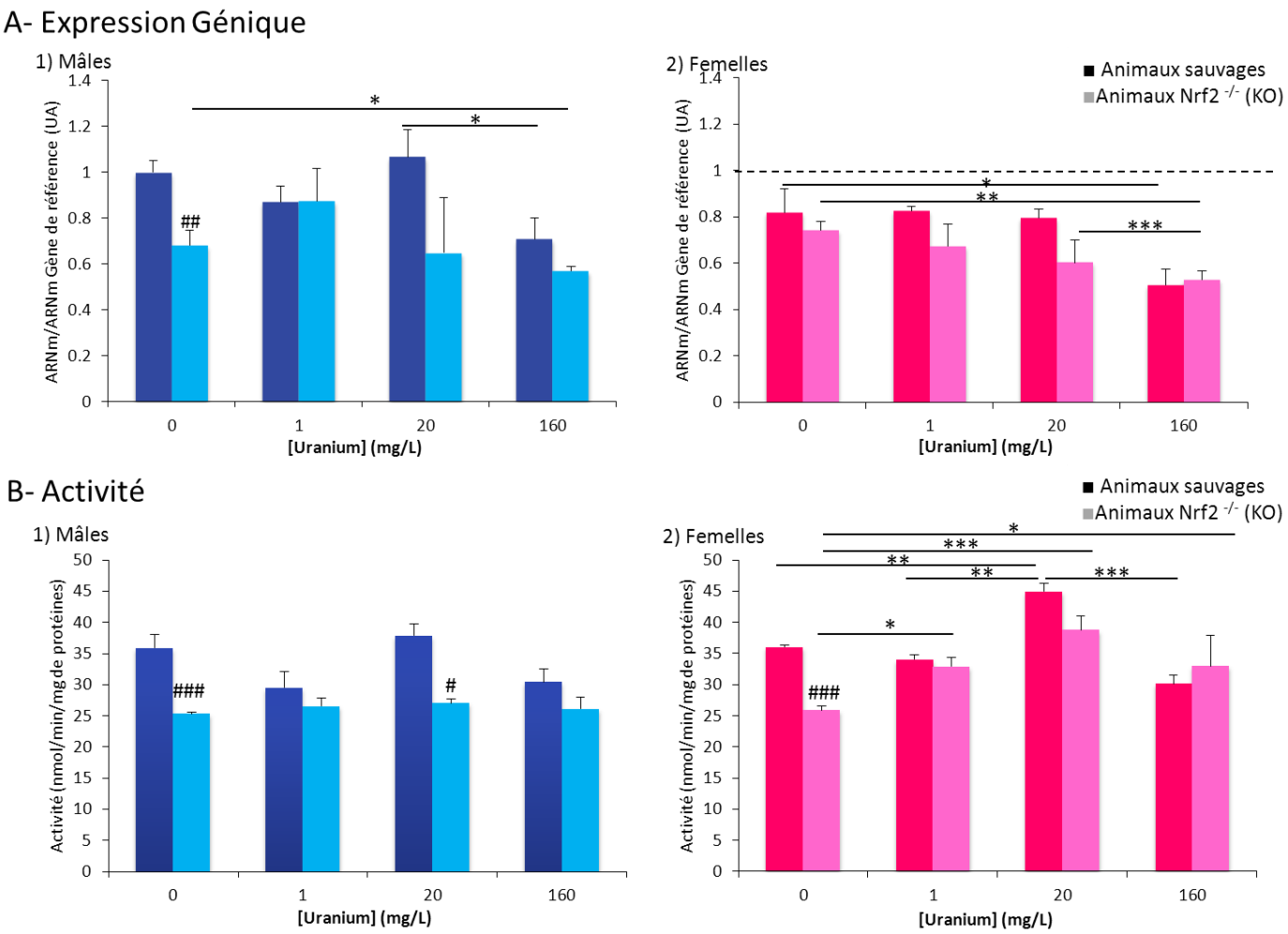

Figure 48 : Expression génique (A) et activité (B) de la Glutathion Reductase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéines et l'expression génique correspond au rapport de l'ARNm du gène d'intérêt/ARNm des gènes de référence, les valeurs ayant été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes de référence codant pour l'HPRT et la GAPDH. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

FEMELLES

Chez les souris femelles, aucune variation significative n'est observée entre les animaux KO et les animaux sauvages et ce indépendamment de la concentration en uranium ingérée. La contamination par l'uranium diminue de 50 % la peroxydation lipidique entre les souris femelles sauvages ayant ingéré une solution d'uranium à 1 mg/L et à 20 mg/L par rapport aux souris femelles non contaminées WT ($p < 0,05$).

Dans le cas des souris femelles KO, le taux de TBARS est multipliée par 2 entre le groupe témoin et les souris contaminées par une solution à 1 mg/L ($p < 0,05$). A l'inverse, la peroxydation lipidique est divisée par 4 entre les souris femelles KO contaminées à 1 mg/L et à 20 mg/L ($p < 0,01$).

b. Enzymes anti-oxydantes

Les mesures des différents paramètres du système anti-oxydant ont toutes été réalisées dans le rein de souris car cet organe est la première cible d'accumulation de l'uranium. Les moyennes des valeurs brutes de PCR (ΔCt) des gènes étudiés ont été normalisées par rapport au groupe des souris mâles sauvages non contaminées.

b.1 Glutathion Reductase

✷ Expression génique

La *Figure 48A* représente l'expression génique de la GR chez les mâles (*1*) et chez les femelles (*2*) après contamination par l'uranium pendant 4 mois.

Chez les souris non contaminées, aucune modification n'est observée entre les animaux WT et KO, ni entre les mâles et les femelles (i.e. KO et WT).

MALES

Dans le cas des souris mâles, l'expression génique de la GR est diminuée entre les souris témoins mâles KO et WT ($p < 0,01$). Une diminution de l'expression génique de la GR est également observée entre les souris WT contaminées à 20 et à 160 mg/L (- 24 %, $p < 0,05$). Chez les souris mâles KO, la contamination par l'uranium à 160 mg/L conduit à une diminution de 15 % de l'expression génique de la GR ($p < 0,05$).

FEMELLES

L'expression génique de la GR chez les femelles contaminées à 160 mg/L est diminuée respectivement de 40 et 30 % pour les femelles WT et KO par rapport aux souris non contaminées ($p < 0,05$ et 0,01). De même, une diminution de 18 % de l'expression génique de la GR est observée entre les souris femelles KO contaminées à 20 et 160 mg/L ($p < 0,001$).

✷ Activité enzymatique

Pour les souris non contaminées, l'activité de la GR est diminuée chez les souris non contaminées KO par rapport aux souris sauvages non contaminées tant chez les mâles (-30 % ; $p < 0,001$) que chez les femelles (-28 % ; $p < 0,001$) comme le montre la *Figure 48B*.

MALES

La partie *B1)* représente l'activité de la GR chez les souris mâles, La contamination par l'uranium n'induit pas de perturbation de l'activité de la GR pour tous les groupes. Pour la concentration de 20 mg/L d'uranium, une diminution de 30 % est observée entre les souris sauvages et KO contaminées ($p < 0,05$).

FEMELLES

L'activité de la GR est augmentée de 25 % chez les souris femelles WT ayant ingéré une solution d'uranium à 160 mg/L par rapport aux souris sauvages non contaminées ($p < 0,01$) *(Figure 48B2)*. De même, une augmentation de 32 % est observée entre les souris contaminées à 1 mg/L et celles contaminées à 20 mg/L ($p < 0,01$). Chez les femelles KO, la contamination par l'uranium entraîne une augmentation de l'activité de la GR chez les souris contaminées par rapport aux souris non contaminées : + 27 ; 50 et 28 % pour respectivement 1, 20 et 160 mg/L ($p < 0,05$ ou 0,001).

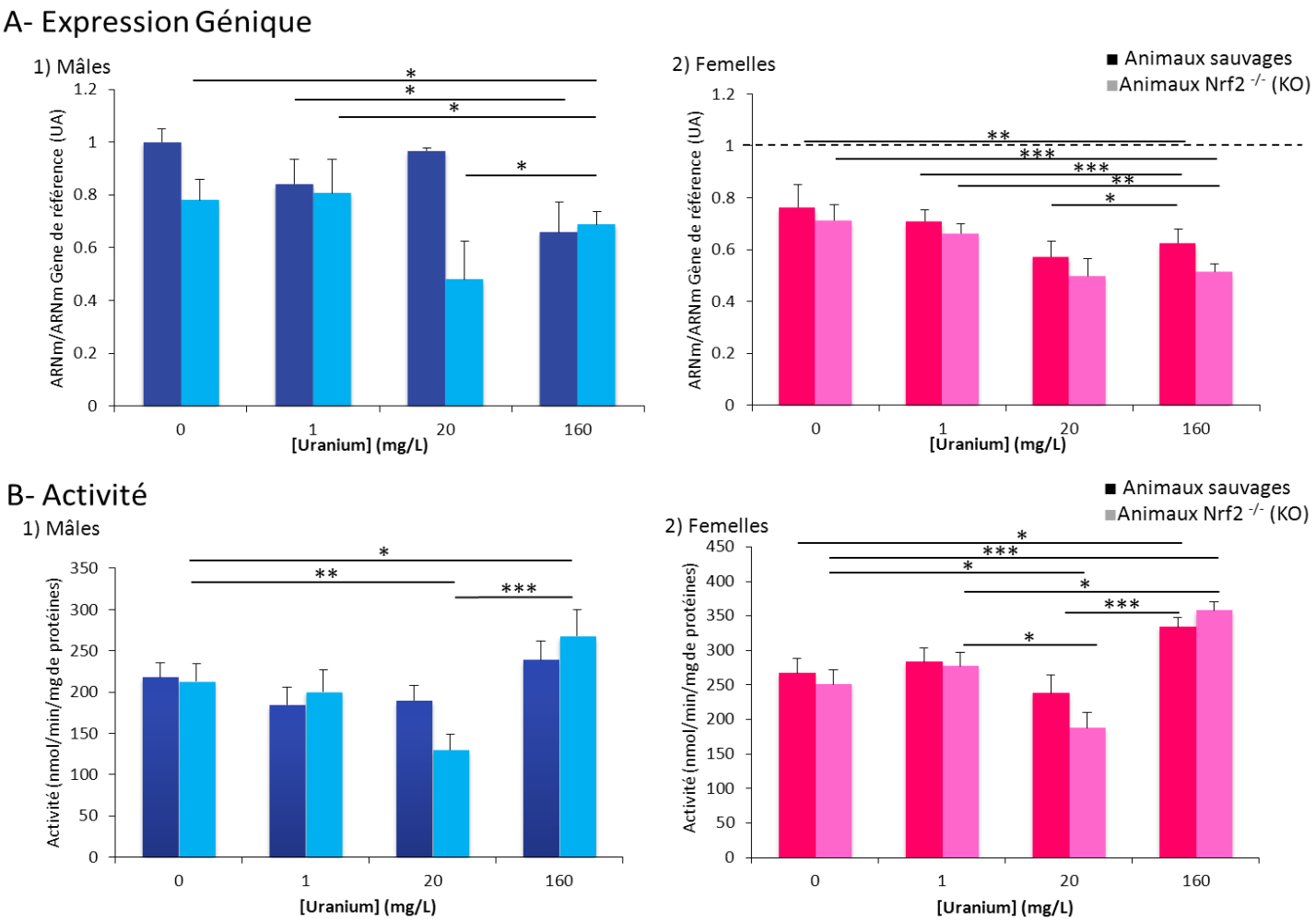

Figure 49 : Expression génique (A) et Activité(B) de la Glutathion Peroxydase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéines et l'expression génique correspond au rapport de l'ARNm du gène d'intérêt/ARNm des gènes de référence, les valeurs ayant été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes de référence codant pour l'HPRT et la GAPDH. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= p< 0,05 ; **= p< 0,01 ; ***= p< 0,001. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= p< 0,05 ; ##= p< 0,01 ; ### = p< 0,001. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

b.2 Glutathion Peroxydase

✷ Expression génique

La *Figure 49* représente les modifications de l'expression génique de la GPx pour les souris mâles (*A1*) et femelles (*A2*) après contamination à l'uranium pendant 4 mois.

Dans le cas des animaux non contaminés, l'expression génique de la GPx n'est pas modifiée entre les KO et les sauvages, les mâles et les femelles.

MALES

Sur la *Figure 49A1,* entre les souris mâles contaminées à 1 mg/L et celles contaminées à 160 mg/L, une diminution de l'expression génique de la GPx est observée chez les souris WT (- 27 % ; $p < 0,05$) et KO (- 18 % ; $p < 0,05$). L'expression génique de la GPx est diminuée de 27 % chez les souris mâles KO contaminées à 160 mg/L par rapport aux souris témoins ($p < 0,05$). Une augmentation de 47 % de l'expression génique de la GPx est observée entre les souris mâles KO contaminées à 20 et 160 mg/L d'uranium ($p < 0,05$).

FEMELLES

La contamination par l'uranium à 160 mg/L induit une diminution de l'expression génique de la GPx chez les souris femelles WT (- 38,6 % ; $p < 0,01$) et KO (- 16 % ; $p < 0,001$). De même, entre les souris contaminées à 1 et à 160 mg/L d'uranium, une diminution de 13 et de 23 % de l'expression génique de la GPx est observée respectivement pour les souris sauvages ($p < 0,001$) et KO ($p < 0,01$).

✷ Activité enzymatique

La contamination par l'uranium entraîne des perturbations de l'activité de la GPx plus importantes chez les femelles que chez les mâles ($p < 0,001$), souris KO et WT confondues. De plus, dans les deux cas, l'activité de la GPx n'est pas significativement différente entre les animaux KO et les animaux WT. Les modifications observées sont dues uniquement à la contamination par l'uranium.

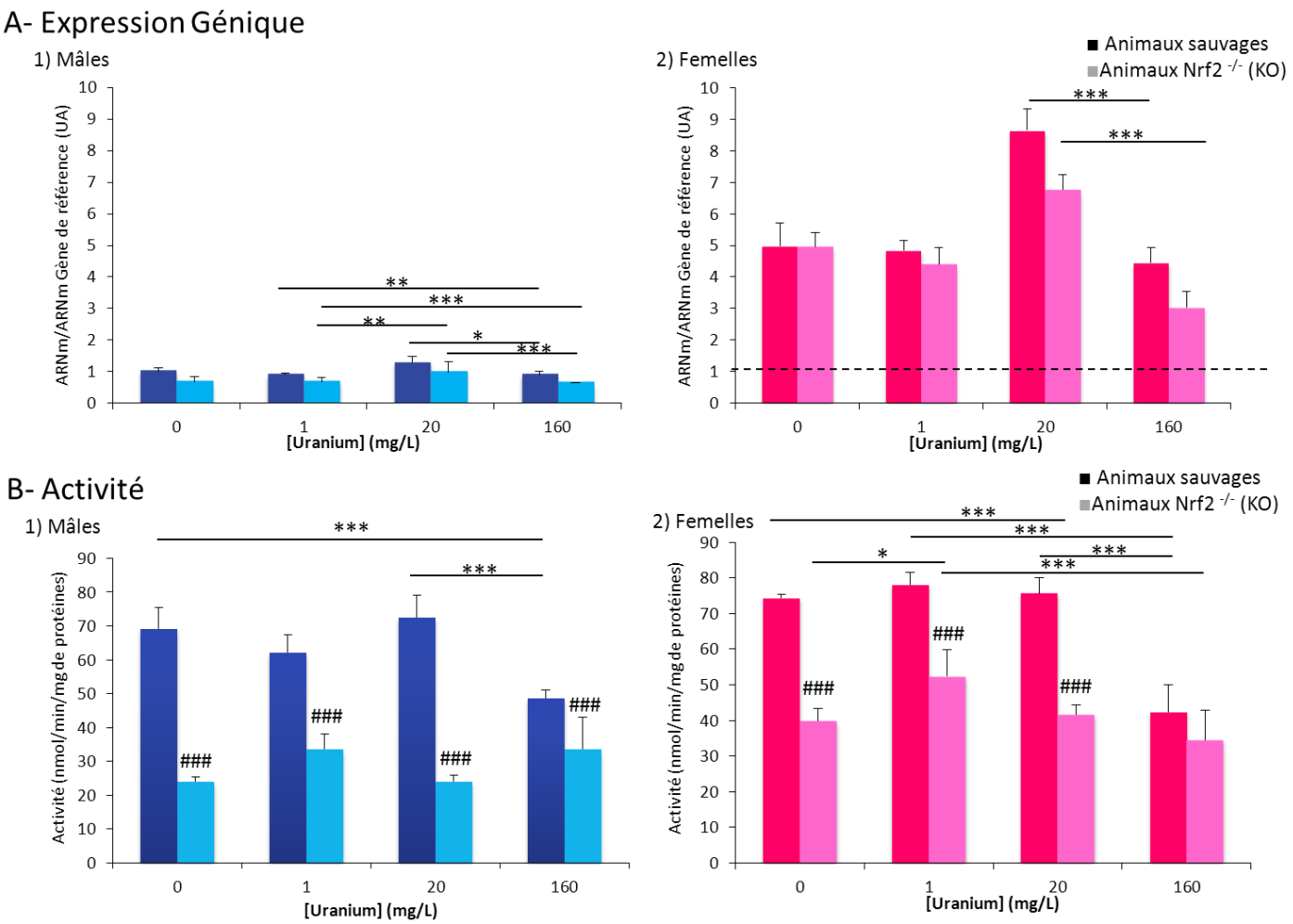

Figure 50 : Expression génique (A) et activité(B) de la Glutathion-S-Transférase chez les souris mâles (1) et femelles (2) sauvages (■) et Nrf2 $^{-/-}$ (■) contaminées pendant 4 mois à l'uranium

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéines et l'expression génique correspond au rapport de l'ARNm du gène d'intérêt/ARNm des gènes de référence, les valeurs ayant été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes de référence codant pour l'HPRT et la GAPDH. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

MALES

Les analyses réalisées chez les souris mâles montrent que l'uranium induit des modifications de l'activité de la GPx uniquement chez les souris KO (*Figure 49B1*). En effet, l'activité de la GPx est diminuée pour les souris ayant reçu une solution d'uranium à 20 mg/L (-61 %, $p < 0,01$) et augmentée chez celles qui ont été contaminées par une solution à 160 mg/L (+26 %, $p < 0,05$). Entre ces deux groupes, l'activité de la GPx est multipliée par 2 ($p < 0,001$).

FEMELLES

Sur la *Figure 49B2),* chez les femelles sauvages, une augmentation de 25 % de l'activité de la GPx est observée entre les souris contaminées par une solution d'uranium à 160 mg/L ($p < 0,05$) et celles non contaminées. Chez les femelles KO, l'activité de la GPx est diminuée chez les souris ayant reçu une solution à 20 mg/L d'uranium par rapport aux souris témoins (- 24,5 % ; $p < 0,05$) et aux souris contaminées par une solution à 1 mg/L d'uranium (-32,5 % ; $p < 0,05$).

A l'inverse, l'uranium induit une augmentation de l'activité de la GPx chez les souris ayant ingéré la plus forte concentration d'uranium (160 mg/L) par rapport aux souris non contaminées (x 1,4 ; $p < 0,001$) et aux souris contaminées à 1 mg/L (x 1,3 ; $p < 0,05$).

b.3 Glutathion-S-Transférase

✷ Expression génique

L'expression génique de la GST *(Figure 50A)* est augmentée chez les souris femelles par rapport aux souris mâles indépendamment du génotype et de la contamination ($p < 0,001$). En effet, pour les souris femelles, l'expression génique de la GST est comprise entre 4 et 8 fois celle des mâles. Dans le cas des souris non contaminées, aucune différence n'est observée entre les souris WT et KO.

MALES

Pour les souris mâles, l'expression génique de la GST est augmentée entre les souris WT contaminées à 1 mg/L et celles contaminées à 160 mg/L (+ 10 % ; $p < 0,01$) alors que chez les souris KO une diminution de 5 % est observée dans des conditions analogues ($p < 0,001$).

De même, une diminution de l'expression génique de la GST est observée entre les souris mâles contaminées à 20 et 160 mg/L d'uranium chez les animaux WT (- 29 % ; $p < 0,05$) et KO (- 36 % ; $p < 0,001$) par rapport aux souris contaminées à 1 mg/L. Entre les souris males KO contaminées à 1 et 20 mg/L, l'expression génique de la GST diminue de 48 % ; $p < 0,01$).

FEMELLES

Pour les souris femelles, une diminution de l'expression génique de la GST est observée entre les souris contaminées à 20 et 160 mg/L qu'elles soient sauvages (-49 % ; $p < 0,001$) ou KO (- 55,4 % ; $p < 0,001$) ; pour la concentration de 160 mg/L, le taux d'expression génique est équivalent à celui des souris non contaminées.

✷ Activité enzymatique

La *Figure 50B* représente l'activité de la GST chez les souris mâles (*B1*) et chez les souris femelles (*B2*) en fonction de la concentration en uranium.

MALES

Chez les souris mâles, l'activité de la GST est diminuée chez les souris KO par rapport au souris WT quelle que soit la concentration en uranium considérée ($p < 0,001$). En effet, l'activité de la GST est respectivement divisée par 3 ; 2 ; 3 ; 1,5 chez les animaux témoins ou contaminés à 1, 20 et 160 mg/L.

L'uranium entraîne une diminution de l'activité de la GST uniquement chez les souris mâles WT. Ainsi, l'activité est diminuée de 30 % entre les souris contaminées à la plus forte concentration d'uranium (160 mg/L) et les souris non contaminées ($p < 0,001$). De même, l'activité est diminuée de façon similaire entre les groupes 160 et 20 mg/L.

FEMELLES

L'activité de la GST est diminuée chez les souris femelles KO par rapport aux souris sauvages pour trois concentrations en uranium : 0 (témoins), 1 et 20 mg/L ($p < 0,001$). L'activité de la GST est divisée par 1,6 entre les souris sauvages et les souris KO.

Chez les souris femelles WT, la contamination par l'uranium conduit à une diminution de l'activité de la GST chez les souris ayant ingéré la plus forte concentration d'uranium (160 mg/L) par rapport aux groupes témoins (-43 % ; $p < 0,001$), 1 mg/L (- 45,7 % ; $p < 0,001$) et 20 mg/L (-44 %, $p < 0,001$).

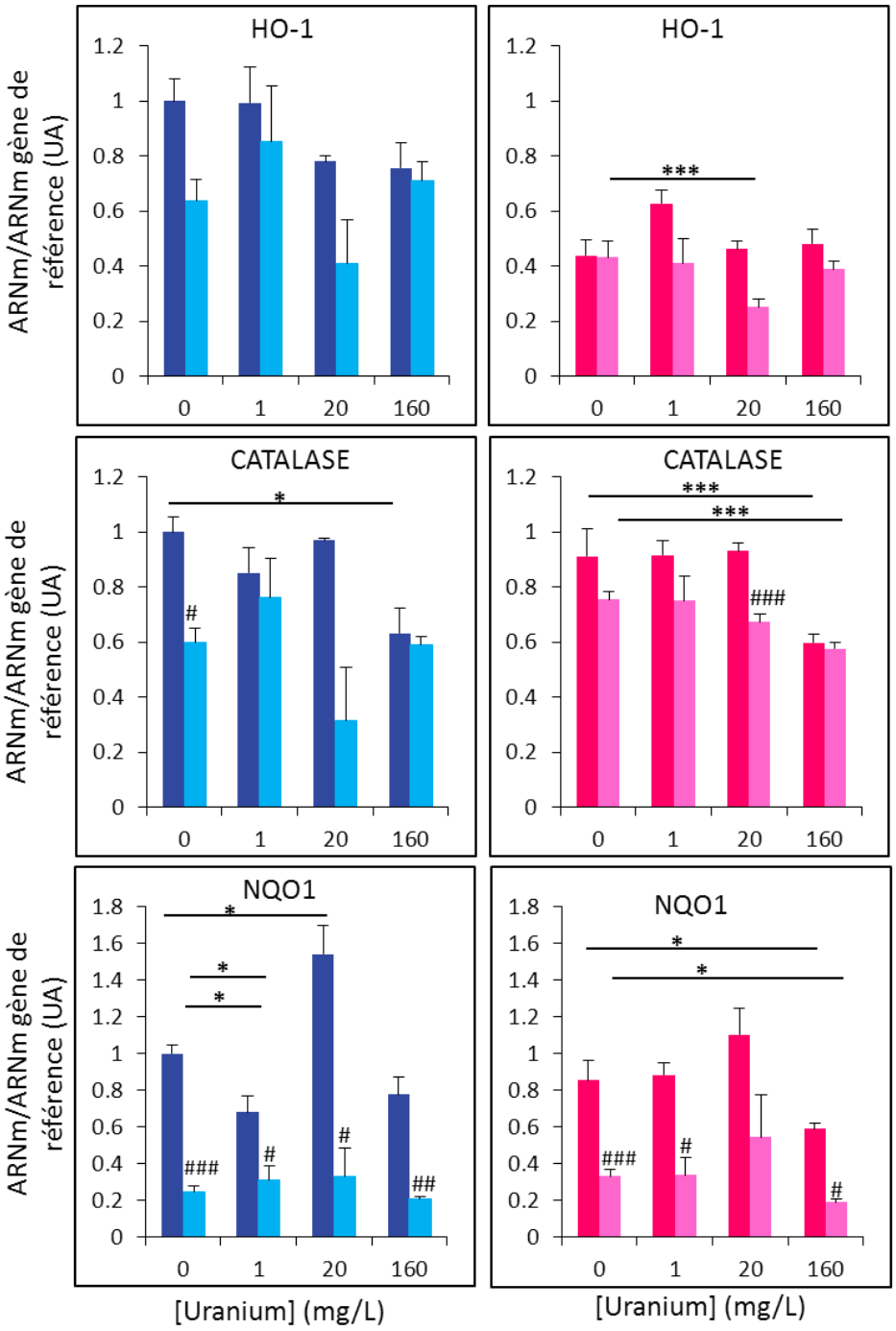

Figure 51 : Mesure de l'expression génique de la HO-1 (A), la catalase (B) et de NQO1 (C) dans le rein après 4 mois de contamination par l'uranium chez les souris mâles et femelles sauvages (■) ou Nrf2 $^{-/-}$ (■)

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes codant pour deux gènes de référence : l'HPRT et la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2). HO-1 : Hème Oxygénase-1 ; NQO1 : NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1.

Chez les souris femelles KO, une augmentation de l'activité de la GST de 31 % est observée suite à une contamination par l'uranium à 1 mg/L ($p < 0,05$) ; alors qu'une diminution de 34 % est observée entre les groupes 1 et 160 mg/L.

b.4 Expression génique d'autres enzymes anti-oxydantes

Les résultats présentés dans cette partie regroupent l'expression génique de cinq gènes codants pour des enzymes anti-oxydantes : NQO1, HO-1, SOD1 et 2, et CAT *(Figure 51 Figure 52)*. Par souci de clarté, seules les modifications par rapport au groupe non contaminé (0 mg/L), KO ou sauvage, sont représentées ainsi que les différences entre les animaux KO et sauvages pour chaque concentration d'uranium.

HO-1 : L'expression génique de HO-1 est diminuée de 42 % pour les femelles KO contaminées à 20 mg/L ($p < 0,001$) *(Figure 51A)*.

CATALASE : Dans le cas des souris mâles, une diminution de 41 % de l'expression génique de la catalase est observée entre les souris sauvages et KO non contaminées ($p < 0,05$) *(Figure 51B)*. De plus, chez les souris mâles WT, la contamination par l'uranium à 160 mg/L entraîne une diminution de l'expression génique de la catalase (-37 % ; $p < 0,05$).

Chez les femelles contaminées à 20 mg/L, une diminution de 28 % ($p < 0,001$) est observée entre les femelles sauvages et KO. L'expression génique de la CAT est diminuée de 34,5 et 23,6 % après contamination à 160 mg/L d'uranium pour les femelles WT et KO respectivement ($p < 0,001$).

NQO1 : L'expression génique de NQO1 est différente entre les animaux WT et KO indépendamment de la concentration en uranium ($p < 0,001$) *(Figure 51C)*.

Pour les souris mâles, une diminution de 76 ; 54 ; 79 et de 65 % est observée entre les souris mâles WT et KO pour les groupes témoins ($p < 0,001$) et les groupes contaminés à 1, ($p < 0,05$), 20 ($p < 0,05$) et 160 ($p < 0,01$) mg/L respectivement. De même, une diminution de l'expression génique de NQO1 est observée entre les souris WT et KO pour les groupes 0 (-61,2 % ; $p < 0,001$), 1 (-61,4 % $p < 0,05$) et 160 mg/L (-67,9 % ; $p < 0,05$).

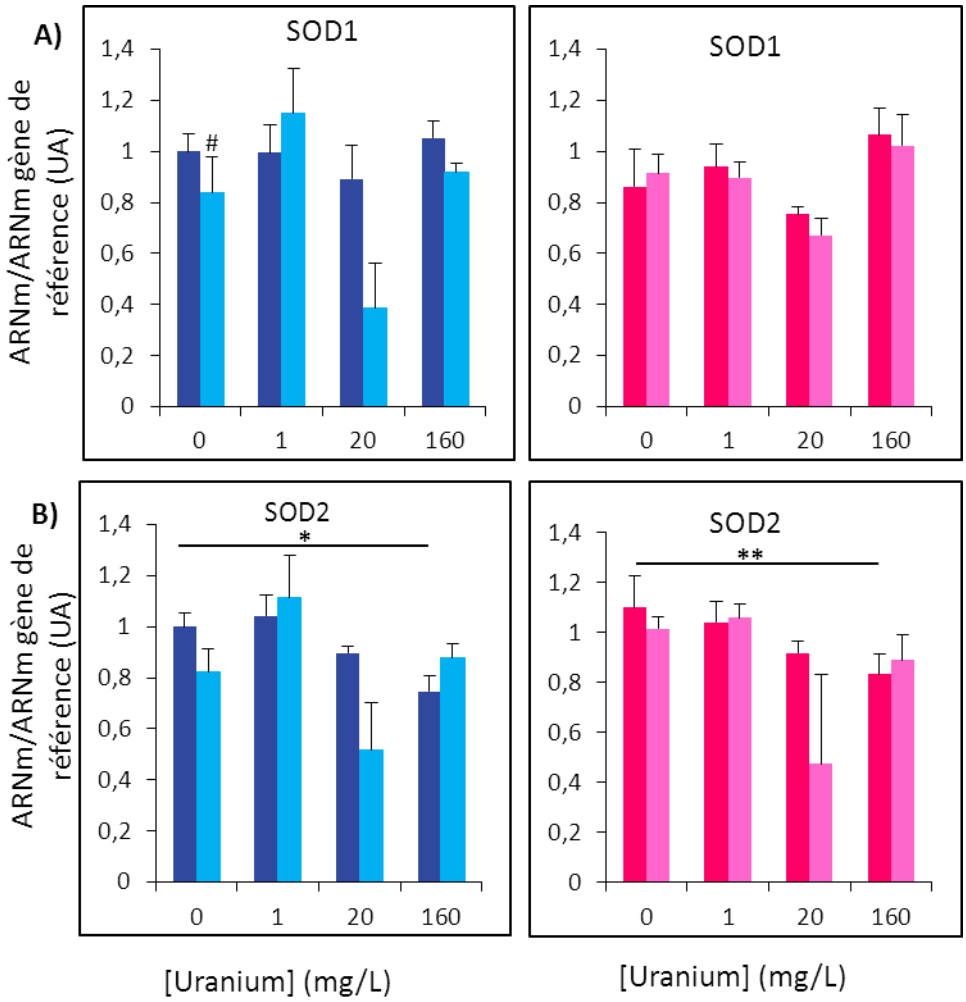

Figure 52 : Mesure de l'expression génique des superoxydes disumutases dans le rein après 4 mois de contamination par l'uranium chez les souris mâles et femelles sauvages (■) ou Nrf2 $^{-/-}$ (■)

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression de la moyenne géométrique des taux d'expression de deux gènes codant pour deux gènes de référence : l'HPRT et la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne. La représentation d'une différence entre les animaux contaminés (1, 20 ou 160 mg/L) ou non (0) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. La représentation d'une différence entre les animaux KO et sauvage est significative pour #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ### = $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un test ANOVA à deux paramètres (les deux paramètres sont la concentration en uranium et l'inactivation ou non de Nrf2).

SOD1 : Cuivre, Zinc Superoxyde dismutase ; SOD2 : Manganèse Superoxyde Dismutase.

L'expression génique de NQO1 est diminuée de 32 % entre les souris sauvages contaminées à 1 mg/L d'uranium et les souris sauvages non contaminées ($p < 0,05$), alors qu'elle est augmentée de 26 % entre les souris contaminées à 1 et celles contaminées 20 mg/L d'uranium ($p < 0,05$).

Chez les souris femelles, une diminution de l'expression génique de NQO1 est observée après contamination à 160 mg/L d'uranium tant chez souris sauvages (-31 % ; $p < 0,05$) que chez les souris KO (-43 % ; $p < 0,05$).

SOD1 : L'analyse de l'expression génique de la SOD1 montre simplement une diminution entre les mâles KO et WT non contaminés (-17 % ; $p < 0,05$), aucune modification n'étant observée chez les femelles *(Figure 52A)*.

SOD2 : L'expression génique de la SOD2 n'est pas différente entre les souris KO et WT *(Figure 52B)*. L'expression génique de la SOD2 est diminuée entre les animaux sauvages contaminés à 160 mg/L et les animaux sauvages non contaminés tant chez les mâles (-26 % ; $p < 0,05$) que chez les femelles (-22,5 % ; $p < 0,01$).

La *Figure 53* résume les résultats obtenus.

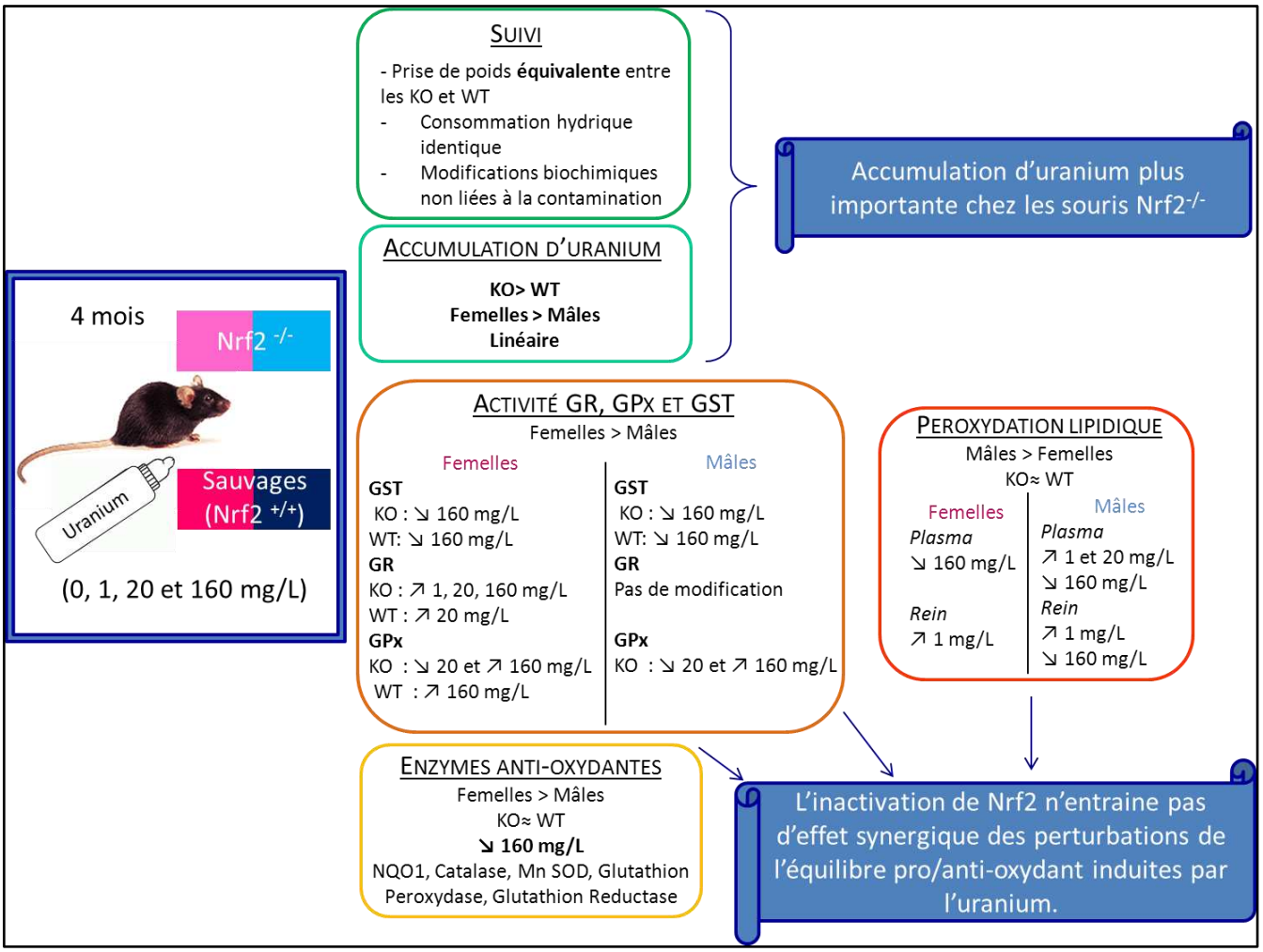

Figure 53 : Résumé des résultats obtenus dans le cas d'une contamination pendant 4 mois à l'uranium chez des souris sauvages et Nrf2$^{-/-}$

C. Analyse des résultats

Ces résultats ont permis pour la première fois de décrire le système anti-oxydant au niveau rénal chez un modèle KO Nrf2 dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium chez des souris mâles et femelles ayant été exposées pendant 4 mois à différentes concentrations d'uranium (1, 20 et 160 mg/L).

Tout d'abord, le suivi longitudinal des animaux a montré que la présence d'uranium dans l'eau de boisson quelle que soit sa concentration n'a pas conséquence sur la prise de poids des souris. En effet, à l'instar des résultats observés pour les rats, les souris prennent normalement du poids quel que soit le groupe considéré. De plus, les souris KO (mâles ou femelles) ne présentent pas de variation significative de poids par rapport aux souris WT. Nos résultats suggèrent ainsi que l'inactivation de Nrf2 n'a pas de répercussion sur le comportement alimentaire des animaux.
Par ailleurs, les prélèvements urinaires réalisés tous les mois montrent que la contamination par l'uranium n'altère pas la fonction rénale. En effet, les variations des paramètres de biochimie clinique observées apparaissent soit au cours du temps, notamment pour le glucose urinaire, soit en raison de l'inactivation ou non de Nrf2. Ainsi, chez les souris sauvages, une augmentation du taux de protéines urinaires est observée par rapport aux souris KO et ce indépendamment du temps d'exposition alors que le taux d'acide urique urinaire (résultat non montré) est, dans les mêmes conditions, diminuée chez les souris WT par rapport aux souris KO. Afin de compléter les analyses urinaires, des mesures de paramètres biochimiques plasmatiques telles que la créatine et l'urée sont envisagées pour les groupes étudiés ainsi que les analyses biochimiques urinaires sur les souris contaminées à 1 et 20 mg/L.

La quantification d'uranium par ICP-MS dans le foie, le rein et le fémur pour les quatre groupes (souris sauvages mâles et femelles, souris $Nrf2^{-/-}$ mâles et femelles) confirme que l'uranium s'accumule de façon linéaire croissante dans les organes quel que soit le groupe considéré.

Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits par Taulan *et al.* au niveau rénal chez des souris mâles WT contaminées à 80 et 160 mg/L d'uranium pendant 4 mois (Taulan *et al.* 2004) où la quantité d'uranium mesurée dans les reins est de 1 µg/g de rein chez les souris mâles contaminées à 160 mg/L, valeur similaire à celle observée dans notre étude dans des conditions expérimentales analogues (1,1 µg/g de rein). Nos résultats permettent ainsi de confirmer et de compléter les mesures d'accumulation d'uranium dans le rein chez des souris WT mâles contaminées.

En revanche, les mesures réalisées chez les souris WT femelles ainsi que chez les souris KO mâles et femelles étaient inconnues et apportent donc de nouvelles connaissances quant à l'accumulation d'uranium après exposition chronique chez la souris. En effet, nos résultats montrent que chez les animaux WT et KO, l'accumulation d'uranium dans les tissus est supérieure chez les femelles par rapport aux mâles. A ce jour, aucune étude n'avait observé cette différence d'accumulation pour une autre substance. Par ailleurs, les animaux KO mâles et femelles accumulent plus d'uranium que les animaux WT au niveau hépatique et rénal et dans l'os. Dans les reins, après 4 mois de contamination à une solution de 160 mg/L, la quantité d'uranium mesurée dans les reins pour les animaux KO est supérieure à 2 µg d'uranium par gramme d'organe contre 1,5 µg d'uranium par gramme de rein chez les souris WT.

De plus, une différence d'accumulation est observée entre les femelles ou les mâles KO par rapport aux femelles ou aux mâles sauvages. Ainsi, chez les souris Nrf2$^{-/-}$, après contamination par une solution de 160 mg/L d'uranium pendant 4 mois, la quantité d'uranium mesurée dans le rein chez la femelle est 1,8 fois supérieure à celle mesurée chez la femelle WT et 1,9 supérieure pour les mâles.

Cette accumulation d'uranium plus importante chez les animaux KO par rapport aux animaux WT est surprenante bien que déjà décrite dans le foie en cas d'exposition au mercure (5 mg/kg/j, intubation orale, 8 jours) (Toyama *et al.* 2011), et suggèrerait qu'une altération du système pro/anti-oxydant chez les souris KO jouerait un rôle dans l'accumulation tissulaire accrue d'uranium.

Le système pro-oxydant a été caractérisé par la mesure de la peroxydation lipidique au niveau plasmatique et rénal. Le taux de peroxydation lipidique est d'avantage modifié chez les mâles que chez les femelles suite à une contamination par l'uranium. En revanche, l'inactivation de Nrf2 n'entraîne pas d'aggravation de la peroxydation lipidique plasmatique. Ce résultat a déjà été observé au niveau rénal 24 heures après injection IP de 3 mg/kg d'acétate nitrique ferrique (Kanki *et al.* 2008). La contamination par l'uranium à 20 mg/L induit une augmentation des TBARS chez tous les animaux alors qu'une diminution de la peroxydation lipidique n'est observée que chez les animaux contaminés à 160 mg/L d'uranium. Au niveau rénal, le taux de TBARS est modifié principalement chez les souris males sauvages : la peroxydation lipidique augmente à 1 et 20 mg/L alors qu'elle diminue à 160 mg/L.

L'expression génique des enzymes anti-oxydantes évaluée au niveau rénal suggère que la contamination par l'uranium (uniquement à 160 mg/L) conduit à une diminution de l'expression de ces gènes tant chez les femelles KO que WT. L'expression génique de NQO1 est diminuée chez les mâles KO par rapport aux mâles WT. De même, l'activité de la GST est inférieure chez les souris femelles KO par rapport aux souris femelles sauvages et ce quel que soit le groupe considéré. Ces différences de génotype sont caractéristiques de ces souris KO, la transcription de NQO1 et GST étant fortement dépendante de Nrf2 (Aleksunes *et al.* 2010 ; Motohashi *et al.* 2004 ; Tanaka *et al.* 2008).

Parmi les activités des enzymes anti-oxydantes mesurées dans le rein, la contamination par l'uranium induit une diminution de l'activité de la GST chez les souris femelles (KO et WT) contaminées à 20 et 160 mg/L par rapport aux souris contaminées à 1 mg/L. De même chez les souris mâles, la contamination par l'uranium induit une diminution de l'activité de la GST suite à la contamination. L'inactivation de Nrf2 n'entraîne pas d'effet synergique ou additionnel des effets de l'uranium sur l'activité de la GST.

En revanche, la contamination par l'uranium modifie l'activité de la GR uniquement chez les souris femelles en induisant une augmentation dès 1 mg/L pour les souris femelles KO.

Enfin, la dernière enzyme évaluée, la GPx, voit son activité augmentée suite à une contamination par l'uranium chez les souris KO mâles et femelles à une concentration de 160 mg/L, des modifications ponctuelles étant observées pour les souris sauvages. L'activité de la GR et de la GPx étant augmentée, il serait intéressant de mesurer le taux de GSH et GSSG afin de déterminer si ces augmentations ont des conséquences sur le métabolisme du glutathion.
La contamination par l'uranium conduit donc à des variations qui diffèrent en fonction de la concentration en uranium, du sexe et du génotype de l'animal. Ainsi l'activité des enzymes anti-oxydantes est plus sensible à la contamination par l'uranium chez les souris femelles alors que le taux de TBARS est plus fortement perturbé suite à une contamination chronique par l'uranium chez les souris mâles.

En cas d'inactivation de Nrf2, les souris accumulent plus d'uranium que les souris WT mais les analyses ne semblent pas indiquer de modifications des paramètres généraux (poids, analyses urinaires) plus importants chez les souris Nrf2 $^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages suite à la contamination par l'uranium. De même, l'étude du système pro/anti-oxydant chez les souris KO n'a pas montré de potentialisation des effets liées à la contamination par l'uranium par rapport aux animaux sauvages, bien que que les souris KO accumulent plus d'uranium que les souris WT. Afin d'approfondir ces résultats et de pouvoir les comparer avec ceux réalisés chez le rat, il sera intéressant d'une part, d'étudier le métabolisme du glutathion, et d'autre part, de réaliser ces analyses au niveau hépatique étant donné que des études sur le foie ont été réalisées chez le rat. De plus, une étude des effets de l'uranium sur le système pro/anti-oxydant d'une lignée de cellules hépatiques a donc été mis en place.

III. Etude des effets de l'uranium sur le système pro/anti-oxydant sur une lignée de cellules hépatiques

A. Contexte

Les résultats *in vivo* précédemment exposés ont montré que dans le cas d'une contamination chronique, l'uranium induit des perturbations de l'équilibre pro/anti-oxydant sans pour autant entraîner de néphrotoxicité ou d'hépatotoxicité. Les études *in vitro* ont également mis en évidence un effet de l'uranium sur cet équilibre (Periyakaruppan *et al.* 2007 ; Pourahmad *et al.* 2006 ; Thiebault *et al.* 2007) mais aussi sur l'apoptose (Periyakaruppan *et al.* 2009 ; Thiebault *et al.* 2007) ou encore la formation de dommages à l'ADN (Miller *et al.* 2003 ; Miller *et al.* 2002a ; Miller *et al.* 2002b) sans pour autant apporter d'explication aux effets non toxiques observés *in vivo*. En effet, ces études *in vitro* ont souvent été faites après exposition à de fortes concentrations (500-1000 µM) d'uranium et à un temps donné. Parallèlement à ces travaux, des études ont mis en évidence par des techniques de microscopie électronique (MET) la présence de précipités d'uranium intracellulaires après 24 heures d'exposition à des concentrations d'uranium de 400 à 1000 µM (Carrière *et al.* 2005 ; Milgram *et al.* 2008a ; Mirto *et al.* 1999b). Au laboratoire, de récents travaux ont montré, grâce à la technique d'imagerie SIMS, que l'uranium était présent dans la cellule sous forme soluble dans le noyau à des concentrations inférieures à 50 µM après 24 heures d'exposition (Rouas *et al.* 2010). Ainsi, la présence d'uranium soluble dans la cellule suscite donc des interrogations quant aux effets éventuels de l'uranium à ces faibles concentrations et des mécanismes qui permettrait d'expliquer les résultats des études *in vivo*.

C'est pourquoi, en complément des analyses réalisées chez l'animal et afin d'approfondir les connaissances mécanistiques de l'uranium sur le système pro/anti-oxydant, nous avons réalisé une cinétique de contamination de cellules en culture par l'uranium pour déterminer à partir de quel temps et de quelle concentration le système pro/anti-oxydant est activé. De plus, pour comparer les effets de l'uranium à ceux de substances dont le mécanisme d'action est plus documenté, les cellules ont également été traitées par des substances connues comme induisant un stress oxydant (Cadmium, H_2O_2) ou inductrices de Nrf2 (Sulforaphane (SFN)).

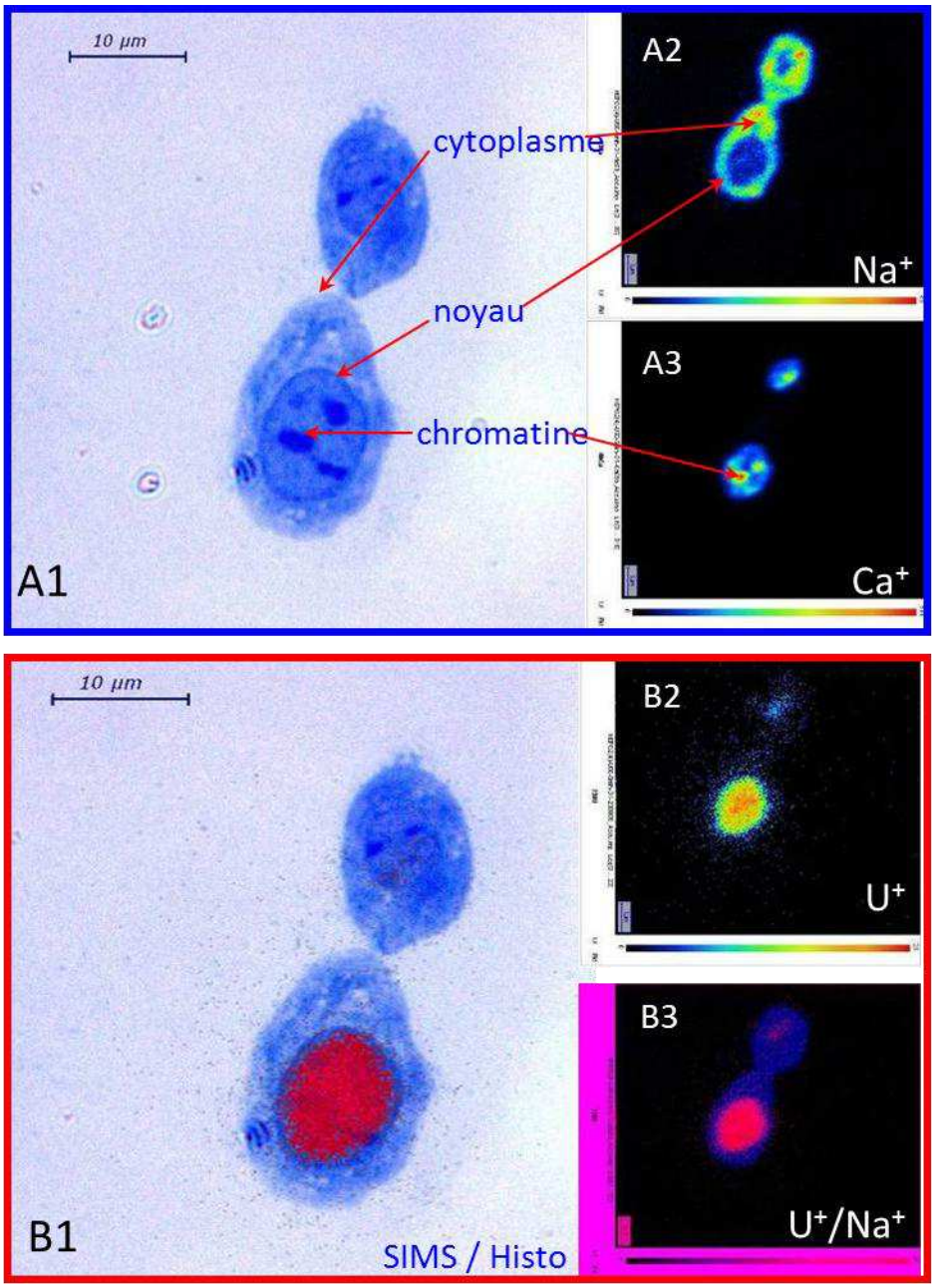

Figure 54 : Observations microscopiques et SIMS d'une cellule hépatique après exposition pendant 5 minutes à 50 µM d'uranium avec la mise en évidence d'une forme « soluble » de l'uranium avec localisation préférentiellement nucléaire

L'image (A) est constituée d'un ensemble de 3 images : l'image A1 correspond à un marquage histologique au bleu de toluidine, les images Sodium (Na^+, image A2) et Calcium (Ca^+, image A3) sont obtenues en SIMS.

L'image (B) comprend 3 images : l'image B1 représente correspond à une superposition de l'image A1 et B2, l'image B2 représente l'image SIMS de l'uranium 238 et l'image B3 la superposition des images A2 et B2.

La mort cellulaire et l'apoptose ont aussi été étudiées afin de décrire après exposition à l'uranium les concentrations et le temps à partir desquels les effets sur l'équilibre pro/anti-oxydant et ceux sur la mort cellulaire s'articulent les uns par rapport aux autres. Les études de localisation de l'uranium par SIMS ont été poursuivies afin d'essayer de corréler ces analyses biologiques à la distribution cellulaire de l'uranium (noyau *versus* cytoplasme) et la formation de précipités d'uranium en fonction du temps.

Pour ce faire, un modèle de cellules hépatiques, HepG2 a été utilisé en raison d'une part des études *in vitro* réalisées sur un modèle hépatique lors d'exposition à l'uranium (Miller *et al.* 2004 ; Pourahmad *et al.* 2006 ; Pourahmad *et al.* 2011 ; Rouas *et al.* 2010) et d'autre part de son utilisation comme modèle de référence en toxicologie notamment dans l'étude du système pro/anti-oxydant en cas d'exposition à différentes substances (médicaments, métaux lourds) (Lawal *et al.* 2010 ; Park *et al.* 2013 ; Thakor *et al.* 2011).

Dans notre étude, ces cellules ont été exposées à différentes concentrations d'uranium (10 à 1000 µM) en comparaison à d'autres substances pro ou anti-oxydantes (Cadmium ou eau oxygénée et SFN respectivement) pendant des temps d'exposition allant de 15 minutes à 24 heures. A titre de comparaison, et en admettant que la masse de milieu de culture est équivalente à la masse de tissu chez les animaux contaminés, une solution à 10 µM d'uranium correspond à 2,3 µg d'uranium par gramme de milieu de culture.

B. Résultats

1. Localisation de l'uranium

Les résultats présentés dans ce paragraphe ont été obtenus grâce à une collaboration interne avec le laboratoire de Radiochimie de l'IRSN.

La *Figure 54* représente une cellule isolée contaminée à l'uranium observée en microscopie optique et ionique (SIMS). Sur la figure A, l'image *A1* obtenue après coloration histologique au bleu de Toluidine est présentée afin de visualiser la structure de la cellule. Les images sodium (Na^+) (*A2*) et calcium (Ca^+) (*A3*) obtenues par le SIMS correspondent respectivement au cytoplasme et au noyau du fait de la répartition hétérogène de ces électrolytes dans la cellule. La partie B de la figure concerne la localisation cellulaire de l'uranium (*B2*). En effet, la superposition de l'image sodium et uranium (*B3*) montre que l'uranium (en rouge) est majoritairement présent dans le noyau de la cellule.

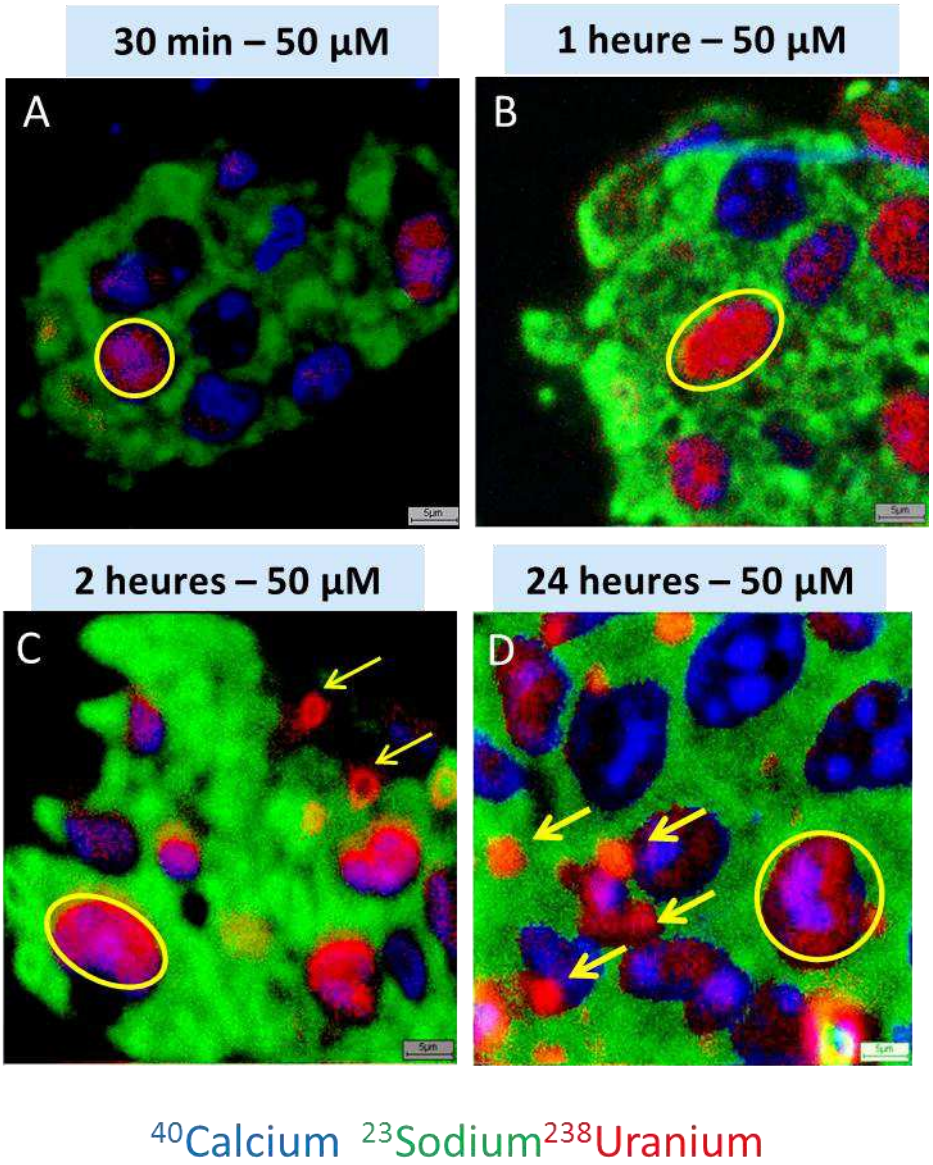

Figure 55 : Cinétique d'une contamination à l'uranium à 50 µM pendant 24 heures sur des cellules HepG2 par la technique d'image SIMS

Sur l'image A, soit après 30 minutes d'exposition, l'uranium est présent dans le noyau des cellules sous forme soluble comme le montre le cercle jaune.

Après 1 heure d'exposition (photo B), l'uranium est toujours présent dans le noyau des cellules.

La photo C montre qu'après 2 heures d'exposition, l'uranium est dans le noyau des cellules (rond jaune) et des précipités d'uranium (flèches jaunes) commencent à apparaitre. L'uranium est présent sous deux formes : soluble et précipitée.

Enfin, après 24 heures d'exposition (photo D), le nombre de précipités a augmenté et l'uranium est aussi dans les noyaux des cellules.

La superposition de l'image obtenue en SIMS et de celle du marquage histologique montre la localisation de l'uranium dans le noyau et l'absence de précipités dans le cytoplasme.

Suite aux travaux de Rouas *et al.* qui a décrit précédemment la présence d'uranium sous ces deux formes (soluble au niveau nucléaire et précipités au niveau cytoplasmique) dans des cellules en culture dont HepG2 pour des concentrations non cytotoxiques et après 24 heures d'exposition (Rouas 2010 ; Rouas *et al.* 2010), nous avons réalisé une cinétique de contamination, présentée sur la *Figure 55*, afin d'étudier à partir de quel temps l'uranium entre dans la cellule et quand apparaissent ces précipités.

Les cellules HepG2 ont donc été exposées pendant 30 minutes, 1, 2 et 24 heures d'exposition à une solution d'uranium à 50 µM. Les quatre images présentées sont le résultat de la superposition pour chaque temps des images sodium, calcium et uranium qui permettent ainsi de visualiser la localisation de l'uranium (en rouge) dans les cellules.

Après 30 minutes d'exposition (*A*), l'uranium est présent uniquement dans certains noyaux des cellules et il n'y a pas de précipités dans le cytoplasme.

Une heure après le début de la contamination *(Figure 55B)*, l'uranium est présent dans plus de noyaux et aucun précipité ne s'est formé.

L'image *C* montre qu'après deux heures d'exposition, l'uranium est toujours localisé dans les noyaux et qu'il y a formation des précipités dans le cytoplasme.

Enfin, après 24 heures d'exposition *(Figure 55D)*, l'uranium est encore retrouvé dans le noyau des cellules et le nombre de précipités a augmenté : il est plus important qu'après 2 heures d'exposition.

2. Mort cellulaire

a. Mesure de la Lactate Déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme qui est libérée en cas de rupture de la membrane cellulaire. Son augmentation est proportionnelle à la mortalité cellulaire. Dans nos conditions expérimentales, une augmentation significative de la LDH, et donc de la mort cellulaire, est observée après 24 heures d'exposition à 500, 700 et 1000 µM d'uranium *(Figure 56)*.

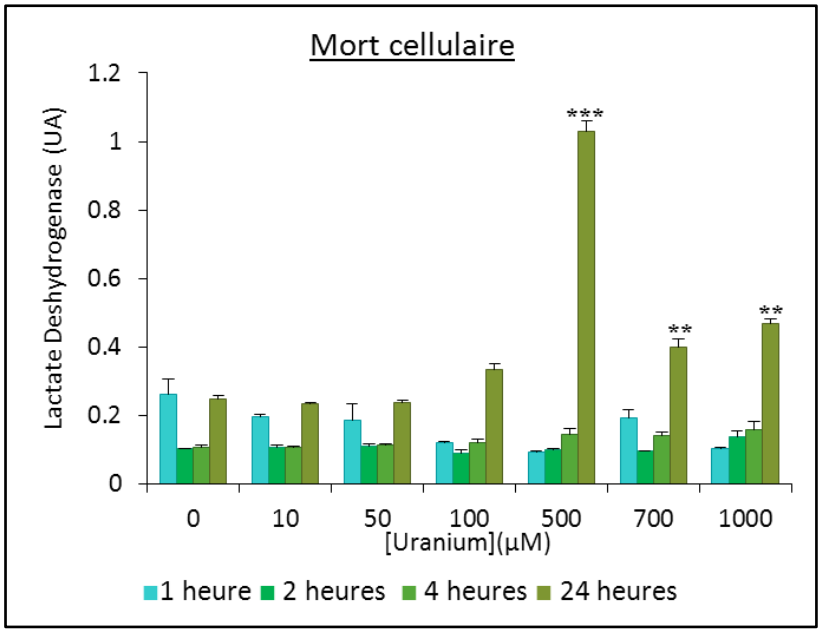

Figure 56 : Mesure de la Lactate Déshydrogénase après 1, 2, 4 et 24 heures de contamination par l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM)

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 3 par conditions). La représentation d'une différence entre les concentrations d'uranium (10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM) par rapport au témoin négatif (Bicarbonate de sodium à 10 µM) pour un temps donné (1, 2, 4 ou 24 heures) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un *test t* de Student. Le témoin négatif est le bicarbonate de sodium car l'uranium est dissout dans une solution de bicarbonate à 10 µM.

Le taux de LDH est multiplié respectivement par 41 et 16 entre les cellules exposées à une solution de 500 ($p < 0,001$) ou 700 ($p < 0,01$) µM d'UA et le témoin (cellules exposées à du bicarbonate de sodium à 10 µM pendant 24 heures). Entre ces deux concentrations, le taux de LDH diminue alors que la concentration d'uranium est plus importante : ceci pourrait être dû au fait que les cellules meurent au cours du temps sans avoir libéré de la LDH dans le milieu.

b. Apoptose

L'apoptose a été évaluée en mesurant l'expression génique de deux enzymes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bax et Bid. Elles perméabilisent la membrane mitochondriale entraînant entre autres la libération du cytochrome c (voie intrinsèque de l'apoptose).
L'activité des caspases 3 et 7 a également été mesurée. Ce sont deux caspases dites effectrices et qui induisent l'apoptose.

b.1 Expression génique de Bax et Bid

La *Figure 57* représente l'expression génique de Bax (a) et Bid (b) après exposition à l'uranium à différentes concentrations et pendant 15 et 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures.

Comme le montre la *Figure 57A*, l'expression génique de Bax augmente en fonction de la concentration en uranium. En effet, une augmentation est observée après 30 minutes (+ 53 % ; $p < 0,01$) et 4 heures (+ 400 % ; $p < 0,01$) d'exposition à une solution d'UA à 500 µM. En cas d'exposition à une solution d'UA à 700 µM, l'expression génique de Bax est augmentée dès 15 minutes (x 5 ; $p < 0,01$) puis diminue de 61% après une heure d'exposition ($p < 0,01$) et augmente de nouveau de 386 % après 4 heures de traitement ($p < 0,05$). Enfin, une exposition de 4 heures à une solution d'UA à 1000 µM conduit à une très forte augmentation de l'expression génique de Bax (x 14 ; $p < 0,05$).
Pour des concentrations inférieures à 500 µM, l'expression génique de Bax est multipliée par 5 après 4 heures d'exposition à 100 µM ($p < 0,01$) et aucune variation significative n'est observée entre 10 et 50 µM.

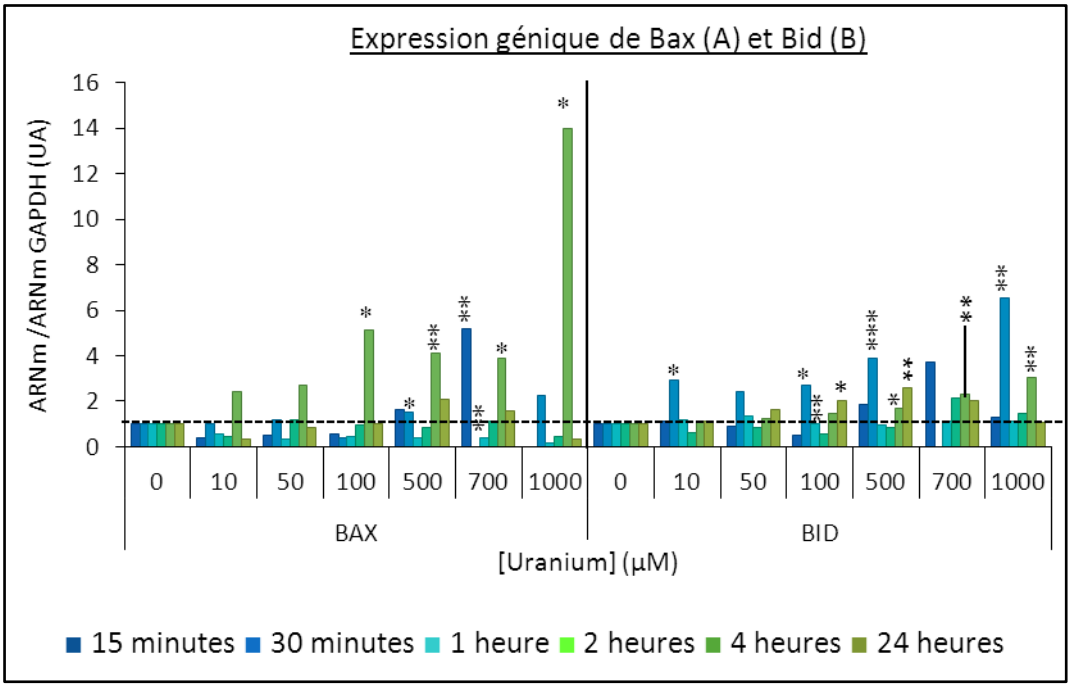

Figure 57 : Expression génique de Bax (A) et de Bid (B) après 15, 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM).

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène de référence la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 6 par conditions). La représentation d'une différence entre les concentrations d'uranium (10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM) par rapport au témoin négatif (Bicarbonate de sodium à 10 µM) pour un temps donné (15, 30 minutes, 1, 2, 4 ou 24 heures) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un *test t* de Student. Le témoin négatif est le bicarbonate de sodium car l'uranium est dissout dans une solution de bicarbonate à 10 µM.

Sur la *Figure 57B*, l'expression génique de Bid est augmentée dès 30 minutes d'exposition à une solution d'UA à 10 µM (x 3 ; $p < 0,01$) ainsi qu'à 100, 500 et 1000 µM. En effet, après 30 minutes d'exposition à une solution d'UA à 100 µM, une augmentation de plus de 200 % de l'expression génique de Bid est observée ($p < 0,05$). A ce même temps, l'expression génique de Bid est multipliée par 4 à 500 µM d'uranium ($p < 0,001$) ; mais aussi par 1,5 et 2,5 après respectivement 4 ($p < 0,05$) et 24 heures ($p < 0,01$) d'exposition à 500 µM.

L'exposition à une solution d'UA 1000 µM entraîne une augmentation de l'expression génique de Bid après 30 minutes (x 6,57 ; $p < 0,01$) et 4 heures (x 3,06 ; $p < 0,01$).

Pour ce même temps d'exposition, une augmentation de 230 % de l'expression génique de Bid est observée après exposition à une solution de 700 µM ($p < 0,01$)

En revanche, après 2 heures d'exposition à une solution de 100 µM une diminution de 46 % est observée ($p < 0,01$) pour ensuite augmenter de nouveau après 24 heures d'exposition (+ 200 % ; $p < 0,05$).

L'expression génique de ces enzymes est donc augmentée pour des concentrations en uranium inférieures à 500 µM. A partir d'une concentration à 100 µM d'UA, l'expression génique de Bax est augmentée après 4 heures d'exposition alors que celle de Bid est augmentée dès 30 minutes. Néanmoins, les augmentations les plus importantes sont observées à partir de 500 µM d'uranium.

b.2 Activité des caspases 3/7

D'après la *Figure 58*, l'activité des caspases 3/7 est augmentée de 41 % dès 4 heures d'exposition en présence d'eau oxygénée à 250 µM qui est le témoin positif. De même, après 12 et 24 heures, l'activité des caspases 3/7 est multipliée par 2,7 ($p < 0,01$) et par 4 ($p < 0,05$).

La cinétique de contamination de l'uranium révèle qu'une augmentation de l'activité des caspases 3/7 a lieu après 12 heures d'exposition à des concentrations cytotoxiques d'UA (500, 700 et 1000 µM) : l'activité des caspases 3/7 est augmentée respectivement de 264 ($p < 0,05$), 248 ($p < 0,001$) et 174 % ($p < 0,01$).

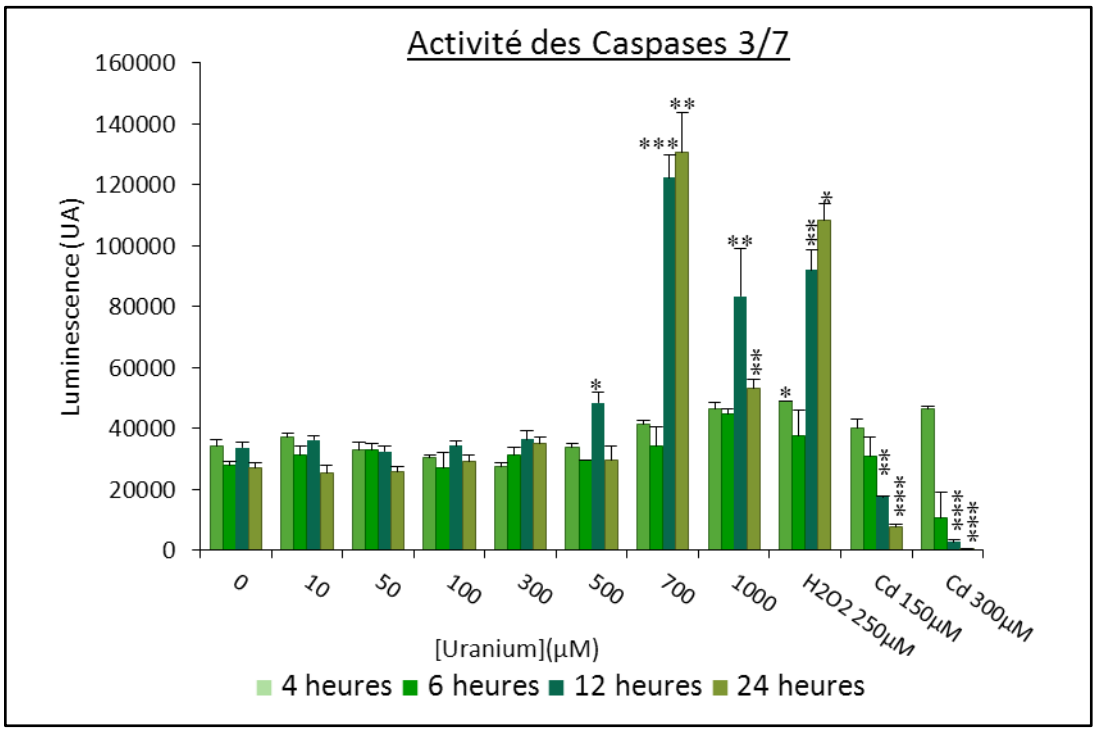

Figure 58 : Mesure de l'activité des Caspases 3/7 après 4, 6, 12 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM) ou à des inducteurs d'apoptose (H_2O_2 250 µM, Cadmium 150 et 300 µM)

Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 3 par conditions). La représentation d'une différence entre les concentrations d'uranium (10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM) ou d'inducteur par rapport au témoin négatif (Bicarbonate de sodium à 10 µM) pour un temps donné (1, 2, 4 ou 24 heures) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un *test t* de Student. Le témoin négatif est le bicarbonate de sodium car l'uranium est dissout dans une solution de bicarbonate à 10 µM.

En revanche, après 24 heures d'exposition, l'augmentation n'est observée qu'à 700 (+ 382 % ; $p < 0,01$) et 1000 µM (+ 96 % ; $p<0,01$).
En comparaison, le traitement au cadmium à150 µM et 300 µM entraîne une diminution de l'activité des caspases 3/7 observée après 12 heures (- 48,2 % ; $p < 0,01$; -71,2 % ; $p < 0,01$) et 24 heures (- 92 % ; $p < 0,01$; -99 % ; $p < 0,01$). Ceci est dû au fait que la concentration de Cd étant très importante, les cellules meurent immédiatement après exposition diminuant ainsi l'activité des caspases 3/7.

Après exposition à de fortes concentrations d'uranium (≥ 500 µM), l'expression génique des gènes pro-apoptotiques (Bax et Bid) est augmentée précocement (15-30 minutes) de façon modérée, mais devient plus importante plus tardivement (4 et 24 heures) lorsqu'une augmentation de l'activité des Caspases 3/7 est aussi observée, signe d'une entrée en apoptose.

3. Equilibre pro/anti-oxydant

a. Production d'anions superoxydes

Les cellules ont été exposées pendant 4 heures à différentes concentrations d'UA 0 à 1000 µM ou à un contrôle positif, l'eau oxygénée à 250 µM.
Dans ce derniers cas, les noyaux des cellules présentent un marquage DHE intense, spécifique d'une production importante d'$O_2^{\cdot-}$, qui permet de visualiser individuellement les noyaux les uns des autres, comme le montre la *Figure 59*.
En comparaison, sur la photographie *A*, où les cellules n'ont pas été exposées (témoin négatif), le marquage est diffus et la distinction entre les cellules est difficile.
Après 4 heures d'exposition à une solution d'UA à 100 µM (photographie *B*), la localisation nucléaire du marquage est plus visible que chez les témoins.

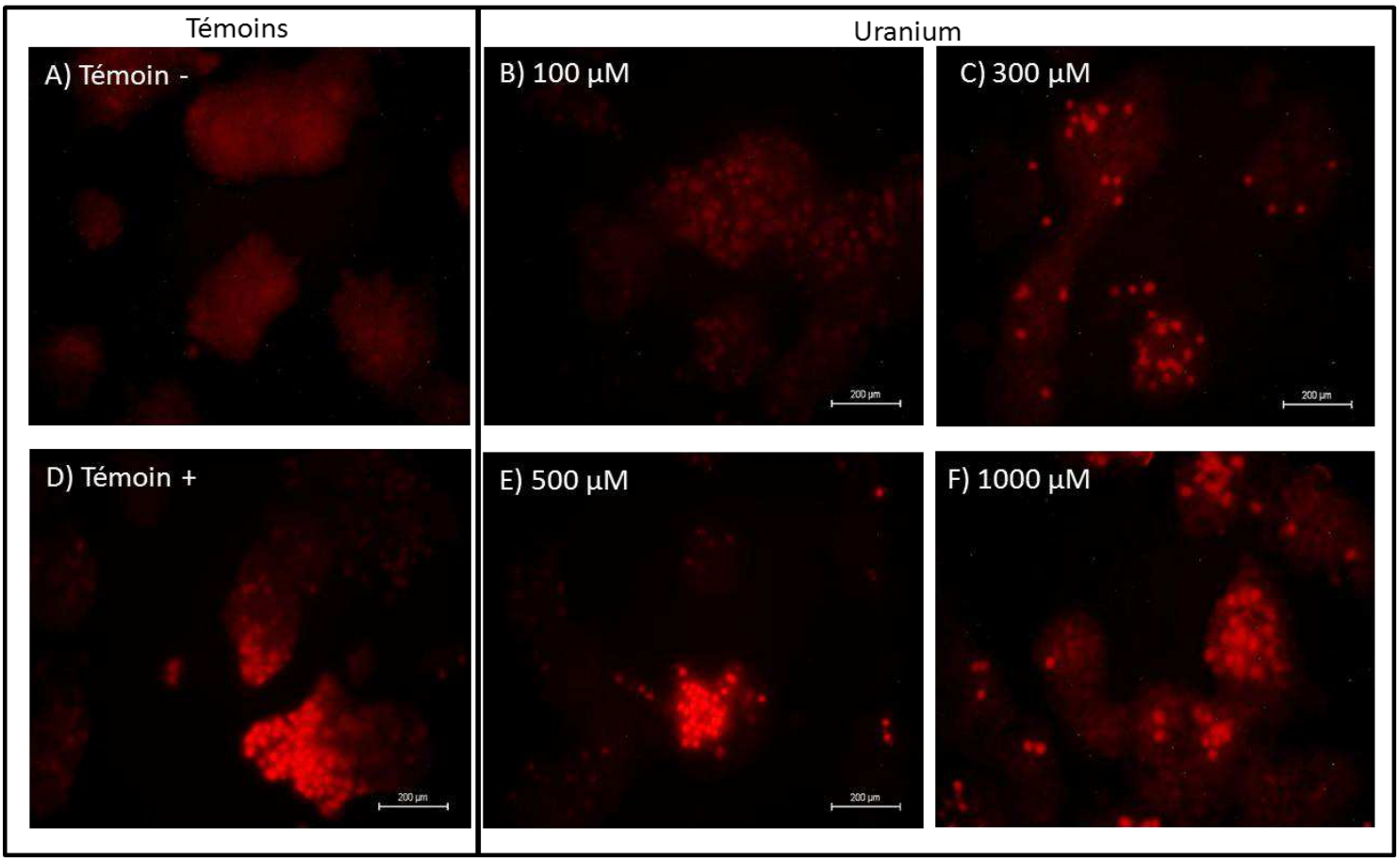

Figure 59 : Marquage des anions superoxydes par le DHE après 4 heures de traitement

Les cellules ont été traitées soit à l'uranium (100, 300, 500 et 1000 µM) soit au bicarbonate de sodium 10 µM (témoin négatif) soit à l'eau oxygénée 250 µM (témoin positif). Le marquage s'intensifie proportionnellement à l'augmentation de la production d'$O_2^{\cdot-}$ par les cellules.

La photographie *C* représente le marquage DHE pour des cellules ayant été exposées pendant 4 heures à une solution d'UA 300 µM. Certaines cellules présentent un marquage nucléaire net : la production d'$O_2^{\cdot -}$ est plus importante qu'aux concentrations inférieures en UA.

A 500 µM d'UA (photo *E*), le marquage est intense au niveau du noyau des cellules comme pour le contrôle positif. La production d'$O_2^{\cdot -}$ est plus conséquente.

Sur l'image *F*, le marquage est fort mais moins intense que pour le témoin positif. Les noyaux ayant intégré le DHE sont individualisés.

Au regard de ces résultats, la production maximale d'anions superoxydes est observée en cas d'exposition à une solution d'UA à 500 µM.

b. Expression génique des enzymes anti-oxydantes

L'expression génique des enzymes anti-oxydantes suivantes a été étudiée : CAT, HO-1, Mn SOD et Cu, Zn SOD *(Figure 60)*. Les résultats obtenus sont comparés au groupe UA 0 µM pour un même temps. Ce groupe correspond aux cellules exposées à une solution de bicarbonate de sodium à 10 mM.

b.1 La catalase

Sur la *Figure 60a)*, l'expression génique de la CAT est principalement augmentée pour de fortes concentrations (500-1000 µM). Ainsi, dans le cas d'une solution d'UA 500 µM, l'expression génique de la CAT est multipliée par 1,5 après 1 et 4 heures d'exposition ($p < 0,05$). De même, après 15 minutes d'exposition à une solution à 700 µM et 1000 µM d'UA, l'expression génique de la CAT est multipliée par 1,5 ($p < 0,05$) ; et après 1 heure d'exposition à ces même concentrations par 3 et par 9 ($p < 0,001$). A la plus forte concentration, une faible diminution après 4 heures de traitement (- 16 % ; $p < 0,05$) suivie d'une augmentation après 24 heures d'exposition (x 3,8 ; $p < 0,05$) de l'expression génique de la CAT sont observées.

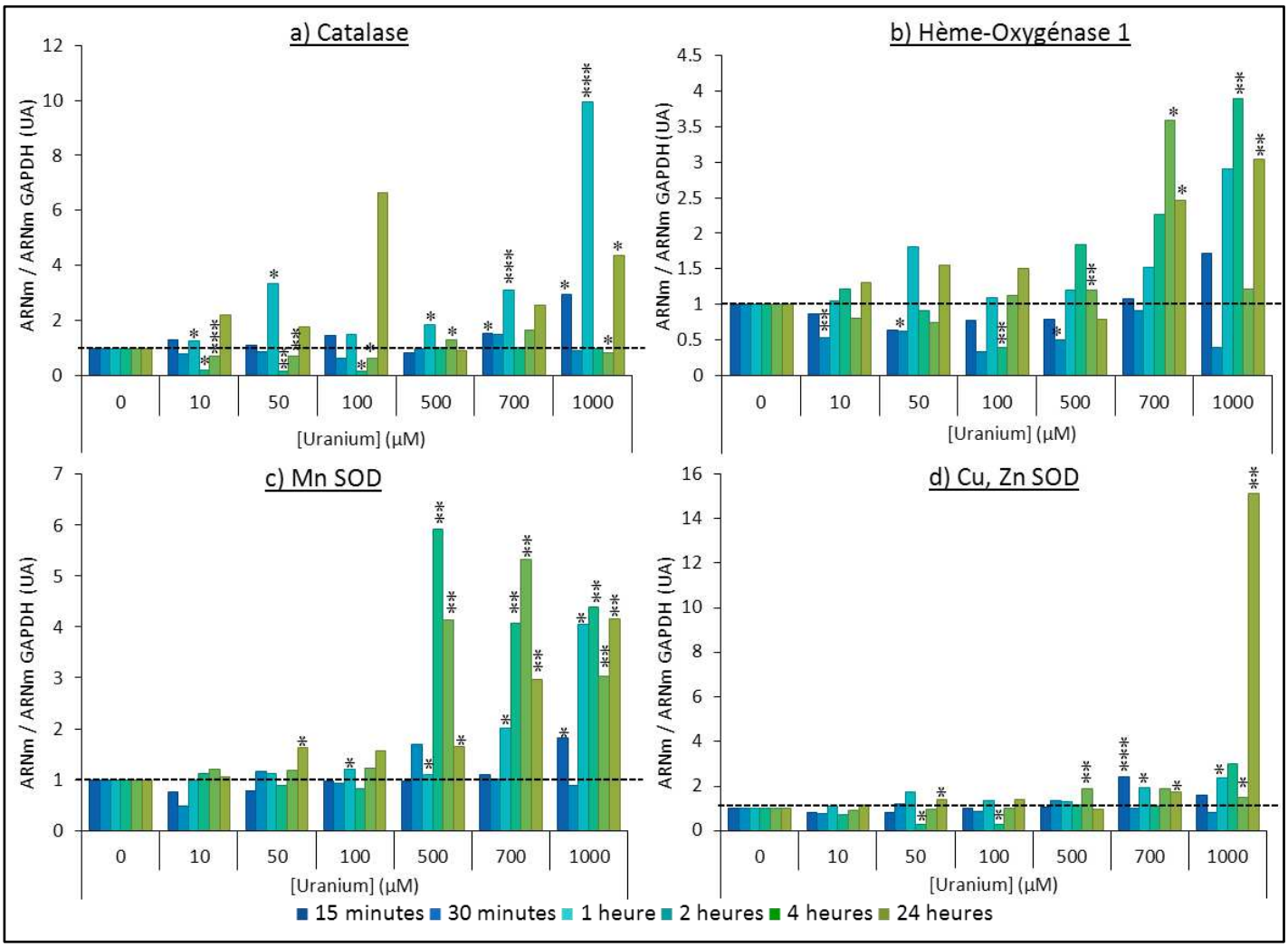

Figure 60 : Expression génique de la catalase (a), de l'hème-oxygénase-1 (b), de Mn SOD (c) et de Cu, Zn SOD (d) après 15, 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures d'exposition à l'uranium à différentes concentrations (0 à 1000 µM).

Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène de référence la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 6 par conditions). La représentation d'une différence entre les concentrations d'uranium (10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM) par rapport au témoin négatif (Bicarbonate de sodium à 10 µM) pour un temps donné (15, 30 minutes, 1, 2, 4 ou 24 heures) est significative pour *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un *test t* de Student. Le témoin négatif est le bicarbonate de sodium 10 µM qui permet la dissolution de l'uranium.

L'exposition à une solution d'UA aux concentrations inférieures non cytotoxiques conduit à une variation de l'expression génique de la catalase au cours du temps. En effet, une augmentation est observée après 1 heure d'exposition suivie d'une diminution à 2 et 4 heures puis d'une augmentation (non significative) à 24 heures. Après exposition à une solution à 10 µM d'UA, une augmentation de l'expression génique de la CAT est observée (+ 25 % ; $p < 0,05$) après 1 heure de traitement. A l'inverse, après 2 et 4 heures de traitement, son expression génique est diminuée (respectivement de -79 % et -70 % ; $p < 0,05$ et 0,01). L'expression génique de la CAT est multipliée par 3,5 après 1 heure d'exposition à 50 µM d'UA ($p < 0,05$) alors qu'une diminution de 85 et 30 % respectivement est observée après 2 et 4 heures d'exposition ($p < 0,001$). L'exposition pendant 2 et 4 heures à une solution à 100 µM d'UA entraîne une diminution de l'expression génique de la CAT (- 84 % ; $p<0,05$ et - 36 % ($p < 0,05$) suivie d'une augmentation non significative après 24 heures d'exposition.

Au regard de ces différents résultats, l'expression génique de la CAT varie en fonction de la concentration en uranium, une augmentation étant observée après une heure d'exposition à de faibles (10, 50 µM) et de fortes (500, 1000 µM) concentrations d'uranium ; et dans une moindre mesure en fonction du temps car l'expression génique de la CAT augmente après 1 heure puis diminue à 2 et 4 heures pour augmenter de nouveau après 24 heures d'exposition.

b.2 Hème Oxygénase-1

L'expression génique de HO-1 est augmentée pour des concentrations cytotoxiques dès 2 heures d'exposition *(Figure 60b)*. L'exposition à une solution de 500 µM d'UA diminue (- 50% ; $p < 0,05$) l'expression génique de HO-1 après 30 minutes et une augmentation (+ 20 % ; $p < 0,01$) après 4 heures de traitement. Une augmentation de l'expression génique de HO-1 est respectivement multipliée par 3,5 ($p < 0,05$) et 2,5 ($p < 0,05$) après 4 et 24 heures d'exposition à une solution d'UA 700 µM. Après exposition pendant 2 et 24 heures à une solution d'UA 1000 µM, l'expression génique de HO-1 est augmentée (respectivement x 3, 9 ($p < 0,01$) et x 3 ($p < 0,01$)).

Pour des concentrations inférieures à 500 µM, l'expression génique de HO-1 est diminuée après 30 minutes d'exposition. Lors d'une exposition à une solution d'UA à 10 µM, une diminution de l'expression génique de HO-1 est observée après 30 minutes (- 47 % ; $p < 0,01$). Ce même effet est également observé après 15 minutes d'exposition à une solution 50 µM d'UA (- 37 % ; $p < 0,05$). L'expression génique de HO-1 diminue (- 60 % ; $p < 0,001$) après exposition pendant 2 heures à une solution de 100 µM d'UA.

L'expression génique de HO-1 est diminuée après une courte exposition à l'uranium (30 minutes) à différentes concentrations (10, 50 et 500 µM) alors qu'elle est augmentée pour des temps d'exposition plus longs (dès 2 heures) à de fortes concentrations d'uranium (500-1000 µM).

b.3 La Manganèse Superoxyde Dismutase

Comme le montre la *Figure 60c)*, l'expression génique de la Mn SOD est plus élevée pour des concentrations en UA comprises entre 500 et 1000 µM et à partir de 2 heures d'exposition.

L'expression génique de la Mn SOD est en effet augmentée après exposition à une solution de 500 µM pendant 1 heure (x 1,1 ; $p < 0,05$), 2 heures (x 6 ; $p < 0,01$) et 4 heures (x 4 ; $p < 0,05$) pour à 24 heures retrouver un taux proche de la normale (1,65 ; $p < 0,05$). Lors de l'exposition à une solution de 700 µM d'UA, l'expression génique de la Mn SOD est respectivement multipliée par 2, 4, 5 après 1, 2, 4 heures ($p < 0,01$) et après ce maximum, l'expression génique de la Mn SOD diminue mais reste multipliée par 2,4 à 24 heures ($p < 0,01$). Après 15 minutes d'exposition d'une solution d'UA à 1000 µM, l'expression génique de la Mn SOD est augmentée (x 2 ; $p < 0,05$). De même, après 1, 2, 4 et 24 heures, une multiplication par près de 4 de l'expression génique de la Mn SOD est observée ($p < 0,05$ ou 0,01).
Aux concentrations inférieures, l'expression génique de la Mn SOD varie faiblement. Elle est multipliée par 1,6 après 24 heures d'exposition à une solution d'UA à 50 µM ($p < 0,05$). En cas d'exposition à une solution d'UA à 100 µM, l'expression génique de la Mn SOD est faiblement augmentée après 1 heure (x 1,2 ; $p < 0,05$).

L'ensemble de ces résultats permet d'observer que l'expression génique de la Mn SOD est peu modifiée après exposition à de faibles concentrations d'uranium. En revanche, pour de fortes concentrations d'uranium (500 µM) elle est augmentée dès une heure d'exposition.

b.4 Cu, Zn Superoxyde Dismutase

L'expression génique de la Cu, Zn SOD n'est augmentée que pour de fortes concentrations en UA. Après 4 heures d'exposition à une solution de 500 µM d'UA, l'expression génique de la Cu, Zn SOD est multipliée par 2 ($p < 0,01$) *(Figure 60d)*.
De même, une augmentation de près de 100 % de l'expression génique de la Cu, Zn SOD est observée après exposition à une solution d'UA 700 µM pendant 15 minutes ($p < 0,001$), 1 heure ($p < 0,05$) et 24 heures ($p < 0,05$).
Dans le cas d'une exposition à une solution de 1000 µM d'UA, l'expression génique de la Cu, Zn SOD est augmentée après 1 heure (x 2,3 ; $p < 0,05$), 4 heures (x 1,5 ; $p < 0,05$) et 24 heures (x 15 ; $p < 0,01$).

Dans le cas des faibles concentrations, les variations de l'expression génique de la Cu, Zn SOD sont de faible importance. En effet, elle est divisée par 3,45 après 2 heures d'exposition entre le témoin et des cellules traitées par une solution d'UA 50 et 100 µM ($p < 0,05$) puis un retour à un taux de base est observé. Après 24 heures d'exposition dans des conditions expérimentales similaires, une augmentation de l'expression génique est observée (x 1,4 ; $p < 0,05$).

L'expression génique de la Cu, Zn SOD est diminuée après deux heures d'exposition à l'uranium à une concentration inférieure ou égale à 100 µM alors que pour des concentrations supérieures, l'uranium augmente l'expression génique de la Cu, Zn SOD. Néanmoins, parmi les quatre enzymes étudiées, la Cu, Zn SOD présente l'expression génique la moins modifiée suite à une exposition à l'uranium.

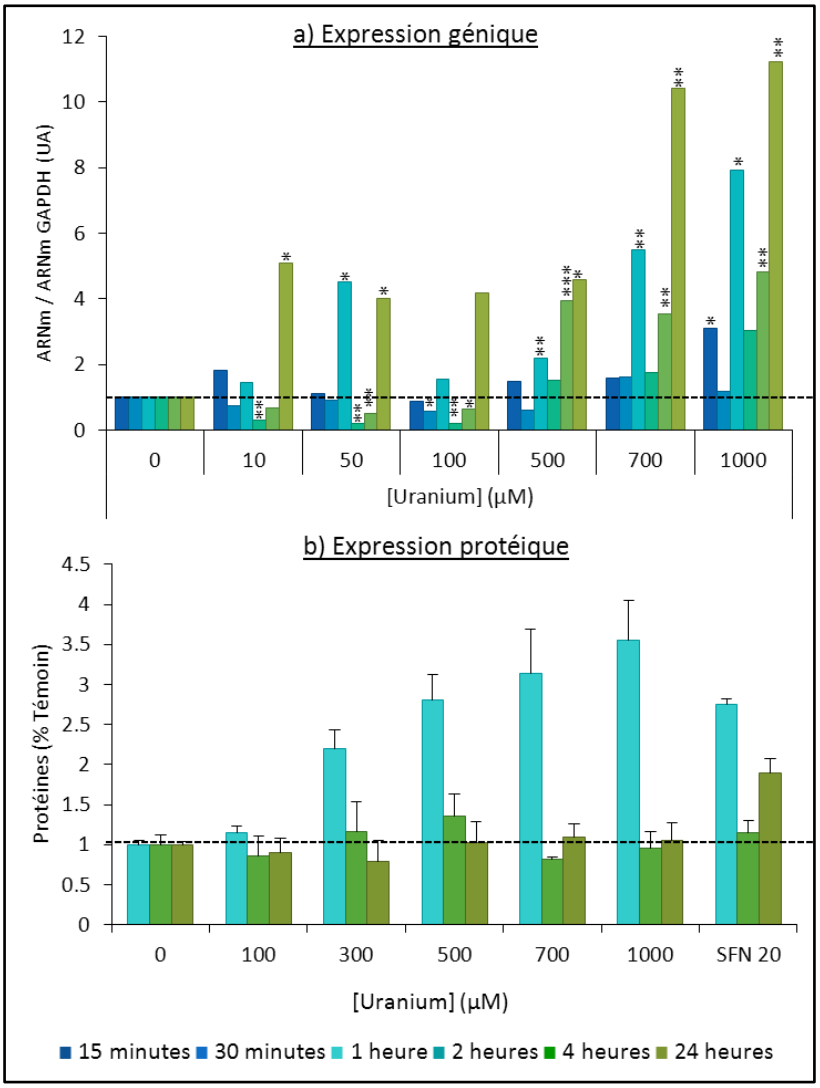

Figure 61 : Expression génique (a) et protéique (b) de Nrf2 après exposition à différentes concentrations d'uranium

Pour l'expression génique, les cellules sont été traitées par des concentrations d'uranium comprises entre 10 et 1000 µM à des temps allant de 15 minutes à 24 heures. Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression du gène de référence la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 3 par conditions). La représentation d'une différence entre les concentrations d'uranium (10, 50, 100, 500, 700 et 1000 µM) par rapport au témoin négatif (Bicarbonate de sodium à 10 µM) pour un temps donné (15, 30 minutes, 1, 2, 4 ou 24 heures) est significative si *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. L'analyse statistique a été conduite *via* un *test t* de Student. Le témoin négatif est le bicarbonate de sodium 10 µM qui permet la dissolution de l'uranium.

L'étude de l'expression protéique de Nrf2 a été faite après traitement des cellules pendant 1, 4 et 24 heures à différentes concentrations d'uranium (100, 300, 500, 700 et 1000 µM). Les valeurs ont été normalisées par rapport au taux d'expression protéique de la GAPDH. Chaque point correspond à la moyenne ± écart-type à la moyenne (n= 4 par conditions). Le contrôle positif correspond à des cellules traitées pendant 4 heures par du Sulforaphane qui est un inducteur de Nrf2.

4. Nrf2

a.1 Expression génique

Sur la *Figure 61A,* l'expression génique de Nrf2 est principalement augmentée après 24 heures d'exposition et de façon dose-dépendante

En effet, lors de l'exposition pendant 1, 4 et 24 heures à une solution d'UA 500 µM, une augmentation croissante de l'expression génique de Nrf2 est observée (x 2 ; x 3,5 et x 4,6 respectivement ($p < 0,05$ et 0,01). Suite à une exposition à 700 µM d'UA, l'expression génique de Nrf2 est également augmentée après 1 heure (x 5,5 ; $p < 0,01$), 4 heures (x 3,5 ; $p < 0,01$) et 24 heures (x 10 ; $p < 0,01$) de traitement. L'exposition à une solution d'UA 1000 µM entraîne une augmentation plus importante de l'expression génique : elle est multipliée respectivement par 3, 8, 5 et 11 après 15 minutes de traitement, 1, 4 et 24 heures ($p < 0,05$ ou 0,01).
Pour les concentrations d'uranium inférieures à 500 µM, l'expression génique de Nrf2 varie au cours du temps. Ainsi, l'expression génique de Nrf2 est diminuée (- 69 % ; $p < 0,01$) après 1 heure d'exposition à une solution de 10 µM alors que dans des conditions analogues pendant 24 heures de traitement, elle est multipliée par 5 ($p<0,05$).
L'exposition à une solution d'UA à 50 µM pendant 1 heure conduit à une augmentation de l'expression génique de Nrf2 (x 4,5 ; $p < 0,05$). A l'inverse, après 2 et 4 heures d'exposition, une diminution respectivement de 79 % ($p < 0,01$) et de 50 % ($p < 0,01$) de l'expression génique de Nrf2 est observée. A 24 heures l'expression génique de Nrf2 est multipliée par 4 ($p < 0,05$). Lors d'une exposition à une solution d'UA à 100 µM, l'expression génique de Nrf2 est respectivement diminuée de 42 et 36 % après 30 minutes, 2 et 4 heures d'exposition ($p < 0,05$ ou 0,01).

L'expression génique de Nrf2 suit des variations similaires à celles décrites pour les enzymes anti-oxydantes étudiées : des augmentations sont observées aux fortes concentrations alors qu'à faibles concentrations, l'expression génique varie au cours du temps, suggérant une adaptation en fonction du temps.

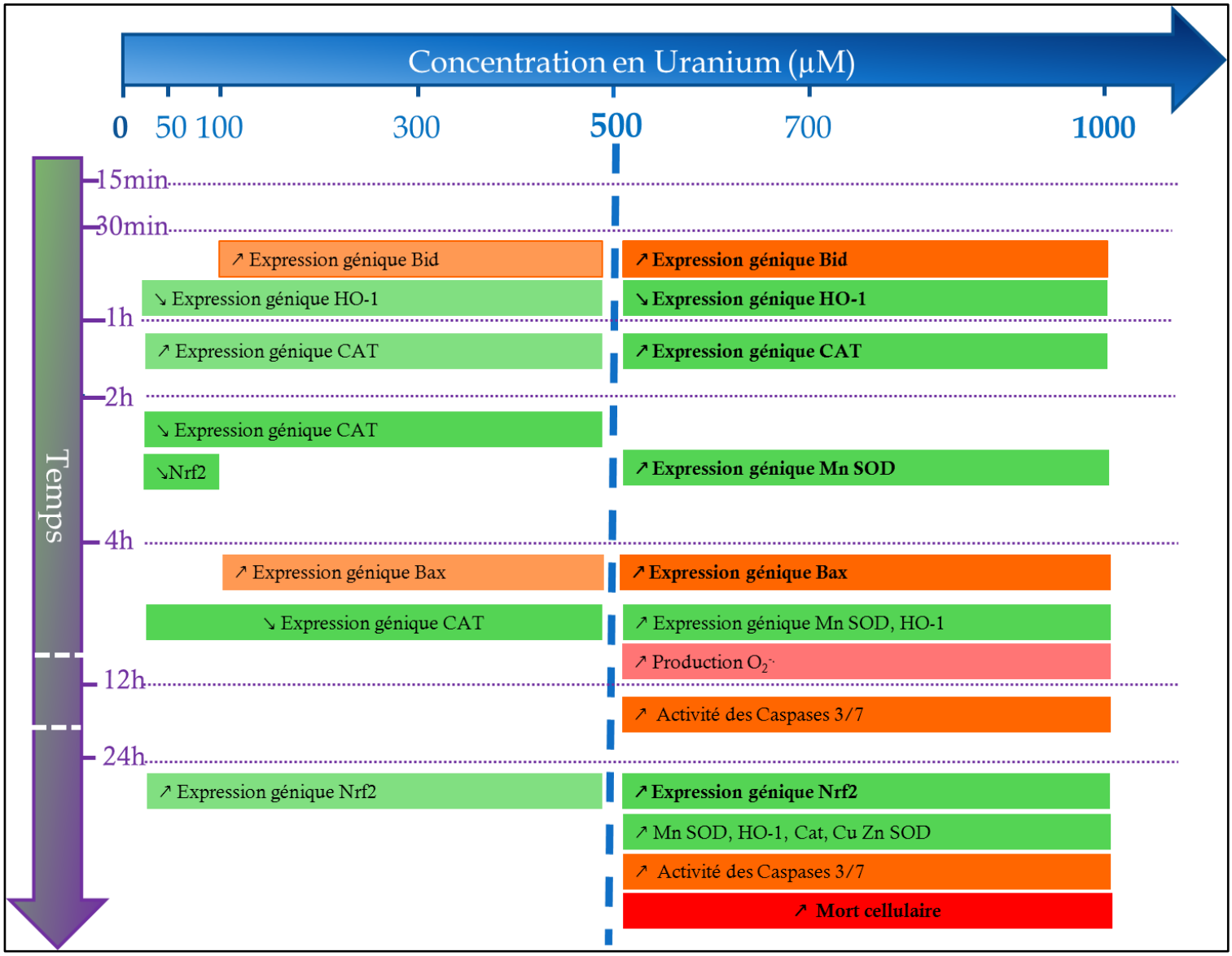

Figure 62 : Le Résumé des résultats obtenus au niveau cellulaire en fonction de la concentration en uranium et du temps d'exposition

La partie gauche de cette figure indique les résultats obtenus pour les concentrations d'uranium les plus faibles (<500 µM) et la partie droite les concentrations les plus fortes (≥500 µM). Les phénomènes protecteurs (anti-oxydants) sont représentés en vert et les phénomènes délétères (pro-oxydants) sont indiqués en orange, la production d'EROS en rose et la mort cellulaire en rouge.

a.2 Expression protéique

La *Figure 61B* représente l'expression protéique de Nrf2 en fonction de la concentration en uranium à trois temps donné : 1, 4 et 24 heures. Les résultats ont été normalisés par rapport au témoin UA 0 µM pour chaque temps.
La contamination par l'uranium n'induit pas d'augmentation de l'expression protéique de Nrf2 après 1, 4 ou 24 heures d'exposition.

La *Figure 62* résume les résultats obtenus au niveau cellulaire en fonction de la concentration en UA et du temps d'exposition. Ainsi, à partir de 500 µM, nous observons clairement les cascades d'évènements conduisant à la mort cellulaire malgré la mise en place des processus de protection, pas suffisant pour empêcher la production d'EROs, l'activation des caspases, et finalement la mort cellulaire à 24h. A l'inverse, la visualisation des phénomènes observés pour des concentrations ≤ 300 µM montre la dominance d'effets sur les enzymes anti-oxydantes, qui même dans le cas d'une diminution de leur taux génique, ne conduit à aucun phénomène pro-oxydant et donc de cytotoxicité cellulaire. Pris dans leur globalité, ces résultats montrent donc l'induction d'une réponse anti-oxydante dès la première heure d'exposition, quel que soit la concentration d'uranium dans le milieu de culture. Cette réponse anti-oxydante est cependant différente, puisque la catalase est l'enzyme majeure affectée à faibles concentrations, alors qu'il s'agit de la Mn-SOD pour les fortes concentrations. Malgré un plus grand nombre d'enzymes anti-oxydantes activées à fortes qu'à faibles concentrations, cette réponse ne permet pas de compenser le stress oxydant induit à ces concentrations d'uranium.

C. Analyses des résultats

L'uranium induit une augmentation de la production d'anion superoxydes (4 heures, 500 µM) comme le montre la *Figure 59*, confirmant que l'uranium induit à forte concentrations une augmentation de la production des EROs au niveau cellulaire (Pourahmad *et al.* 2006 ; Thiebault *et al.* 2007). Après 4 heures d'exposition, une augmentation de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes (HO-1, Mn SOD, CAT) et pro-apoptotiques (Bax et Bid) et de Nrf2 est également observée, ces augmentations étant principalement observées pour des concentrations supérieures ou égales à 500 µM. C'est aussi à partir de cette même concentration qu'après 24 heures d'exposition à l'uranium, la mort cellulaire est observée et que l'uranium est présent sous forme soluble et précipités, résultats en accord avec une précédente étude réalisée au laboratoire (Rouas *et al.* 2010). De même, après 24 heures d'exposition, les niveaux d'expression des marqueurs d'apoptose évalués -activité des Caspases3/7 et expression génique de Bax et Bid- sont augmentés ainsi que ceux des enzymes anti-oxydantes et de Nrf2. Pour des concentrations supérieures ou égales à 500 µM, l'expression génique des enzymes étudiées est toujours augmentée associée à une augmentation de la production d'$O_2^{\cdot -}$ et de l'activité des caspases 3/7 pour conduire ensuite à une cytotoxicité *(Figure 58)*. Pour ces concentrations, l'exposition à l'uranium entraîne donc dans un premier temps une activation des défenses anti-oxydantes qui sont probablement dépassées entraînant une entrée en apoptose comme dernier recours pour à terme conduire à la mort de la cellule.

En cas d'exposition à des concentrations non cytotoxiques, l'exposition à l'uranium induit des modifications de l'expression génique de la CAT, de Nrf2, de Bid qui varient au cours du temps. Ainsi, dès 30 minutes, alors que l'uranium est observé dans le noyau des cellules et pour une concentration de 50 µM comme le montre les *Figure 57 & Figure 60,* des modifications de l'expression génique du système pro/anti-oxydant et de l'apoptose (HO-1 et Bid) sont observées. Ces activations précoces sont le reflet d'une réaction de la cellule face au stress induit par la contamination. Après deux heures d'exposition à 50 µM d'uranium, une diminution de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes ainsi que celle de Nrf2 est observée.

L'uranium est alors observé sous forme soluble dans le noyau et les précipités commencent à apparaître. En revanche, après 4 et 24 heures d'exposition, une augmentation de l'expression génique de ces systèmes de défense est observée.

Ces différences au cours du temps suggèrent la mise en place de mécanismes d'adaptation par la cellule, aspect qui sera plus amplement développé dans la discussion générale *(cf. p. 349)*. De plus, l'uranium présent dans le milieu pourrait induire des effets sur les cellules par action sur des récepteurs membranaires. En effet, des études ont montré que l'uranium pouvait se lier avec des protéines telles que la transferrine ou la fetuin A et pour ensuite se fixer sur leurs récepteurs (Basset *et al.* 2013 ; Hemadi *et al.* 2011).

Grâce à la double approche adoptée -localisation de l'uranium et analyses biologiques- nous observons une entrée rapide de l'uranium dans la cellule avec une localisation nucléaire de l'uranium dès 30 minutes d'exposition avec en parallèle une réaction de la cellule par induction de l'expression génique des enzymes pro-apoptiques puis de celles du système anti-oxydant. Leur réponse évolue ensuite au cours du temps suggérant la mise en place de mécanismes de régulation par la cellule. Dans le cas d'une augmentation du temps d'exposition et/ou de la concentration, l'uranium précipite dans la cellule ; l'expression génique des enzymes étudiées est plus importante pouvant conduire à la mort de la cellule.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Une exposition environnementale à de nombreux composés potentiellement toxiques peut être régulière voire quotidienne pour différentes populations du fait soit de leur présence naturelle dans l'environnement soit de leur utilisation à des fins anthropogéniques. Les métaux lourds, dont l'uranium, sont un exemple de ces composés et donnent lieu à de nombreuses études. Ainsi, tout au long de ce travail de thèse, nous avons étudié les effets d'une contamination chronique à l'uranium en mimant l'exposition de populations à l'aide de modèles animaux contaminés (rongeurs) par ingestion d'eau de boisson contenant des teneurs croissantes en uranium. Au sein de ces modèles, nous avons plus particulièrement étudié le système pro/anti-oxydant au niveau hépatique et rénal après contamination par l'uranium. Les concentrations choisies incluent des concentrations environnementales jusqu'à des concentrations considérées comme toxiques sur la base d'études d'exposition aiguë. Une approche *in vitro* complémentaire à cette approche *in vivo* a été également mise en place afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à la base des effets observés *in vivo*.
Parmi les nombreux résultats obtenus au cours de cette thèse, nous avons organisé la discussion sur trois questions majeures auxquelles nous tenterons de répondre dans cette dernière partie :

- ★ Comment l'uranium s'accumule-t-il dans les tissus après contamination chronique par l'eau de boisson ?

- ★ L'uranium induit-il une néphrotoxicité et une hépatotoxicité après exposition chronique par ingestion ?

- ★ Quel(s) est (sont) le (s) rôle(s) du système pro/anti-oxydant dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium ?

I. Comment l'uranium s'accumule-t-il dans les tissus après contamination chronique par eau de boisson ?

Lors d'une exposition à une substance potentiellement toxique, il est primordial de mesurer la quantité de produit accumulé dans les tissus ; en effet, les effets observés peuvent différer en fonction de la quantité accumulée. Dans le cas de l'uranium, sa quantification dans les organes permet ainsi de déterminer le niveau de contamination des animaux et son évolution en fonction du temps et de la concentration en uranium reçue. Parallèlement, la localisation tissulaire et/ou cellulaire de l'uranium permet d'affiner les connaissances sur les mécanismes conduisant à son accumulation. Enfin, l'analyse de la corrélation entre la quantité et la localisation d'uranium dans les organes peut aider à comprendre les effets biologiques observés.

Dans ce travail de thèse, les mesures de quantification d'uranium dans les organes chez les rats et les souris montrent une accumulation linéaire d'uranium en fonction de la concentration après exposition chronique dans le foie, le rein et l'os. La quantité d'uranium mesurée augmente proportionnellement à la concentration en uranium présente dans l'eau de boisson sans observer de saturation même à la plus forte concentration, résultats en accord avec une autre étude réalisée chez le rat pendant 91 jours *via* l'eau de boisson à différentes concentrations d'uranium (0,96 à 600 mg/L soit 0,02 à 26 mg/kg/j) qui montre une accumulation linéaire en fonction de la concentration dans les reins (Gilman *et al.* 1998b).

Une autre étude de contamination à l'uranium via l'eau de boisson pendant trois mois à différentes concentrations (10, 20 et 40 mg/kg/j) a également été réalisée chez le rat où l'accumulation d'uranium dans les reins est similaire à celle que nous observons pour les plus fortes concentrations (Linares *et al.* 2006). De même, l'uranium s'accumule de façon dose dépendante dans les organes dont l'os, le rein, et le foie, jusqu'à 90 jours d'exposition chez des rats auxquels des implants d'uranium à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ou 0,3 grammes) ont été posés pendant une durée de 7 à 360 jours (Zhu *et al.* 2009a).

Chez la souris, une seule étude de contamination chronique à deux concentrations d'uranium a été effectuée (13 et 26 mg/kg/j, 4 mois) (Taulan *et al.* 2004). Cette étude a mis en évidence une accumulation d'uranium au niveau rénal pour ces deux concentrations. Nos résultats sur l'accumulation d'uranium dans les reins sont accord avec cette étude et apportent de nouvelles informations quant à l'accumulation d'uranium au niveau hépatique et osseux chez la souris.

Des études de bioaccumulation de l'uranium ont également été réalisées sur d'autres modèles animaux. Ainsi, chez le Zebrafish, modèle très utilisé en écotoxicologie, une accumulation dose dépendante de l'uranium a aussi été mise en évidence (Barillet *et al.* 2011).

Parmi ces différentes études où une accumulation linéaire d'uranium dans les organes en fonction de la concentration après exposition chronique est décrite, seules deux études ont donc été réalisées chez des rats contaminés *via* l'eau de boisson pendant 3 mois (Gilman *et al.* 1998b ; Linares *et al.* 2006).

En conclusion, nos résultats confirment que l'uranium s'accumule de façon linéaire dans les différents organes étudiés (rein, foie, os) malgré de fortes concentrations (40 mg/kg/j chez le rat et 23 mg/kg/j chez la souris).

L'accumulation linéaire d'uranium en fonction de la concentration a montré que suite à une contamination pendant 9 mois à la plus forte concentration -600 mg/L soit 40 mg/kg/j- la quantité d'uranium mesurée dans le rein est de 6 µg/gramme de rein. Il est classiquement admis que le seuil à partir duquel sont décrits des effets néphrotoxiques de l'uranium est 3 µg d'uranium/gramme de rein dans le cas d'une exposition aiguë (Diamond *et al.* 1989). La valeur mesurée dans nos conditions expérimentales étant donc le double de cette valeur « seuil », notre étude se situe donc dans des conditions théoriques de néphrotoxicité pour la dose la plus élevée.

La quantité d'uranium mesurée dans le rein est de 6 µg/gramme de rein : conditions théoriques de néphrotoxicité.

L'étude de l'accumulation d'uranium dans les organes en fonction du temps a également été réalisée sur des modèles animaux. Dans notre étude où les animaux ont été contaminés pendant 3 et 9 mois, l'accumulation d'uranium augmente entre ces 2 temps.
De plus, les mesures d'uranium réalisées dans les urines de rat de façon mensuelle montrent d'une part que la quantité d'uranium excrétée dans les urines est proportionnelle à la concentration en uranium présente dans l'eau de boisson. D'autre part, la quantité d'uranium mesurée tous les mois reste relativement constante d'un mois à l'autre.
Une étude cinétique réalisée au cours d'une exposition chronique de 18 mois chez le rat a montré qu'au contraire l'uranium ne s'accumule pas dans les reins de façon linéaire au cours du temps (40 mg/L soit 2,67 mg/kg/j) (Paquet *et al.* 2006). De plus, dans cette étude, la quantification de l'uranium dans les urines n'est pas linéaire et semble corrélée aux variations mesurées dans le rein ; une augmentation de l'excrétion urinaire d'uranium est associée à une diminution d'accumulation d'uranium dans le rein.
Dans le cas d'implants d'uranium pendant 360 jours (12 mois), Zhu *et al.* ont décrit une accumulation maximale après 90 jours dans tous les organes, accumulation qui diminue ensuite très progressivement (Zhu *et al.* 2009a). Après 180 jours (6 mois), la quantité d'uranium mesurée dans le rein est d'environ 15 µg d'uranium par gramme de rein pour la plus faible concentration (0,1 g). Cette quantité d'uranium reste supérieure à celle mesurée dans notre étude dans le rein après contamination à la plus forte concentration d'uranium (6 µg/g de rein). Une autre étude où des implants d'uranium (3 quantités différentes non précisées) ont également été posés chez des rats pendant 18 mois et a mis en évidence qu'après 6 mois d'exposition, la quantité d'uranium dans le rein atteignait sa valeur maximale (de l'ordre de 7 µg/g de rein pour la concentration en uranium la plus importante) pour diminuer par la suite (Pellmar *et al.* 1999). Après contamination par implant, une saturation au cours du temps de la quantité d'uranium dans le rein est donc observée. Cela peut être dû à des phénomènes « d'érosion » différents de l'implant en fonction du temps.
Gilman *et al.* ont également étudié l'accumulation de l'uranium dans les organes après 1 et 3 mois de contamination à deux concentrations (120 et 600 mg/L) chez des rats femelles : une augmentation de la quantité d'uranium dans le rein a été décrite entre les deux temps d'exposition et pour ces deux concentrations (Gilman *et al.* 1998b).

L'accumulation d'uranium en fonction du temps diffère donc selon la voie d'administration (*per os* ou implant) et le temps d'exposition comme le montrent les études précédemment citées. Dans nos conditions expérimentales, une accumulation linéaire d'uranium au cours du temps est observée chez le rat.

Après contamination chronique, l'uranium s'accumule de façon linéaire en fonction de la concentration dans les organes.

La quantification de l'uranium dans les organes chez les souris a également mis en évidence une accumulation linéaire en fonction de la concentration. Cependant, deux nouvelles informations clés au sujet de la bioaccumulation de l'uranium chez les souris peuvent être tirées de ces expérimentations. Premièrement, les souris Nrf2 $^{-/-}$ accumulent une plus grande quantité d'uranium dans les organes que les souris WT, et deuxièmement l'accumulation d'uranium dans les organes est plus importante chez les femelles que chez les mâles.

Suite à cette première étude de contamination chronique à l'uranium chez des souris KO Nrf2, la mesure de l'uranium dans les tissus a révélé une accumulation d'uranium plus importante chez les souris KO par rapport aux souris WT et ce pour les trois organes étudiés (le foie, le rein et l'os). Ainsi au niveau rénal, l'accumulation d'uranium chez les souris KO Nrf2 est en moyenne de 2,7 µg d'uranium par gramme de rein, contre 1,4 µg chez les souris WT, soit le double. Une étude avait déjà décrit au niveau hépatique cette différence pour un autre toxique, le mercure, et, dans le cas d'une exposition aiguë après injection de mercure (5 mg/kg/j, 8 jours) (Toyama *et al.* 2011). La différence d'accumulation de métaux serait donc liée à l'inactivation de Nrf2.

Au niveau hépatique, Nrf2 intervient dans la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la distribution, le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques (Klaassen *et al.* 2010). Dans cette dernière étape, Nrf2 intervient dans la transcription de gènes codants pour les transporteurs d'efflux que sont les Multidrug Resistance-Associated Protein Transporters (MRPs) qui permettent l'élimination des produits issus des réactions entre les xénobiotiques et les enzymes de phase II, ces dernières étant elles-mêmes induites par Nrf2 (GST par exemple) (Maher *et al.* 2005 ; Maher *et al.* 2007 ; Shen *et al.* 2009).

Parmi les autres voies d'élimination des toxiques, l'excrétion biliaire peut également être régulée par Nrf2 *via* la GST (Reisman *et al.* 2009b). En cas d'inactivation de Nrf2 chez des souris, une diminution du taux protéique de MRP 2, 3 et 4 au niveau hépatique a été décrite (Maher *et al.* 2007). Ces voies de détoxification sont donc moins effectives en cas d'inactivation de Nrf2. Le toxique serait mal ou ne serait pas éliminé de la cellule et donc s'y accumulerait. Cela expliquerait pourquoi les animaux Nrf2 $^{-/-}$ présentent une plus grande sensibilité envers certaines substances telles que le tétrachlorure de carbone, la phalloïdine (Kitamura *et al.* 2007 ; Liu *et al.* 2013) dont les médicaments comme le paracétamol (Chan *et al.* 2001) où le rôle du transporteur MRP3 a été décrit (Reisman *et al.* 2009a).

Au niveau rénal, quelques études ont également décrit l'implication de Nrf2 envers des transporteurs de type MRPs tels que MRP1 et pourrait influer sur l'élimination des toxiques (Kimura *et al.* 2006 ; Sivils *et al.* 2013).

Suite aux conclusions de ces études, l'inactivation de Nrf2 induirait une altération dans l'efflux des toxiques favorisant leur accumulation dans les cellules. Cela pourrait expliquer l'augmentation de l'accumulation d'uranium chez les souris KO par rapport aux souris WT, suggérant de nouvelles perspectives de travail sur l'accumulation tissulaire d'uranium. Il sera donc intéressant de mieux comprendre le rôle de ces transporteurs dans nos conditions expérimentales.

Les souris Nrf2 $^{-/-}$ accumulent plus d'uranium que les souris sauvages.
L'inactivation de Nrf2 favoriserait l'accumulation d'uranium.

Les mesures d'accumulation d'uranium réalisées chez les souris ont également mis en évidence une accumulation d'uranium plus importante chez les femelles que chez les mâles -tant chez les souris WT que KO- suggérant que cette différence est liée au sexe et donc probablement à une régulation hormonale.

A titre de comparaison, il existe une seule étude où des rats mâles et femelles ont été contaminés pendant 91 jours à l'uranium *via* l'eau de boisson à deux concentrations (120 et 600 mg/L) (Gilman *et al.* 1998b). Les mesures de quantification de l'uranium dans cette étude ne montrent pas de différence significative entre les deux sexes. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par le choix du modèle (souris *versus* rat) et la durée de contamination (4 mois *versus* 91 jours).

Cette différence mâle/femelle a par ailleurs été décrite pour d'autres métaux lourds. Ainsi, une étude réalisée au Japon où l'accumulation de Cd a été mesurée chez les mâles et les femelles d'une cinquantaine d'espèces animales a mis en évidence une accumulation plus importante de Cd dans le foie et les reins chez les femelles que chez les mâles (Koizumi *et al.* 2008). Les auteurs suggèrent une excrétion plus lente pour les femelles sans donner d'explication mécanistique. D'autres études effectuées dans le cas d'une contamination au mercure montrent également que l'accumulation de ce métal dans le foie et les reins est plus faible chez les mâles que chez les femelles (Ekstrand *et al.* 2010 ; Yasutake *et al.* 1988). Ces accumulations de métaux plus importantes chez les femelles posent la question de savoir si cette accumulation s'accompagne de changement dans leur localisation cellulaire ou tissulaire. Des échantillons de rein ont donc été prélevés pour réaliser des analyses de localisation de l'uranium par SIMS afin de déterminer si une accumulation différentielle existe entre les groupes (KO *versus* WT ; mâles *versus* femelles ; souris *versus* rat).

L'accumulation d'uranium est plus importante chez les souris femelles que chez les souris mâles.

Après avoir discuté les résultats concernant l'accumulation d'uranium dans les trois organes d'intérêt (foie, rein et os), il est maintenant nécessaire de s'attarder plus particulièrement sur le rein. En effet, cet organe constitue la cible d'accumulation préférentielle de l'uranium après exposition aiguë (Diamond *et al.* 1989 ; Domingo *et al.* 1987 ; Ortega *et al.* 1989). Au niveau structural, il s'accumule plus particulièrement dans le cortex rénal (McDonald-Taylor *et al.* 1997 ; Paquet *et al.* 2004) et notamment dans les tubules contournés proximaux (TCP) (Tessier *et al.* 2012).

Les analyses de localisation de l'uranium réalisées chez les rats ont également montré que pour de fortes concentrations d'uranium (jusqu'à 6 µg/g de rein), ce radionucléide était principalement localisé sous forme soluble dans le noyau des cellules des TCP, aucun précipité n'ayant été observé.

L'uranium est observé dans le noyau des cellules du TCP.

Grâce à la cinétique réalisée au niveau cellulaire, nous avons mis en évidence que l'uranium était présent dans le noyau dès 30 minutes d'exposition pour une solution d'uranium à 50 µM. En considérant que la quantité d'uranium est la même dans le milieu extra-cellulaire que dans le milieu de culture, une concentration en uranium de 50 µM correspond 11,5 µg d'uranium par gramme de milieu de culture. A titre de comparaison, chez le rat contaminé à une solution d'uranium à 600 mg/L pendant 9 mois, la quantité d'uranium mesurée est de 6 µg/g de rein. Il est évident que nous ne pouvons pas directement comparer une lignée cellulaire isolée à un organe intégré au sein d'un plus grand ensemble qu'est l'organisme, et d'extrapoler les effets observés. Cependant, cela permet de donner un ordre d'idée entre les concentrations utilisées au niveau cellulaire et celles utilisées *in vivo* : les faibles concentrations utilisées au niveau cellulaire correspondraient aux plus fortes concentrations utilisées chez l'animal.

L'entrée de l'uranium dans la cellule est rapide et il se localise préférentiellement dans les noyaux sous forme soluble. De précédentes études *in vitro* ont montré que l'uranium rentrerait dans la cellule soit par endocytose soit *via* un transporteur sodium dépendant (Na-Pi IIa) (Mirto *et al.* 1999b ; Muller *et al.* 2006 ; Muller *et al.* 2008). Ces deux mécanismes pourraient ainsi expliquer l'entrée d'uranium dans la cellule que nous observons. Néanmoins, étant donné que l'entrée est rapide, l'uranium pourrait en plus rentrer par diffusion passive. De plus, il a été montré qu'en fonction de la présence de phosphates dans le milieu, l'uranium pouvait soit précipiter sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle avant d'entrer dans la cellule, soit entrer dans la cellule et précipiter au niveau intra-cellulaire (Mirto *et al.* 1999b).

L'uranium est présent dans le noyau des cellules à faible concentration dès 30 minutes d'exposition et des précipités apparaissent au cours du temps.

La présence d'uranium dans le noyau pourrait mettre en jeu des transporteurs intra-cellulaires. Une étude de transcriptomique a ainsi montré que suite à une contamination par l'uranium, les protéines de transport du calcium dont la calmoduline sont modifiées (Prat *et al.* 2005).

Par ailleurs, l'apparition des précipités au cours du temps peut être expliquée par le fait que l'uranium s'accumulerait dans les lysosomes sous forme de précipités jusqu'à entrainer une rupture de la membrane lysosomale provoquant le relargage des précipités d'uranium dans le milieu extra-cellulaire (Galle 1997 ; Mirto *et al.* 1999a).
Des études ont analysé par rayons X la composition de ces précipités : l'uranium serait complexé avec du potassium, du phosphate, du soufre (Carrière *et al.* 2008 ; Ghadially *et al.* 1982a ; Muller *et al.* 2006) suggérant que l'uranium entrerait dans la cellule sous forme déjà précipitée en cas d'exposition à forte concentration (Carrière *et al.* 2008 ; Mirto *et al.* 1999b). Or, dans nos travaux, nous observons également la présence de précipités mais nous avons mis en plus en évidence qu'elle apparait au cours du temps dans le milieu intra et extra-cellulaire.

Le résultat particulièrement inattendu sur l'accumulation d'uranium plus important chez les animaux Nrf2 $^{-/-}$ nécessite d'étudier le rôle des transporteurs chez les animaux KO. De plus, des études complémentaires sur des cellules où Nrf2 aura été préalablement inactivé avant de les exposées à l'uranium permettront d'apporter des explications sur l'accumulation de l'uranium chez les souris KO. En termes de perspectives, il serait intéressant de coupler l'étude des transporteurs avec une analyse SIMS afin de visualiser si en effet le transport de l'uranium met en jeu ces transporteurs « Nrf2 dépendants ».

II.L'uranium induit-il une néphrotoxicité et une hépatotoxicité après exposition chronique ?

En cas d'exposition aiguë à l'uranium, il est bien décrit que l'uranium s'accumule préférentiellement dans le rein, qui est donc la première cible des effets toxiques. Plusieurs revues décrivent les effets biologiques de l'uranium au niveau rénal (Pour plus de détails : (Arzuaga *et al.* 2010 ; ATSDR 2013 ; Gueguen *et al.* 2012 ; Vicente-Vicente *et al.* 2010).

De nombreuses études ont ainsi démontré, après exposition aiguë à de fortes concentrations d'uranium, des effets néphrotoxiques (Diamond *et al.* 1989 ; Domingo *et al.* 1987 ; Fukuda *et al.* 2006 ; Gueguen *et al.* 2006a ; Leggett 1989 ; Taulan *et al.* 2004) mis en évidence soit par une augmentation des paramètres rénaux tels que la créatinine, le glucose, l'urée ; soit par des atteintes histologiques avec perte de la bordure en brosse des cellules épithéliales ou apparition de foyers nécrotiques. Ainsi, après contamination *via* l'alimentation (9 mg/kg/j) pendant 5 jours chez la souris, une augmentation de la créatinine a été observée (Ozmen *et al.* 1998). De même, la créatinine ainsi que l'urée sont augmentées cinq jour après injection i.v d'acétate d'uranyle à raison de 5 mg/kg/j chez le rat (Kato *et al.* 1994). Au niveau histologique, une perte de la bordure en brosse des cellules du TCP est rapportée dès la première heure consécutive à l'injection s.c. de nitrate d'uranyle (10 mg/kg) (Haley *et al.* 1982).

Après exposition chronique à l'uranium, de rares études ont mis en évidence des modifications de la fonction rénale avec l'apparition de lésions histologiques, l'augmentation de certains paramètres. En effet, après contamination pendant 9 mois à une concentration de 40 mg/L (soit 2,67 mg/kg/j), une diminution du taux sanguin de globules rouges (Berradi *et al.* 2008) ainsi qu'une diminution du taux de Vit D plasmatique (Tissandie *et al.* 2007) ont été décrits chez le rat. Gilman *et al.* ont observé des altérations histologiques chez les rats contaminés à différentes concentrations (0,02 à 26 mg/kg/j) y compris à la plus faible concentration (Gilman *et al.* 1998b).

Dans notre étude, après contamination chronique, la quantité d'uranium mesurée dans le rein atteint 6 µg/g de rein pour les animaux contaminés à la plus forte concentration d'uranium, soit près du double du seuil habituellement admis à partir duquel sont décrits des effets néphrotoxiques en cas d'exposition aiguë à l'uranium (ATSDR 2013).
Au niveau rénal, des biomarqueurs spécifiques d'atteinte rénale tels que KIM-1, la clusterine ou la GSTa1 ont été mesurées dans les urines des rats. KIM-1 a déjà été utilisé dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium (9 mois) chez le rat à la dose de 2,67 mg/kg/j (Rouas *et al.* 2011). Nos résultats sont en accord avec ceux observés dans cette étude, à savoir une absence de variation de KIM-1, même pour une quantité d'uranium 15 fois supérieure (40 mg/kg/j). Nous avons de plus réalisé un suivi tout au long de la contamination en vue d'étudier l'évolution de l'intégrité de la fonction rénale non seulement pour KIM-1 mais aussi pour un suivi urinaire plus classique (électrolytes, urée, créatinine). Les résultats obtenus ont montré des variations qui seraient liées au vieillissement des animaux. En complément, l'analyse histologique des reins a également été réalisée : aucune altération histologique liée à la contamination n'a été observée.

Suite à ces différentes analyses, aucune néphrotoxicité n'a été observée malgré une quantité à l'organe décrite théoriquement comme toxique. Ce résultat assez inattendu et en contradiction avec l'étude de Gilman dans laquelle des altérations histologiques sont décrites dès la plus faible concentration d'uranium (0,96 mg/L) (Gilman *et al.* 1998b). Jusqu'à très récemment, cette étude faisait office de référence de recommandation pour la teneur maximale d'uranium dans l'eau de boisson (WHO 2006). Au regard des résultats obtenus dans cette thèse, il apparaît nécessaire de la reconsidérer, même si la nouvelle valeur a été doublée, sur la base d'études épidémiologiques et non plus expérimentales (WHO 2011).
Par ailleurs, les analyses ont également été réalisées sur le foie, organe qui accumule de l'uranium dans une quantité moindre que le rein mais qui permet d'étudier les effets de l'uranium sur un organe clé de la détoxification des xénobiotiques (Gueguen *et al.* 2006a ; Gueguen *et al.* 2013 ; Moon *et al.* 2003 ; Pasanen *et al.* 1995 ; Rouas *et al.* 2009 ; Souidi *et al.* 2005).

Cela permet également de réaliser une étude complète des effets de l'uranium en choisissant deux organes : l'un cible (rein) et un autre organe non-cible (le foie). Dans notre étude, nous avons mesuré les transaminases dans le plasma qui ne sont pas modifiées après contamination chronique, ainsi qu'une analyse histologique où aucune altération n'a été mise en évidence. A l'instar des précédentes études, nos résultats ont également montré une absence d'hépatotoxicité y compris pour les plus fortes concentrations

Après exposition chronique, l'uranium n'induit pas de néphrotoxicité ni d'hépatotoxicité.

Ces résultats confortent l'idée que les effets expérimentaux dus à une exposition chronique à l'uranium ne correspondent pas aux effets théoriques attendus pour une succession d'expositions aiguës à l'uranium. Nos résultats montrent clairement que l'organisme réagit donc différemment lorsqu'il est exposé de manière unique à une forte concentration de toxique et quand il est exposé en continu à ce toxique, même sur une durée longue et pour une quantité accumulée à l'organe importante. Une adaptation de l'organisme semble donc se mettre en place dans le cas d'une contamination chronique, même à forte dose.

Ces résultats conduisent à des conclusions différentes en termes de perspectives sur les causes d'une telle adaptation. Tout d'abord, cette adaptation, montrant notamment une absence de toxicité après exposition chronique à l'uranium telle que nous l'avons décrite, pourra être prise en compte lors de l'établissement ou de la révision des normes nationales et internationales sur la teneur maximale de l'uranium dans les eaux de boisson destinées à la consommation humaine. Il est important de considérer ces résultats vis-à-vis des expositions de population buvant quotidiennement des eaux à teneur élevée en uranium, comme cela est le cas dans différentes parties du monde telles que le sud de la Finlande (10 mg/L (Muikku *et al.* 2009)) ou certains comtés des Etats-Unis (7,8 mg/L (Orloff *et al.* 2004)). La découverte de ces eaux provenant de puis privés particulièrement riches en uranium a conduit à la mise en place d'études cliniques chez ces populations afin de déterminer un éventuel dysfonctionnement rénal (Kurttio *et al.* 2002 ; Kurttio *et al.* 2006 ; Mao *et al.* 1995 ; Selden *et al.* 2009 ; Zamora *et al.* 1998).

Malgré les niveaux élevés d'uranium dans ces eaux, aucune étude épidémiologique n'a pu mettre clairement en évidence un dysfonctionnement rénal, et encore moins une insuffisance rénale.

Par ailleurs, l'absence de toxicité que nous avons observée au niveau hépatique et rénal suggère la mise en place par l'organisme de systèmes de défense qui prévient ou corrige tout effet délétère de l'uranium, nous questionnant sur les mécanismes sous-jacents.

Nous avons choisi d'étudier le système le plus souvent décrit dans la littérature, à savoir l'équilibre pro/anti-oxydante, à la fois chez des rongeurs « sains » contaminés à l'uranium *via* l'eau de boisson mais aussi sur un modèle déficient pour le facteur de transcription Nrf2 qui induit la transcription des enzymes anti-oxydantes, afin de décrire si cette déficience modifie ou non les effets liés à la contamination à l'uranium.

III. Quel(s) est (sont) le (s) rôle(s) du système pro/anti-oxydant dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium ?

Un stress oxydant est décrit au niveau hépatique et rénal dans le cas d'études sur le système pro/anti-oxydant réalisées après exposition aiguë à l'uranium. En effet, après exposition orale par gavage pendant 5 jours à une solution d'uranium à 5 mg/kg de poids corporel une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution du GSH sont décrites dans le foie et les reins chez la souris (Yapar *et al.* 2010). De même au niveau du cortex rénal, chez le rat après injection i.p. à 0,5 mg/kg de PC pendant 5 jours, une augmentation de la peroxydation lipidique est décrite (Priyamvada *et al.* 2010).

Après exposition chronique à l'uranium, il existe peu d'études sur l'équilibre pro/anti-oxydant au niveau hépatique et rénal. Ainsi, après trois mois d'exposition à l'uranium à trois concentrations (10, 20 et 40 mg/kg/j) *via* l'eau de boisson chez le rat, seule une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau rénal chez les animaux ayant reçu la plus forte concentration a été décrite (Linares *et al.* 2006).
A l'inverse, dans notre étude, une diminution de la peroxydation lipidique et une augmentation du GSH ont été observées: nous observons un renforcement du système anti-oxydant après 9 mois d'exposition à l'uranium qui laisse suggérer une réponse différente de l'équilibre pro/anti-oxydant entre une exposition aiguë et une contamination chronique à l'uranium.

Cette différence aiguë *versus* chronique a déjà été décrite pour le système pro/anti-oxydant après exposition à des métaux lourds. Dans le cas du cadmium, une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau hépatique est observée 6 heures après absorption (20 mg de Cd/kg de PC). En revanche, le taux de MDA diminue 48 heures après l'injection et aussi après 14 jours d'exposition *via* l'eau de boisson (10 mg Cd/kg de PC) (Djukic-Cosic *et al.* 2008). De même, lors d'une exposition au Cd *via* l'eau de boisson (10 et 100 mg de chlorure de Cd/L) chez la souris pendant 1, 8 et 23 semaines, une réponse biphasique a été décrite au niveau du foie et des reins.

Ainsi jusqu'à 8 semaines d'exposition, l'expression génique d'enzymes anti-oxydantes (Cu, Zn SOD, Prdx2) est augmentée. Après 23 semaines de contamination, d'autres enzymes anti-oxydantes sont augmentées (CAT, HO-1). Au cours de ces deux phases, les taux de GSH et de peroxydation lipidique restent inchangés (Thijssen *et al.* 2007). Des résultats similaires montrant une augmentation du glutathion ont été obtenus après 45 jours de contamination à différentes concentrations de chlorure de Cd (Mendieta-Wejebe *et al.* 2013).

Ces études et les nôtres montrent que les effets observés suite à une exposition chronique à un métal lourd ne correspondent pas à une addition de ceux décrits après exposition aiguë.

L'exposition chronique à l'uranium ne conduit pas à des effets induits par plusieurs expositions aiguës successives.

Les études précédemment citées sur une exposition au cadmium suggèrent que l'organisme met en place au cours du temps des mécanismes d'adaptation ou de compensation

Au regard des résultats obtenus au cours de ma thèse tant *in vivo* qu'*in vitro*, l'hypothèse de mécanismes d' adaptation peut également être émise dans le cas de l'uranium.

Ainsi, au niveau cellulaire, dans nos conditions expérimentales, un stress oxydant à partir de 500 µM d'uranium associé à une augmentation de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes a été observé. En revanche, pour des concentrations inférieures non toxiques, seule l'expression génique des enzymes anti-oxydantes est modifiée.

De même, les résultats obtenus *in vivo* montrent des modifications du système pro/anti-oxydant surtout aux fortes concentrations (26 mg/kg/j chez la souris et 8 et 40 mg/kg/j chez le rat) : diminution des TBARS, augmentation du glutathion, variation des activités enzymatiques. Aux concentrations inferieures, une augmentation rénale du glutathion ainsi que de rares diminutions de l'expression enzymes anti-oxydantes sont observées.

Par ailleurs, la réponse varie également en fonction du temps. Ainsi, nos analyses *in vitro* ont mis en évidence que la cellule n'induit pas une augmentation linéaire de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes (dont la CAT) au cours du temps.

En effet, jusquence que la cellule n'induit pas une augmentation linéaire de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes (donts d'exposition pour augmenter de nouveau après 24 heures d'exposition. Ces rfet, jusquence que la cellule n'induit pas une augmentation linéaire de l'expression génique des enzymes anti-oxydantes (donts d'exposition pour au

Les rfet, jusquence que la cellsées chez les rats suggèrent donc un renforcement du système anti-oxydant après contamination à l'uranium. La mise en place de mécanismes de compensation peut mettre en jeu différents acteurs. En cas d'exposition au Cd à de faibles concentrations, la voie de Nrf2 a notamment été évoquée (Liu *et al.* 2009).

La contamination chronique par l'uranium entraîne probablement la mise en place de mécanismes d'adaptation.

Nous nous sommes donc interrog l'uranium entraîne probablement la mise en place deu système anti-oxydant après contamination à l'uranium. La mise en place de mécanismes de compensation peut mettre en jeu différents acteurs. En cas d'exposition au Cd à de un modèle animal pour lequel le gène Nrf2 est inactivé.
Lous nous sommes donc interrog l'uranium entraîne probablement la mise en place deu système anti-oxydant après contamination à l'uranium. La mise en place de mécanismes de compensation peut mettre en entation de l'activité des enzymes anti-oxydantes GR et GPx chez les animaux ayant été contaminés *via* une eau de boisson c interrog l'uranium entraîne probablement la mise en place deu système anti-oxydant après contamination à l'uranium. La mise en place : nous n'observons pas d'effet synergique alors que l'accumulation d'uranium dans les organes est plus importante chez les animaux Nrf2 $^{-/-}$ que chez les animaux sauvages. Ces rium entraîne probablement la mise en place deu système anti-oxydant après contam après contamination chronique par l'uranium n'impliquerait pas spécifiquement la voie de Nrf2 ; ii) que l'inactivation de Nrf2 favorise l'accumulation d'uranium.

Par ailleurs, l'étude de Nrf2 dans les cellules a montré qu'une contamination par l'uranium induit uniquement des variations de son expression génique, son expression protéique restant inchangée. Ainsi, les variations d'expression génique et d'activité des enzymes anti-oxydantes observées suite à la contamination par l'uranium ne mettraient pas en jeu la voie du facteur de transcription Nrf2 alors qu'une accumulation tissulaire d'uranium plus importante est observée chez les souris KO Nrf2.
L'hypothèse que nous avions émise sur le rôle de Nrf2 dans la régulation du système pro/anti-oxydant après contamination chronique par l'uranium n'a donc pas été confirmée par les résultats expérimentaux de nos études.

Parmi les différents mécanismes d'adaptation mis en place par la cellule après exposition à des métaux lourds, le glutathion pourrait être impliqué (Aguirre *et al.* 2006 ; Di Toro *et al.* 2007 ; Liu *et al.* 2009). Cette hypothèse est corroborée par l'augmentation du glutathion total dans les tissus qui interroge quant au rôle du glutathion lors d'une contamination chronique à l'uranium.
Au niveau rénal, l'augmentation du glutathion est décrite après 3 mois de contamination à la plus forte concentration (400 mg/L soit 26,7 mg/kg/j). Après 9 mois de contamination, le taux de glutathion augmente de façon dose dépendante dès la dose de 1 mg/L. Les mesures d'activité de la GPx, GR et GST n'expliquent pas l'augmentation de glutathion que nous observons au niveau rénal, indiquant que d'autres enzymes sont à l'origine de cette augmentation
Dans le foie, l'augmentation du glutathion est observée uniquement chez les rats contaminés à 40 mg/kg/j (soit 600 mg/L) pendant 9 mois de contamination. Cette augmentation est confortée par une diminution de l'activité de la GST. Cela suggère que le glutathion synthétisé s'accumule au niveau hépatique afin de protéger l'organe des effets délétères de la contamination par l'uranium.
Afin d'apporter des explications permettant de comprendre ces résultats, il serait intéressant de poursuivre ces recherches par l'étude des enzymes de la synthèse du glutathion (GCL et GS), étude que nous n'avons pas pu mettre en place au cours de ma thèse. En effet, la GCL, qui permet la formation de gamma-glutamylcysteine est activée rapidement (quelques minutes) suite à un stress oxydant (Krejsa *et al.* 2010).

Il existe des modèles KO pour cette enzyme : il est possible d'inactiver l'une ou l'autre de ses isoformes (GCLM et GCLC) (Chen *et al.* 2013).
L'étude plus spécifique de la GCL pourrait conduire à déterminer si l'augmentation de glutathion est liée à une augmentation de sa synthèse.

Une telle augmentation du glutathion pourrait effectivement conduire à un effet protecteur vis-à-vis d'un stress oxydant induit par l'uranium. Ainsi, dans le cas d'une irradiation externe unique de 6 Gy, il a été montré qu'un prétraitement pendant 30 jours par le glutathion chez le rat entraînait une diminution de la peroxydation lipidique par rapport au groupe témoin, suggérant ainsi un effet radioprotecteur du glutathion (Cemek *et al.* 2006). L'effet radioprotecteur du GSH a également été décrit en tant que prétraitement chez souris avant qu'elles ne soient exposées aux rayons X (Mazur 2000) .
Dans ce travail de thèse, les animaux ou les cellules étaient contaminés à de l'uranium naturel ou appauvri, moins radioactifs que l'uranium enrichi. Les effets observés seraient donc principalement dus à sa toxicité chimique plus qu'à sa toxicité radiologique sans qu'il soit pour autant possible de discriminer les deux. Au regard des études précédemment citées où le rôle radioprotecteur du glutathion est suggéré, son augmentation dans nos études lui confèrerait un rôle bénéfique pour l'organisme envers la toxicité de l'uranium, qu'elle soit due à ses propriétés radioactives ou chimiques.

Par ailleurs, des études ont rapporté, après exposition chronique au cadmium, une augmentation du glutathion dans le foie et dans les reins liée à une diminution des effets pro-oxydants tels que la peroxydation lipidique (Kamiyama *et al.* 1995 ; Shaikh *et al.* 1999 ; Waisberg *et al.* 2003). En effet, après exposition pendant un an au Cd à faible concentration (i.p., 0,3 mg/kg ; 3 jours par semaine), alors qu'une accumulation rénale et hépatique est observée, une augmentation du taux de GSH dans les deux organes est rapportée sans aucune variation de la peroxydation lipidique (Kamiyama *et al.* 1995). Le GSH constituerait ainsi un moyen de défense envers la toxicité induite par le Cd après exposition chronique (Liu *et al.* 2009). Il inhiberait l'accumulation des complexes formés entre le Cd et les métallothionéines (MT), enzymes anti-oxydantes, ces complexes étant toxiques pour le rein (Liu *et al.* 2009 ; Tang *et al.* 1998). Dans le cas de l'uranium, il a été démontré, grâce à des techniques de fluorescence, que l'uranium se lie avec les MT (Michon *et al.* 2010).

Cette liaison pourrait expliquer qu'une diminution de l'expression génique des métallothionéines est observée au niveau rénal après injection unique d'uranium (i.p. 10 mg/kg), chez le rat (Hao *et al.* 2012b). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des MT après contamination chronique à l'uranium afin de déterminer si un mécanisme analogue à celui décrit pour le Cd est observé.

Le glutathion exerce un effet bénéfique après contamination chronique à l'uranium.

En raison du rôle-clé qu'aurait le glutathion parmi les mécanismes d'adaptation dans nos études chez l'animal, des études complémentaires sont prévues au niveau cellulaire telles que la mesure du taux de GSH dans les cellules exposées à l'uranium à différentes concentrations et à différents temps.

L'analyse des résultats obtenus lors de la cinétique réalisée sur les cellules hépatiques HepG2 décrit l'apparition de précipités au cours du temps dans le cytoplasme, suggérant la présence d'uranium dans le cytosol et/ou des organites dont les lysosomes dans lesquels l'accumulation d'uranium a déjà été rapportée (Galle 1997 ; Mirto *et al.* 1999b). Il serait intéressant d'étudier le réticulum endoplasmique et la mitochondrie de façon plus spécifique car ils présentent tous deux un rôle important dans l'équilibre pro/anti-oxydant de la cellule et la mise en place de mécanismes d'adaptation.
La mitochondrie est en effet un organite clé dans le système pro/anti-oxydant grâce à sa chaîne respiratoire où se passent des transferts d'électrons lors de la synthèse d'ATP. De plus, l'enzyme anti-oxydante Mn SOD, dont l'expression génique est augmentée pour des concentrations d'uranium supérieures à 500 µM, n'est produite que dans la mitochondrie. Lors d'une contamination à l'uranium, des effets sur la mitochondrie ont été décrits aussi bien chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Al Kaddissi *et al.* 2012b) que chez le rat (Pourahmad *et al.* 2006 ; Pourahmad *et al.* 2011 ; Shaki *et al.* 2012 ; Shaki *et al.* 2013). Shaki *et al.* ont réalisé des études plus spécifiques sur des mitochondries de rein et de cerveau de rats qui ont au préalable reçu une injection i.p. unique d'uranium (0,5 ; 1 et 2 mg/kg de PC) ainsi que sur des mitochondries de rat exposées directement pendant 1 heure à 50, 100 ou 200 µM d'uranium (Shaki *et al.* 2012 ; Shaki *et al.* 2013).

Au niveau rénal, ils ont ainsi montré que l'uranium entraînait des perturbations de la perméabilité membranaire mitochondriale, du transfert des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la production d'EROs par la mitochondrie (Shaki *et al.* 2012). Les auteurs suggèrent que les perturbations décrites au niveau de la mitochondrie dans le rein pourraient expliquer la néphrotoxicité de l'uranium. A l'instar de ces différentes études, il faudra étudier le rôle de la mitochondrie dans nos conditions expérimentales afin de déterminer si la mise en place des mécanismes d'adaptation fait également intervenir cet organite et si cela participe à l'absence de néphrotoxicité décrites dans nos conditions expérimentales.

Le second organite cité précédemment, le réticulum endoplasmique (RE), pourrait également être impliqué. Cet organite participe à la maturation et au repliement des protéines. Face à un stress physique ou chimique, le RE va tout d'abord mettre en place un mécanisme d'adaptation appelé « unfolded protein response » (UPR) en réduisant son activité pour empêcher la formation excessive de protéines mal conformées. Il aura donc un rôle protecteur pour la cellule. Si ce stress perdure, le RE va activer des mécanismes de mort cellulaire dont l'apoptose (Pallet *et al.* 2009 ; Sano *et al.* 2013). Le stress du RE est impliqué dans les néphrotoxicités induites par les métaux lourds bien que le mécanisme ne soit pas encore clairement connu (Hiramatsu *et al.* 2007b ; Liu *et al.* 2006 ; Pallet *et al.* 2009). Il apparaît donc particulièrement intéressant d'étudier si le RE est impliqué après exposition à l'uranium et s'il contribue *via* son mécanisme UPR à « contrôler » la réponse cellulaire comme cela est observé dans nos études *in vivo* et *in vitro*.

Ces deux organites constituent des perspectives de travail intéressantes non seulement de par leur rôle dans la régulation de l'équilibre pro/anti-oxydant mais également en raison de leur rôle possible dans l'accumulation d'uranium.

En conclusion, dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium, l'équilibre pro/anti-oxydant exerce un rôle de défense en instaurant des mécanismes d'adaptation à travers une augmentation de défenses anti-oxydantes -*a priori* sans mettre en jeu la voie de Nrf2- et une diminution de la peroxydation lipidique.

Afin d'approfondir les résultats obtenus au cours de cette thèse, différentes perspectives sont envisageables.

Ainsi, il apparait important d'étudier plus spécifiquement le rôle des transporteurs dans le cas d'une exposition à l'uranium au niveau cellulaire pour d'une part apporter des explications sur la différence d'accumulation entre les souris WT et KO Nrf2 ; et d'autre part pour approfondir les mécanismes d'entrée de l'uranium dans la cellule.

Il serait intéressant de compléter les études de localisation et d'accumulation de l'uranium au niveau cellulaire en étudiant tout particulièrement les deux organites précédemment cités : le RE et la mitochondrie. Une corrélation avec une étude des effets biologiques sur ces organites apporteraient en plus des explications sur l'équilibre pro/anti-oxydant après exposition à l'uranium.

Parmi les mécanismes d'adaptation évoqués après contamination à l'uranium, le rôle des MT a été suggéré. Une étude de leur expression génique et protéique permettra d'une part d'approfondir leur implication en cas de contamination chronique à l'uranium et d'autre part de mettre en évidence s'il existe un mécanisme analogue à celui décrit pour le Cd.

Le GSH serait aussi impliqué dans les mécanismes d'adaptation après contamination chronique à l'uranium. Il apparait nécessaire de compléter nos résultats en étudiant dans un premier temps, l'activité ou le taux protéiques des enzymes impliquées dans sa voie de synthèse et de mesurer dans un second temps, le taux de GSH chez les souris KO Nrf2 pour déterminer si lors de l'inactivation de Nrf2, le GSH exerce toujours un effet bénéfique pour l'organisme.

Dans un troisième temps et à plus long terme, il pourra être envisagé d'étudier plus spécifiquement le rôle de la GCL, enzyme de synthèse du GSH *via* un protocole de contamination chez des souris KO pour cette enzyme.

Le rôle protecteur du GSH après irradiation a soulevé la question dans le cas de l'uranium de sa double toxicité : chimique et radiologique. Afin d'essayer de distinguer les effets liés à la chimiotoxicité ou la radiotoxicité, des expérimentations notamment cellulaires pourront être réalisées en exposant les cellules soit à de l'UE, soit à de l'UA et de comparer les effets.

Enfin, en vue de modéliser au mieux une exposition environnementale dans la population générale, il sera intéressant de réaliser des études de multi-expositions.

CONCLUSION GENERALE

Suite à ce travail de thèse, les conclusions principales à retenir sont :

Après contamination chronique à l'uranium par ingestion d'eau de boisson chez le rongeur,

- ★ **L'accumulation d'uranium est :**
  - **Proportionnelle à la concentration administrée,**
    - **Chez les animaux contaminés à 600 mg/L d'uranium, la quantité d'uranium accumulée dans le rein est de 6 µg/g de rein.**
  - **plus importante chez les femelles que chez les mâles,**
  - **plus importante chez les souris KO Nrf2 que chez les souris sauvages.**
- ★ **L'uranium se localise préférentiellement dans le noyau des cellules des TCP même à fortes concentrations.**
- ★ **Aucune toxicité hépatique ou rénale n'est observée.**
- ★ **L'équilibre pro/anti-oxydant est modifié :**
  - **La contamination chronique par l'uranium entraîne une diminution de la peroxydation lipidique.**
  - **Le taux de GSH est augmenté de façon dépendante dans le rein après 9 mois de contamination.**
  - **L'augmentation du système anti-oxydant n'implique pas le facteur de transcription Nrf2.**

Après contamination à l'uranium de cellules hépatiques,

- ★ **L'uranium est présent dans le noyau sous forme soluble dès 30 minutes d'exposition.**
- ★ **La cellule met en place des mécanismes d'adaptation après exposition à de faibles concentrations d'uranium avec une activation du système anti-oxydant variant en fonction du temps.**
- ★ **Pour de fortes concentrations d'uranium, un stress oxydant est observé pouvant conduire à une cytotoxicité.**

Après contamination chronique, l'accumulation d'uranium est linéaire en fonction de la concentration. Suite à une contamination pendant 9 mois à la plus forte concentration- 600 mg/L soit 40 mg/kg/j- la quantité d'uranium mesurée dans le rein est de 6 µg/gramme de rein. Malgré cette valeur qui est le double de la valeur seuil à partir de laquelle sont décrits des effets néphrotoxiques après exposition aiguë, les différents paramètres biochimiques plasmatiques et urinaires mesurés sur ces animaux ainsi que l'analyse histologique du foie et du rein ont montré une absence de toxicité rénale et hépatique y compris à fortes concentrations.

Néanmoins, la contamination chronique à l'uranium entraîne une modification de l'équilibre pro/anti-oxydant se manifestant notamment par une diminution de la peroxydation lipidique et une augmentation du glutathion. Le renforcement du système anti-oxydant suggère donc que l'organisme met en place des mécanismes d'adaptation lors d'une contamination chronique à l'uranium.

Les études suivantes qui ont portées sur des souris KO Nrf2 dont les défenses anti-oxydantes sont amoindries ont montré une accumulation d'uranium plus importante chez les souris KO Nrf2 par rapport aux souris sauvages alors même que l'inactivation de Nrf2 n'induit pas d'effet synergique de l'uranium sur le système pro/anti-oxydant. La contamination chronique à l'uranium perturberait donc le système pro/anti-oxydant sans impliquer le facteur de transcription Nrf2.

Les études *in vitro* ont permis de préciser la cinétique d'entrée de l'uranium dans la cellule, en mettant en évidence la présence de l'uranium sous forme soluble dans le noyau dès 30 minutes, suivi par l'apparition de précipités au cours du temps et de la concentration croissante.

En accord avec les résultats des études réalisées chez l'animal, des mécanismes d'adaptation sont donc également mesurés après exposition à de faibles concentrations d'uranium dans les études *in vitro* réalisées sur des cellules hépatiques. Ces mécanismes décrits *in vitro* expliqueraient les effets observés *in vivo*. Ainsi, le système anti-oxydant serait un moyen de défense qui permettrait une adaptation de la cellule ou des tissus dans le cas d'une contamination chronique à l'uranium à faible concentration.

Les résultats obtenus durant ce travail de thèse ouvrent de nouvelles voies de recherche notamment au sujet et des mécanismes d'adaptation mis en place suite à une exposition chronique à l'uranium tant au niveau *vivo* que *vitro* tels que l'étude des métallothionéines ou du glutathion.

VALORISATIONS

I. Publications

A. Publiées

Elucidation of the decomposition pathways of protonated and deprotonated estrone ions: application to the identification of photolysis products.
Bourcier S, Poisson C, Souissi Y, Kinani S, Bouchonnet S, Sablier M. Rapid Communication in Mass Spectrometry. 2010; 24: 2999–3010

Antioxidative status in rat kidney after co-exposure to uranium and gentamicin. Poisson C., Rouas C., Grandcolas L., Dublineau I., Gueguen Y. Human and Experimental Toxicology. 2013 Jul 30.

B. En cours de révision ou de rédaction

Uranium chronic exposure dose-dependently induced glutathione in absence of nephrotoxicity in rat. Poisson C., Stefani J., Manens L., Delissen O., Suhard D., Tessier C., Dublineau I., Gueguen Y. *Toxicology, en révision*.

Implication of Nrf2 pathway after uranium contamination in Nrf2 KO Model.
Poisson C., Ocadiz A., Delissen O., Elie C., Suhard D., Tessier C., Dublineau I., Gueguen Y. *En préparation*

Uranium localization and stress cell effects as function of time in HepG2 cells
Gueguen Y. Suhard D., Poisson C., Manens L., Elie C., Landon G., Bouvier C., Rouas C., Tessier C. *En préparation*

II. Communications

A. Affichées

Etude de l'effet-dose d'une contamination chronique par l'uranium appauvri sur différents marqueurs du stress oxydant au niveau rénal chez le rat, Journées de l'Ecole Doctorale, Chatenay-Malabry, 23-24 mai 2011.

Anti-oxidative status in kidney after gentamicin treatment in rats chronically contaminated to depleted uranium, Eurotox, Paris, 28-31 août 2011.

Effects of uranium on cellular stress, Society of Toxicology, San Francisco, 11-15 mars 2012.

Effect of Uranium chronic exposure on oxidative stress in rat kidney, Lowrad, Lyon, 17-18 décembre 2012.

Etude de marqueurs de stress cellulaire suite à une cinétique d'exposition à l'uranium sur une lignée de cellules hépatiques, SPTC, Chatenay-Malabry, 6-7 Juin 2013.

B. Orales

Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'Uranium après exposition chronique, Journées des thèses de l'IRSN, Le Croisic, Octobre 2012

Effect of Uranium chronic exposure on oxidative stress in rat kidney, DOREMI Meeting, Paris, 22-24 Janvier 2013.

Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'Uranium après exposition chronique, Journées de l'Ecole Doctorale, Le Kremlin-Bicêtre, 17-18 Juin 2013.

Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'Uranium après exposition chronique, Journées des thèses de l'IRSN, Presqu'île de Giens, Octobre 2013.

ANNEXES

I. Annexe I : Elucidation of the decomposition pathways of protonated and deprotonated estrone ions: application to the identification of photolysis products.

II. Annexe II : Antioxidative status in rat kidney after co-exposure to uranium and gentamicin.

III. Annexe III : Chronic Uranium Exposure Dose-Dependently Induces Glutathione in Rats without any Nephrotoxicity.

BIBLIOGRAPHIE

Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y. W., Llados, F., Diamond, G., Sage, G., Citra, M., Quinones, A., Bosch, S. J. and Swarts, S. G. (2007). Toxicological Profile for Lead.

Abou-Donia, M. B., Dechkovskaia, A. M., Goldstein, L. B., Shah, D. U., Bullman, S. L. and Khan, W. A. (2002). "Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats." Pharmacol Biochem Behav 72(4): 881-890.

AFFSA (2010). Avis relatif à la détermination d'une exigence de qualité en uranium pondéral dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Aguirre, P., Mena, N., Tapia, V., Rojas, A., Arredondo, M. and Nunez, M. T. (2006). "Antioxidant responses of cortex neurons to iron loading." Biol Res 39(1): 103-104.

Al Kaddissi, S., Frelon, S., Elia, A. C., Legeay, A., Gonzalez, P., Coppin, F., Orjollet, D., Camilleri, V., Beaugelin-Seiller, K., Gilbin, R. and Simon, O. (2012a). "Are antioxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in the crayfish Procambarus clarkii?" Ecotoxicol Environ Saf 80: 266-272.

Al Kaddissi, S., Legeay, A., Elia, A. C., Gonzalez, P., Camilleri, V., Gilbin, R. and Simon, O. (2012b). "Effects of uranium on crayfish Procambarus clarkii mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?" Ecotoxicol Environ Saf 78: 218-224.

Aleksunes, L. M., Goedken, M. J., Rockwell, C. E., Thomale, J., Manautou, J. E. and Klaassen, C. D. (2010). "Transcriptional regulation of renal cytoprotective genes by Nrf2 and its potential use as a therapeutic target to mitigate cisplatin-induced nephrotoxicity." J Pharmacol Exp Ther 335(1): 2-12.

Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A 78(11): 6858-6862.

Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., Livera, G. and Rouiller-Fabre, V. (2011). "In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells." Reprod Toxicol 31(4): 470-476.

Archer, V. E., Renzetti, A. D., Doggett, R. S., Jarvis, J. Q. and Colby, T. V. (1998). "Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners." J Occup Environ Med 40(5): 460-474.

Arnault, E., Doussau, M., Pesty, A., Gouget, B., Van der Meeren, A., Fouchet, P. and Lefevre, B. (2008). "Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro." Toxicology 247(2-3): 80-87.

Arner, E. S. and Holmgren, A. (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem 267(20): 6102-6109.

Arzuaga, X., Rieth, S. H., Bathija, A. and Cooper, G. S. (2010). "Renal effects of exposure to natural and depleted uranium: a review of the epidemiologic and experimental data." J Toxicol Environ Health B Crit Rev 13(7-8): 527-545.

ATSDR (2013). Toxicological Profile for Uranium Public health service Atlanta

Banday, A. A., Priyamvada, S., Farooq, N., Yusufi, A. N. and Khan, F. (2008). "Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues." Food Chem Toxicol 46(6): 2080-2088.

Barber, D. S., Hancock, S. K., McNally, A. M., Hinckley, J., Binder, E., Zimmerman, K., Ehrich, M. F. and Jortner, B. S. (2007). "Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress." Neurotoxicology 28(6): 1110-1119.

Barillet, S., Adam, C., Palluel, O. and Devaux, A. (2007). "Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in Danio rerio exposed to different isotopic compositions of uranium." Environ Toxicol Chem 26(3): 497-505.

Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J. M. and Devaux, A. (2011). "Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (Danio rerio) after a depleted uranium waterborne exposure." Environ Pollut 159(2): 495-502.

Basset, C., Averseng, O., Ferron, P. J., Richaud, N., Hagege, A., Pible, O. and Vidaud, C. (2013). "Revision of the biodistribution of uranyl in serum: is fetuin-A the major protein target?" Chem Res Toxicol 26(5): 645-653.

Behrend, L., Henderson, G. and Zwacka, R. M. (2003). "Reactive oxygen species in oncogenic transformation." Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1441-1444.

Belles, M., Linares, V., Luisa Albina, M., Sirvent, J., Sanchez, D. J. and Domingo, J. L. (2007). "Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats." J Pineal Res 43(1): 87-95.

Benabe, J. E., Klahr, S., Hoffman, M. K. and Morrison, A. R. (1980). "Production of thromboxane A2 by the kidney in glycerol-induced acute renal failure in the rabbit." Prostaglandins 19(3): 333-347.

Bensaad, K. and Vousden, K. H. (2005). "Savior and slayer: the two faces of p53." Nat Med 11(12): 1278-1279.

Bensoussan, H., Grancolas, L., Dhieux-Lestaevel, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., Taouis, M. and Lestaevel, P. (2009). "Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure." Toxicology 261(1-2): 59-67.

Bentinger, M., Tekle, M. and Dallner, G. (2010). "Coenzyme Q--biosynthesis and functions." Biochem Biophys Res Commun 396(1): 74-79.

Bernhard, G. (2005). "Speciation of uranium in environmental relevant compartments." Landbauforschung Volkenrode 55(3): 139-148.

Berradi, H., Bertho, J. M., Dudoignon, N., Mazur, A., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Voisin, P., Gourmelon, P. and Dublineau, I. (2008). "Renal anemia induced by chronic ingestion of depleted uranium in rats." Toxicol Sci 103(2): 397-408.

Bertin, G. and Averbeck, D. (2006). "Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)." Biochimie 88(11): 1549-1559.

Bertrais, S., Preziosi, P., Mennen, L., Galan, P., Hercberg, S. and Oppert, J. M. (2004). "Sociodemographic and geographic correlates of meeting current recommendations for physical activity in middle-aged French adults: the Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants (SUVIMAX) Study." Am J Public Health 94(9): 1560-1566.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G. and Gluud, C. (2004). "Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis." Lancet 364(9441): 1219-1228.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G. and Gluud, C. (2008). "Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements." Aliment Pharmacol Ther 28(6): 689-703.

Boice, J. D., Jr., Mumma, M., Schweitzer, S. and Blot, W. J. (2003). "Cancer mortality in a Texas county with prior uranium mining and milling activities, 1950-2001." J Radiol Prot 23(3): 247-262.

Boice, J. D., Jr., Mumma, M. T. and Blot, W. J. (2007). "Cancer and noncancer mortality in populations living near uranium and vanadium mining and milling operations in Montrose County, Colorado, 1950-2000." Radiat Res 167(6): 711-726.

Boice, J. D., Jr., Cohen, S. S., Mumma, M. T., Chadda, B. and Blot, W. J. (2008). "A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005." J Radiol Prot 28(3): 303-325.

Boice, J. D., Jr., Cohen, S. S., Mumma, M. T., Ellis, E. D., Eckerman, K. F., Leggett, R. W., Boecker, B. B., Brill, A. B. and Henderson, B. E. (2011). "Updated mortality analysis of radiation workers at Rocketdyne (Atomics International), 1948-2008." Radiat Res 176(2): 244-258.

Boileau, L. J. R., Nieboer, E. and Richardson, D. H. S. (1985). "Uranium accumulation in the lichen Cladonia rangiferina. Part I. Uptake of cationic, neutral, and anionic forms of the uranyl ion." Canadian Journal of Botany 63(3): 384-389.

Bonnefont-Rousselot, D., Beaudeux, J. L., Therond, P., Peynet, J., Legrand, A. and Delattre, J. (2004). "[Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts]." Ann Pharm Fr 62(3): 147-157.

Bonventre, J. V. and Yang, L. (2010). "Kidney injury molecule-1." Curr Opin Crit Care 16(6): 556-561.

Brady, H. R., Kone, B. C., Brenner, R. M. and Gullans, S. R. (1989). "Early effects of uranyl nitrate on respiration and K+ transport in rabbit proximal tubule." Kidney Int 36(1): 27-34.

Brigelius-Flohe, R. and Traber, M. G. (1999). "Vitamin E: function and metabolism." FASEB J 13(10): 1145-1155.

Briner, W. and 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(1): 135-144.

Bussy, C., Lestaevel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P. and Houpert, P. (2006). "Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain." Neurotoxicology 27(2): 245-252.

Canu, I. G., Laurent, O., Pires, N., Laurier, D. and Dublineau, I. (2011). "Health Effects of Naturally Radioactive Water Ingestion: The Need for Enhanced Studies." Environmental health perspectives 119(12): 1676-1680.

Cardozo, L. F., Pedruzzi, L. M., Stenvinkel, P., Stockler-Pinto, M. B., Daleprane, J. B., Leite, M., Jr. and Mafra, D. (2013). "Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2." Biochimie 95(8): 1525-1533.

Carriere, M., Avoscan, L., Collins, R., Carrot, F., Khodja, H., Ansoborlo, E. and Gouget, B. (2004). "Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity." Chem Res Toxicol 17(3): 446-452.

Carrière, M., Gouget, B., Gallien, J. P., Avoscan, L., Gobin, R., Verbavatz, J. M. and Khodja, H. (2005). "Cellular distribution of uranium after acute exposure of renal epithelial cells: SEM, TEM and nuclear microscopy analysis." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 231(1-4): 268-273.

Carrière, M., Proux, O., Milgram, S., Thiebault, C., Avoscan, L., Barre, N., Den Auwer, C. and Gouget, B. (2008). "Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine

structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells." Journal of Biological Inorganic Chemistry 13(5): 655-662.

Cemek, M., Enginar, H., Karaca, T. and Unak, P. (2006). "In vivo radioprotective effects of Nigella sativa L oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats." Photochem Photobiol 82(6): 1691-1696.

Chan, K., Han, X. D. and Kan, Y. W. (2001). "An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen." Proc Natl Acad Sci U S A 98(8): 4611-4616.

Chaudhari, M., Jayaraj, R., Santhosh, S. R. and Rao, P. V. (2009). "Oxidative damage and gene expression profile of antioxidant enzymes after T-2 toxin exposure in mice." J Biochem Mol Toxicol 23(3): 212-221.

Chen, C. F., Tsai, S. Y., Ma, M. C. and Wu, M. S. (2003). "Hypoxic preconditioning enhances renal superoxide dismutase levels in rats." J Physiol 552(Pt 2): 561-569.

Chen, Y., Dong, H., Thompson, D. C., Shertzer, H. G., Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2013). "Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models." Food Chem Toxicol 60: 38-44.

Cherubini, A., Vigna, G. B., Zuliani, G., Ruggiero, C., Senin, U. and Fellin, R. (2005). "Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update." Curr Pharm Des 11(16): 2017-2032.

Chung, H. J. and Lee, M. G. (2006). "Pharmacokinetic changes of ipriflavone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate." Biopharm Drug Dispos 27(7): 345-351.

Chung, W., Kim, E. J., Lee, I., Kim, S. G., Lee, M. G. and Kim, S. H. (2003). "Effects of recombinant human growth hormone on the pharmacokinetics of intravenous chlorzoxazone in rats with acute renal failure induced by uranyl nitrate." Life Sci 73(3): 253-263.

Clerc, J., Fourre, C. and Fragu, P. (1997). "SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds." Cell Biol Int 21(10): 619-633.

Cooper, J. R., Stradling, G. N., Smith, H. and Ham, S. E. (1982). "The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 41(4): 421-433.

Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H. and Abou-Donia, M. (2004). "Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects." J Toxicol Environ Health B Crit Rev 7(4): 297-317.

Cui, W., Li, B., Bai, Y., Miao, X., Chen, Q., Sun, W., Tan, Y., Luo, P., Zhang, C., Zheng, S., Epstein, P. N., Miao, L. and Cai, L. (2013). "Potential role for Nrf2 activation in the therapeutic effect of MG132 on diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice." Am J Physiol Endocrinol Metab 304(1): E87-99.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J. and Smeets, K. (2010). "Cadmium stress: an oxidative challenge." Biometals 23(5): 927-940.

Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M. and Castanas, E. (2000). "Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells." J Cell Biochem 78(3): 429-441.

De Rey, B. M., Lanfranchi, H. E. and Cabrini, R. L. (1983). "Percutaneous absorption of uranium compounds." Environmental Research 30(2): 480-491.

Delattre, J., Beaudeux, J.-L. and Bonnefont-Rousselot, D., Eds. (2007). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques.

Deponte, M. (2013). "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes." Biochim Biophys Acta 1830(5): 3217-3266.

Desmots, F., Rissel, M., Loyer, P., Turlin, B. and Guillouzo, A. (2001). "Immunohistological analysis of glutathione transferase A4 distribution in several human tissues using a specific polyclonal antibody." J Histochem Cytochem 49(12): 1573-1580.

Di Toro, C. G., Di Toro, P. A., Zieher, L. M. and Guelman, L. R. (2007). "Sensitivity of cerebellar glutathione system to neonatal ionizing radiation exposure." Neurotoxicology 28(3): 555-561.

Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M. and Baggs, R. B. (1989). "Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat." Fundam Appl Toxicol 13(1): 65-78.

Diaz Sylvester, P. L., Lopez, R., Ubios, A. M. and Cabrini, R. L. (2002). "Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation." Arch Environ Health 57(4): 320-325.

Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L. Y. and Zhang, Z. (2013). "Protection of dietary polyphenols against oral cancer." Nutrients 5(6): 2173-2191.

Djukic-Cosic, D., Curcic Jovanovic, M., Plamenac Bulat, Z., Ninkovic, M., Malicevic, Z. and Matovic, V. (2008). "Relation between lipid peroxidation and iron concentration in mouse liver after acute and subacute cadmium intoxication." J Trace Elem Med Biol 22(1): 66-72.

Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M. and Corbella, J. (1987). "Acute toxicity of uranium in rats and mice." Bull Environ Contam Toxicol 39(1): 168-174.

Doyle, P., Maconochie, N., Roman, E., Davies, G., Smith, P. G. and Beral, V. (2000). "Fetal death and congenital malformation in babies born to nuclear industry employees: report from the nuclear industry family study." Lancet 356(9238): 1293-1299.

Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev 82(1): 47-95.

Dublineau, I., Grison, S., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J. and Gourmelon, P. (2005). "Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat." Int J Radiat Biol 81(6): 473-482.

Dublineau, I., Grison, S., Linard, C., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J. and Gourmelon, P. (2006). "Short-term effects of depleted uranium on immune status in rat intestine." J Toxicol Environ Health A 69(17): 1613-1628.

Dublineau, I., Grandcolas, L., Grison, S., Baudelin, C., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J. and Gourmelon, P. (2007). "Modifications of inflammatory pathways in rat intestine following chronic ingestion of depleted uranium." Toxicol Sci 98(2): 458-468.

Ekstrand, J., Nielsen, J. B., Havarinasab, S., Zalups, R. K., Söderkvist, P. and Hultman, P. (2010). "Mercury toxicokinetics—dependency on strain and gender." Toxicology and Applied Pharmacology 243(3): 283-291.

Feugier, A., Frelon, S., Gourmelon, P. and Claraz, M. (2008). "Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium." Reprod Toxicol 26(3-4): 273-277.

Fitsanakis, V. A., Erikson, K. M., Garcia, S. J., Evje, L., Syversen, T. and Aschner, M. (2006). "Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets." Biol Trace Elem Res 111(1-3): 185-197.

Frelon, S., Houpert, P., Lepetit, D. and Paquet, F. (2005). "The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats." Chem Res Toxicol 18(7): 1150-1154.

Fukuda, S., Ikeda, M., Chiba, M. and Kaneko, K. (2006). "Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium." Radiat Prot Dosimetry 118(3): 307-314.

Galle, P., Ed. (1997). Toxiques nucléaires.

Ghadially, F. N., Lalonde, J. M. and Yang-Steppuhn, S. (1982a). "Uraniosomes produced in cultured rabbit kidney cells by uranyl acetate." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 39(1): 21-30.

Ghadially, F. N., Lalonde, J. M. and Yong, N. K. (1982b). "Uraniosomes produced in the synovial membrane by uranyl acetate." Pathology 14(2): 121-127.

Ghadially, F. N., Yang-Steppuhn, S. E. and Lalonde, J. M. (1982c). "The effect of uranyl acetate on human lymphoblastoid cells (RPMI 6410) and HeLa cells." Br J Exp Pathol 63(3): 227-234.

Ghosh, S., Kumar, A., Pandey, B. N. and Mishra, K. P. (2007). "Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat." J Environ Pathol Toxicol Oncol 26(4): 255-261.

Gilman, A. P., Moss, M. A., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Long, G. and Valli, V. E. (1998a). "Uranyl nitrate: 91-day exposure and recovery studies in the male New Zealand white rabbit." Toxicol Sci 41(1): 138-151.

Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., Willes, R. J. and Moss, M. A. (1998b). "Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat." Toxicol Sci 41(1): 117-128.

Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., Sweetser, M. T., Yang, M., Sheikh, S. I. and Dawson, K. T. (2012). "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med 367(12): 1098-1107.

Goldman, M., Yaari, A., Doshnitzki, Z., Cohen-Luria, R. and Moran, A. (2006). "Nephrotoxicity of uranyl acetate: effect on rat kidney brush border membrane vesicles." Arch Toxicol 80(7): 387-393.

Griffith, O. and Meister, A. (1979). "Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase as a discrete step in the gamma-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76(1): 268-272.

Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. and Jozkowicz, A. (2012). "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology." Clin Sci (Lond) 122(3): 93-103.

Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2006a). "[Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]." Ann Biol Clin (Paris) 64(6): 535-548.

Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P. and Aigueperse, J. (2006b). "Short-term hepatic effects of

depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat." Arch Toxicol 80(4): 187-195.

Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J. R., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2007). "Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium." Toxicology 229(1-2): 62-72.

Gueguen, Y., Rouas, C. and Leblond, F. A. (2012). "[Kidney injury biomarkers]." Nephrol Ther 8(3): 146-155.

Gueguen, Y., Rouas, C., Monin, A., Manens, L., Stefani, J., Delissen, O., Grison, S. and Dublineau, I. (2013). "Molecular, cellular, and tissue impact of depleted uranium on xenobiotic-metabolizing enzymes." Arch Toxicol.

Gulcin, I. (2012). "Antioxidant activity of food constituents: an overview." Arch Toxicol 86(3): 345-391.

Guseva Canu, I., Garsi, J. P., Caer-Lorho, S., Jacob, S., Collomb, P., Acker, A. and Laurier, D. (2012). "Does uranium induce circulatory diseases? First results from a French cohort of uranium workers." Occup Environ Med 69(6): 404-409.

Hahn, F. F., Guilmette, R. A. and Hoover, M. D. (2002). "Implanted depleted uranium fragments cause soft tissue sarcomas in the muscles of rats." Environ Health Perspect 110(1): 51-59.

Hakonson-Hayes, A. C., Fresquez, P. R. and Whicker, F. W. (2002). "Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water." J Environ Radioact 59(1): 29-40.

Haley, D. P., Bulger, R. E. and Dobyan, D. C. (1982). "The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 41(1-2): 181-192.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol 186: 1-85.

Hao, Y., Li, R., Leng, Y., Ren, J., Liu, J., Ai, G., Xu, H., Su, Y. and Cheng, T. (2009). "A study assessing the genotoxicity in rats after chronic oral exposure to a low dose of depleted uranium." J Radiat Res 50(6): 521-528.

Hao, Y., Li, R., Leng, Y., Ren, J., Liu, J., Ai, G., Xu, H., Su, Y. and Cheng, T. (2012a). "The reproductive effects in rats after chronic oral exposure to low-dose depleted uranium." J Radiat Res 53(3): 377-384.

Hao, Y., Ren, J., Liu, J., Luo, S., Ma, T., Li, R. and Su, Y. (2012b). "The protective role of zinc against acute toxicity of depleted uranium in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol 111(6): 402-410.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol 11(3): 298-300.

Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y. and Noguchi, M. (2004). "Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene." Gene 336(2): 241-250.

Hemadi, M., Ha-Duong, N. T. and El Hage Chahine, J. M. (2011). "Can uranium be transported by the iron-acquisition pathway? Ur uptake by transferrin." J Phys Chem B 115(14): 4206-4215.

Hindin, R., Brugge, D. and Panikkar, B. (2005). "Teratogenicity of depleted uranium aerosols: a review from an epidemiological perspective." Environ Health 4: 17.

Hiramatsu, K., Asaba, Y., Takeshita, S., Nimura, Y., Tatsumi, S., Katagiri, N., Niida, S., Nakajima, T., Tanaka, S., Ito, M., Karsenty, G. and Ikeda, K. (2007a). "Overexpression

of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis." Endocrinology 148(6): 2708-2715.

Hiramatsu, N., Kasai, A., Du, S., Takeda, M., Hayakawa, K., Okamura, M., Yao, J. and Kitamura, M. (2007b). "Rapid, transient induction of ER stress in the liver and kidney after acute exposure to heavy metal: evidence from transgenic sensor mice." FEBS Lett 581(10): 2055-2059.

Hockenberry, M. J., Taylor, O. A., Gundy, P. M., Ross, A. K., Pasvogel, A., Montgomery, D., Ribbeck, P., McCarthy, K. and Moore, I. (2013). "F2-Isoprostanes: A Measure of Oxidative Stress in Children Receiving Treatment for Leukemia." Biol Res Nurs 15: 15.

Homma-Takeda, S., Kokubo, T., Terada, Y., Suzuki, K., Ueno, S., Hayao, T., Inoue, T., Kitahara, K., Blyth, B. J., Nishimura, M. and Shimada, Y. (2013). "Uranium dynamics and developmental sensitivity in rat kidney." J Appl Toxicol 33(7): 685-694.

Hori, R., Takano, M., Okano, T. and Inui, K. (1985). "Transport of p-aminohippurate, tetraethylammonium and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure." J Pharmacol Exp Ther 233(3): 776-781.

Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F. and Gourmelon, P. (2005). "Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat." Neurotoxicology 26(6): 1015-1020.

Hsu, T. C., Young, M. R., Cmarik, J. and Colburn, N. H. (2000). "Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis." Free Radic Biol Med 28(9): 1338-1348.

Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K. and McCord, J. M. (2011). "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." Mol Aspects Med 32(4-6): 234-246.

Ibanez, C., Suhard, D., Tessier, C., Delissen, O., Lestaevel, P., Dublineau, I. and Gourmelon, P. (2013). "Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles." Neuropathol Appl Neurobiol.

ICRP (1995a). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides : Part 3, Ingestion dose coefficients. ICRP Publication 69, Oxford

ICRP (1995b). Age-dependent doses to members of the public from intake radionuclides: Part 4, Inhalation dose coefficients. ICRP Publication 71, Oxford.

IRSN, I. d. R. e. d. S. N. (2011). Bilan: La qualité radiologique de l'eau mise en distribution en France 2008-2009

Itoh, M., Oh-Ishi, S., Hatao, H., Leeuwenburgh, C., Selman, C., Ohno, H., Kizaki, T., Nakamura, H. and Matsuoka, T. (2004). "Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287(1): R33-38.

Jomova, K. and Valko, M. (2011). "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease." Toxicology 283(2-3): 65-87.

Juntunen, R. (1991). Uranium and radon in wells drilled into bedrock in southern Finland.

Kalinich, J. F., Ramakrishnan, N., Villa, V. and McClain, D. E. (2002). "Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages." Toxicology 179(1-2): 105-114.

Kamiyama, T., Miyakawa, H., Li, J. P., Akiba, T., Liu, J. H., Liu, J., Marumo, F. and Sato, C. (1995). "Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels." Res Commun Mol Pathol Pharmacol 88(2): 177-186.

Kanki, K., Umemura, T., Kitamura, Y., Ishii, Y., Kuroiwa, Y., Kodama, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2008). "A possible role of nrf2 in prevention of renal oxidative damage by ferric nitrilotriacetate." Toxicol Pathol 36(2): 353-361.

Kato, A., Hishida, A. and Nakajima, T. (1994). "Effects of oxygen free radical scavengers on uranium-induced acute renal failure in rats." Free Radic Biol Med 16(6): 855-859.

Kimura, A., Ishida, Y., Hayashi, T., Wada, T., Yokoyama, H., Sugaya, T., Mukaida, N. and Kondo, T. (2006). "Interferon-gamma plays protective roles in sodium arsenite-induced renal injury by up-regulating intrarenal multidrug resistance-associated protein 1 expression." Am J Pathol 169(4): 1118-1128.

Kitamura, Y., Umemura, T., Kanki, K., Kodama, Y., Kitamoto, S., Saito, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Masegi, T., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2007). "Increased susceptibility to hepatocarcinogenicity of Nrf2-deficient mice exposed to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline." Cancer Sci 98(1): 19-24.

Klaassen, C. D. and Reisman, S. A. (2010). "Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver." Toxicol Appl Pharmacol 244(1): 57-65.

Kobayashi, S., Nagase, M., Honda, N. and Hishida, A. (1984). "Glomerular alterations in uranyl acetate-induced acute renal failure in rabbits." Kidney Int 26(6): 808-815.

Koizumi, N., Murata, K., Hayashi, C., Nishio, H. and Goji, J. (2008). "High cadmium accumulation among humans and primates: comparison across various mammalian species--a study from Japan." Biol Trace Elem Res 121(3): 205-214.

Krejsa, C. M., Franklin, C. C., White, C. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L. and Kavanagh, T. J. (2010). "Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress." J Biol Chem 285(21): 16116-16124.

Krunic, A., Haveric, S. and Ibrulj, S. (2005). "Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium." Arh Hig Rada Toksikol 56(3): 227-232.

Kundt, M. S., Martinez-Taibo, C., Muhlmann, M. C. and Furnari, J. C. (2009). "Uranium in drinking water: effects on mouse oocyte quality." Health Phys 96(5): 568-574.

Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S. B., Penttila, I. M. and Komulainen, H. (2002). "Renal effects of uranium in drinking water." Environ Health Perspect 110(4): 337-342.

Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A. and Saha, H. (2005). "Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water." Environ Health Perspect 113(1): 68-72.

Kurttio, P., Harmoinen, A., Saha, H., Salonen, L., Karpas, Z., Komulainen, H. and Auvinen, A. (2006). "Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water." Am J Kidney Dis 47(6): 972-982.

Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. (2003). "Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway." Mol Cell Biol 23(23): 8786-8794.

Kwon, M. J., Kim, B., Lee, Y. S. and Kim, T. Y. (2012). "Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation." J Dermatol Sci 67(2): 81-87.

La Touche, Y. D., Willis, D. L. and Dawydiak, O. I. (1987). "Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution." Health Phys 53(2): 147-162.

Laliberte, J. and Labbe, S. (2008). "[The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]." Med Sci (Paris) 24(3): 277-283.

Lang, S., Kosma, V. M., Kumlin, T., Halinen, A., Salonen, R. O., Servomaa, K., Rytomaa, T. and Ruuskanen, J. (1994). "Distribution and short-term effects of intratracheally instilled neutron-irradiated UO2 particles in the rat." Environ Res 65(1): 119-131.

Langmuir, D. (1978). "Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposit." Geochemica and Cosmochimica Acta 42: 547-569.

Lawal, A. O. and Ellis, E. (2010). "Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK 293 to cadmium." J Toxicol Sci 35(4): 465-478.

Lee, J. M., Li, J., Johnson, D. A., Stein, T. D., Kraft, A. D., Calkins, M. J., Jakel, R. J. and Johnson, J. A. (2005a). "Nrf2, a multi-organ protector?" FASEB J 19(9): 1061-1066.

Lee, J. S. and Surh, Y. J. (2005b). "Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention." Cancer Lett 224(2): 171-184.

Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J. P., Therond, P. and Torreilles, J. (1998). "[Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]." Ann Biol Clin (Paris) 56(3): 305-319.

Leggett, R. W. (1989). "The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment." Health Phys 57(3): 365-383.

Leggett, R. W. (1994). "Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium." Health Phys 67(6): 589-610.

Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C. and Scherrmann, J. M. (2003). "Study of uranium transfer across the blood-brain barrier." Radiat Prot Dosimetry 105(1-4): 243-245.

Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P. and Gourmelon, P. (2005). "Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats." Neurotoxicol Teratol 27(6): 835-840.

Lestaevel, P., Romero, E., Dhieux, B., Ben Soussan, H., Berradi, H., Dublineau, I., Voisin, P. and Gourmelon, P. (2009). "Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats." Toxicology 258(1): 1-9.

Letonturier, P. (2002). "Growing old gracefully." Pour un vieillissement réussi 31(25): 1173.

Levine, A. J. and Oren, M. (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." Nat Rev Cancer 9(10): 749-758.

Lillig, C. H., Berndt, C. and Holmgren, A. (2008). "Glutaredoxin systems." Biochim Biophys Acta 1780(11): 1304-1317.

Lillig, C. H. and Berndt, C. (2013). "Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange." Antioxid Redox Signal 18(13): 1654-1665.

Lin-Shiau, S. Y., Fu, W. M. and Lee, C. Y. (1979). "Effects of uranyl lons on neuromuscular transmission of chick biventer cervicis muscle." Arch Int Pharmacodyn Ther 241(2): 332-343.

Lin, J. H. and Levy, G. (1982). "Effect of experimental renal failure on sulfate retention and acetaminophen pharmacokinetics in rats." J Pharmacol Exp Ther 221(1): 80-84.

Linares, V., Albina, M. L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D. J. and Domingo, J. L. (2005). "Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction." Toxicol Lett 158(3): 186-195.

Linares, V., Belles, M., Albina, M. L., Sirvent, J. J., Sanchez, D. J. and Domingo, J. L. (2006). "Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats." Toxicol Lett 167(2): 152-161.

Linares, V., Sanchez, D. J., Belles, M., Albina, L., Gomez, M. and Domingo, J. L. (2007). "Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress." Toxicology 236(1-2): 82-91.

Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. (1982). "DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation." Arch Biochem Biophys 216(1): 178-185.

Liu, F., Inageda, K., Nishitai, G. and Matsuoka, M. (2006). "Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells." Environ Health Perspect 114(6): 859-864.

Liu, J., Qu, W. and Kadiiska, M. B. (2009). "Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis." Toxicol Appl Pharmacol 238(3): 209-214.

Liu, J., Wu, K. C., Lu, Y. F., Ekuase, E. and Klaassen, C. D. (2013). "Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants." Oxid Med Cell Longev 2013: 305861.

Lu, S. C. (2009). "Regulation of glutathione synthesis." Mol Aspects Med 30(1-2): 42-59.

Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." Biochim Biophys Acta 1830(5): 3143-3153.

Lungato, L., Marques, M. S., Pereira, V. G., Hix, S., Gazarini, M. L., Tufik, S. and D'Almeida, V. (2013). "Sleep deprivation alters gene expression and antioxidant enzyme activity in mice splenocytes." Scand J Immunol 77(3): 195-199.

Luo, Z. F., Qi, W., Feng, B., Mu, J., Zeng, W., Guo, Y. H., Pang, Q., Ye, Z. L., Liu, L. and Yuan, F. H. (2011). "Prevention of diabetic nephropathy in rats through enhanced renal antioxidative capacity by inhibition of the proteasome." Life Sci 88(11-12): 512-520.

Lyoumi, S., Tamion, F., Leplingard, A., Beaumont, C., Puy, H. and Lebreton, J. P. (2007). "Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème." Hématologie 13(4): 251-265.

Ma, Q. (2013). "Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol 53: 401-426.

Magdo, H. S., Forman, J., Graber, N., Newman, B., Klein, K., Satlin, L., Amler, R. W., Winston, J. A. and Landrigan, P. J. (2007). "Grand rounds: nephrotoxicity in a young child exposed to uranium from contaminated well water." Environ Health Perspect 115(8): 1237-1241.

Maher, J. M., Cheng, X., Slitt, A. L., Dieter, M. Z. and Klaassen, C. D. (2005). "Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver." Drug Metab Dispos 33(7): 956-962.

Maher, J. M., Dieter, M. Z., Aleksunes, L. M., Slitt, A. L., Guo, G., Tanaka, Y., Scheffer, G. L., Chan, J. Y., Manautou, J. E., Chen, Y., Dalton, T. P., Yamamoto, M. and Klaassen, C. D. (2007). "Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway." Hepatology 46(5): 1597-1610.

Mahmood, D. F., Abderrazak, A., Khadija, E. H., Simmet, T. and Rouis, M. (2013). "The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease." Antioxid Redox Signal.

Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W. and Biswal, S. (2010). "Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response

through ChIP-Seq profiling and network analysis." Nucleic Acids Res 38(17): 5718-5734.

Mao, Y., Desmeules, M., Schaubel, D., Berube, D., Dyck, R., Brule, D. and Thomas, B. (1995). "Inorganic components of drinking water and microalbuminuria." Environ Res 71(2): 135-140.

Mates, J. M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clin Biochem 32(8): 595-603.

Maynard, E. A., Randall, C. and et al. (1949). "Effects of feeding uranium nitrate hexahydrate in the diets of breeding white rats." J Pharmacol Exp Ther 95 P(4): 421-428.

Mazur, L. (2000). "Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts." Mutat Res 468(1): 27-33.

McDiarmid, M. A., Keogh, J. P., Hooper, F. J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Hamilton, M., Jacobson-Kram, D., Burrows, B. and Walsh, M. (2000). "Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans." Environ Res 82(2): 168-180.

McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R. J., Gudi, R., Jacobson-Kram, D., Thorne, C. D. and Squibb, K. S. (2006). "Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium." Int Arch Occup Environ Health 79(1): 11-21.

McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R., Gudi, R., Jacobson-Kram, D. and Squibb, K. S. (2007). "Health surveillance of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium: updating the cohort." Health Phys 93(1): 60-73.

McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Dorsey, C. D., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R., Gudi, R. and Squibb, K. S. (2009). "Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans: sixteen years of follow-up." J Toxicol Environ Health A 72(1): 14-29.

McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Dorsey, C. D., Oliver, M., Gucer, P., Gaitens, J. M., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Hoover, D., Gaspari, A. A., Shvartsbeyn, M., Brown, L. and Squibb, K. S. (2011). "Longitudinal health surveillance in a cohort of Gulf War veterans 18 years after first exposure to depleted uranium." J Toxicol Environ Health A 74(10): 678-691.

McDiarmid, M. A., Gaitens, J. M., Hines, S., Breyer, R., Wong-You-Cheong, J. J., Engelhardt, S. M., Oliver, M., Gucer, P., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Hoover, D., Gaspari, A. A., Liu, J., Harberts, E., Brown, L., Centeno, J. A., Gray, P. J., Xu, H. and Squibb, K. S. (2013). "The Gulf War depleted uranium cohort at 20 years: bioassay results and novel approaches to fragment surveillance." Health Phys 104(4): 347-361.

McDonald-Taylor, C. K., Singh, A. and Gilman, A. (1997). "Uranyl nitrate-induced proximal tubule alterations in rabbits: a quantitative analysis." Toxicol Pathol 25(4): 381-389.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2003). "Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression." J Biol Chem 278(24): 21592-21600.

Mendieta-Wejebe, J. E., Miliar-Garcia, A., Correa-Basurto, J., Sanchez-Rico, C., Ramirez-Rosales, D., Trujillo-Ferrara, J. and Rosales-Hernandez, M. C. (2013). "Comparison of

the effect of chronic cadmium exposure on the antioxidant defense systems of kidney and brain in rat." Toxicol Mech Methods 23(5): 329-336.

Meszaros, G., Bognar, G. and Koteles, G. J. (2004). "Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners." J Occup Health 46(4): 310-315.

Métivier, H. (2001). L'Uranium de l'environnement à l'Homme.

Michon, J., Frelon, S., Garnier, C. and Coppin, F. (2010). "Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching." J Fluoresc 20(2): 581-590.

Migdal, C. and Serres, M. (2011). "[Reactive oxygen species and oxidative stress]." Med Sci (Paris) 27(4): 405-412.

Milgram, S., Carriere, M., Malaval, L. and Gouget, B. (2008a). "Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation." Toxicology 252(1-3): 26-32.

Milgram, S., Carriere, M., Thiebault, C., Malaval, L. and Gouget, B. (2008b). "Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation." Toxicology 250(1): 62-69.

Miller, A. C., Blakely, W. F., Livengood, D., Whittaker, T., Xu, J., Ejnik, J. W., Hamilton, M. M., Parlette, E., John, T. S., Gerstenberg, H. M. and Hsu, H. (1998). "Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride." Environ Health Perspect 106(8): 465-471.

Miller, A. C., Stewart, M., Brooks, K., Shi, L. and Page, N. (2002a). "Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay." J Inorg Biochem 91(1): 246-252.

Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Brooks, K., Hodge, S., Shi, L., Page, N. and McClain, D. (2002b). "Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium: dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints." Radiat Prot Dosimetry 99(1-4): 275-278.

Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Prasanna, P. G. and Page, N. (2002c). "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." Mil Med 167(2 Suppl): 120-122.

Miller, A. C., Brooks, K., Stewart, M., Anderson, B., Shi, L., McClain, D. and Page, N. (2003). "Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation." J Environ Radioact 64(2-3): 247-259.

Miller, A. C., Brooks, K., Smith, J. and Page, N. (2004). "Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2)." Mol Cell Biochem 255(1-2): 247-256.

Mirto, H., Barrouillet, M. P., Henge-Napoli, M. H., Ansoborlo, E., Fournier, M. and Cambar, J. (1999a). "Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of in vitro uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells." Hum Exp Toxicol 18(3): 180-187.

Mirto, H., Henge-Napoli, M. H., Gibert, R., Ansoborlo, E., Fournier, M. and Cambar, J. (1999b). "Intracellular behaviour of uranium(VI) on renal epithelial cell in culture (LLC-PK1): influence of uranium speciation." Toxicol Lett 104(3): 249-256.

Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. and Kan, Y. W. (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 9926-9930.

Monleau, M., De Meo, M., Frelon, S., Paquet, F., Donnadieu-Claraz, M., Dumenil, G. and Chazel, V. (2006a). "Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats." Inhal Toxicol 18(11): 885-894.

Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G. and Donnadieu-Claraz, M. (2006b). "Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats." Toxicol Sci 89(1): 287-295.

Moon, Y. J., Lee, A. K., Chung, H. C., Kim, E. J., Kim, S. H., Lee, D. C., Lee, I., Kim, S. G. and Lee, M. G. (2003). "Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats." Drug Metab Dispos 31(6): 776-784.

Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2004). "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." Trends Mol Med 10(11): 549-557.

Muikku, M., Puhakainen, M., Heikkinen, T. and Ilus, T. (2009). "The mean concentration of uranium in drinking water, urine, and hair of the occupationally unexposed Finnish working population." Health Phys 96(6): 646-654.

Muller, D., Houpert, P., Cambar, J. and Henge-Napoli, M. H. (2006). "Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells." Toxicol Appl Pharmacol 214(2): 166-177.

Muller, D. S., Houpert, P., Cambar, J. and Henge-Napoli, M. H. (2008). "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells." Toxicol Sci 101(2): 254-262.

Muller, P., van Bakel, H., van de Sluis, B., Holstege, F., Wijmenga, C. and Klomp, L. W. (2007). "Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes." J Biol Inorg Chem 12(4): 495-507.

Nelson, S. K., Bose, S. K., Grunwald, G. K., Myhill, P. and McCord, J. M. (2006). "The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy." Free Radic Biol Med 40(2): 341-347.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction." Anal Biochem 95(2): 351-358.

Orloff, K. G., Mistry, K., Charp, P., Metcalf, S., Marino, R., Shelly, T., Melaro, E., Donohoe, A. M. and Jones, R. L. (2004). "Human exposure to uranium in groundwater." Environ Res 94(3): 319-326.

Orona, N. S. and Tasat, D. R. (2012). "Uranyl nitrate-exposed rat alveolar macrophages cell death: influence of superoxide anion and TNF alpha mediators." Toxicol Appl Pharmacol 261(3): 309-316.

Ortega, A., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M. and Paternain, J. L. (1989). "Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats." Bull Environ Contam Toxicol 42(6): 935-941.

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H. and Kondo, K. (2001). "Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers." Free Radic Res 34(1): 93-99.

Ozmen, M. and Yurekli, M. (1998). "Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice." Environ Toxicol Pharmacol 6(2): 111-115.

Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." Oncogene 18(49): 6853-6866.

Pallet, N., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. and Anglicheau, D. (2009). "[Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]." Nephrol Ther 5(3): 173-180.

Papanikolaou, N., Peros, G., Morphake, P., Gkikas, G., Maraghianne, D., Tsipas, G., Kostopoulos, K., Arambatze, C., Gkika, E. L. and Bariety, J. (1992). "Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats?" Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 45(2): 131-136.

Paquet, F., Frelon, S., Cote, G. and Madic, C. (2004). "Speciation and internal dosimetry: From chemical species to dosimetric models." Spéciation et dosimétrie interne: Des espèces chimiques aux modèles dosimétriques 39(3): 341-354.

Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A. M., Frelon, S. and Gourmelon, P. (2006). "Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion." Health Phys 90(2): 139-147.

Paquet, F., Adam-Guillermin, C., Ansoborlo, E., Beaugelin-Seiller, K., Carriere, M., Dublineau, I., Taran, F. and Vidaud, C. (2009). L'Uranium. Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. Lavoisier: 411-443.

Park, J. H., Seo, K. S., Tadi, S., Ahn, B. H., Lee, J. U., Heo, J. Y., Han, J., Song, M. S., Kim, S. H., Yim, Y. H., Choi, H. S., Shong, M. and Kweon, G. (2013). "An indole derivative protects against acetaminophen-induced liver injury by directly binding to N-acetyl-p-benzoquinone imine in mice." Antioxid Redox Signal 18(14): 1713-1722.

Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A. and Kosma, V. M. (1995). "Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver." Environ Res 70(2): 126-133.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. (2003). "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification." Clin Chim Acta 333(1): 19-39.

Paternain, J. L., Domingo, J. L., Ortega, A. and Llobet, J. M. (1989). "The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice." Ecotoxicol Environ Saf 17(3): 291-296.

Pearl, P. L., Taylor, J. L., Trzcinski, S. and Sokohl, A. (2007). "The pediatric neurotransmitter disorders." J Child Neurol 22(5): 606-616.

Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejnik, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M. and Landauer, M. R. (1999). "Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets." Toxicol Sci 49(1): 29-39.

Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C. S. and Ramesh, G. T. (2007). "Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells." Arch Toxicol 81(6): 389-395.

Periyakaruppan, A., Sarkar, S., Ravichandran, P., Sadanandan, B., Sharma, C. S., Ramesh, V., Hall, J. C., Thomas, R., Wilson, B. L. and Ramesh, G. T. (2009). "Uranium induces apoptosis in lung epithelial cells." Arch Toxicol 83(6): 595-600.

Petitot, F., Moreels, A. M. and Paquet, F. (2004). "In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig." Can J Physiol Pharmacol 82(2): 133-139.

Petitot, F., Frelon, S., Moreels, A. M., Claraz, M., Delissen, O., Tourlonias, E., Dhieux, B., Maubert, C. and Paquet, F. (2007a). "Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin." Health Phys 92(5): 464-474.

Petitot, F., Gautier, C., Moreels, A. M., Frelon, S. and Paquet, F. (2007b). "Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin." Radiat Prot Dosimetry 127(1-4): 125-130.

Petitot, F., Lestaevel, P., Tourlonias, E., Mazzucco, C., Jacquinot, S., Dhieux, B., Delissen, O., Tournier, B. B., Gensdarmes, F., Beaunier, P. and Dublineau, I. (2013). "Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats." Toxicol Lett 217(3): 217-225.

Petri, S., Korner, S. and Kiaei, M. (2012). "Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS." Neurol Res Int 2012: 878030.

Pinkus, R., Weiner, L. M. and Daniel, V. (1996). "Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression." J Biol Chem 271(23): 13422-13429.

Poisson, C., Rouas, C., Manens, L., Dublineau, I. and Gueguen, Y. (2013). "Antioxidant status in rat kidneys after coexposure to uranium and gentamicin." Hum Exp Toxicol.

Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehadi, H. A. and Ghalandari, R. (2006). "A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity." Environ Toxicol 21(4): 349-354.

Pourahmad, J., Shaki, F., Tanbakosazan, F., Ghalandari, R., Ettehadi, H. A. and Dahaghin, E. (2011). "Protective effects of fungal beta-(1-->3)-D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes." Hum Exp Toxicol 30(3): 173-181.

Prasad, A. S. (2009). "Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 12(6): 646-652.

Prat, O., Berenguer, F., Malard, V., Tavan, E., Sage, N., Steinmetz, G. and Quemeneur, E. (2005). "Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity." Proteomics 5(1): 297-306.

Price, D. J. and Joshi, J. G. (1983). "Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal ions." J Biol Chem 258(18): 10873-10880.

Priest, N. D., Howells, G. R., Green, D. and Haines, J. W. (1982). "Uranium in bone: metabolic and autoradiographic studies in the rat." Hum Toxicol 1(2): 97-114.

Pritchard, J. B. and Miller, D. S. (1993). "Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations." Physiol Rev 73(4): 765-796.

Priyamvada, S., Khan, S. A., Khan, M. W., Khan, S., Farooq, N., Khan, F. and Yusufi, A. N. (2010). "Studies on the protective effect of dietary fish oil on uranyl-nitrate-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(1): 35-44.

Querfeld, U. and Mak, R. H. (2010). "Vitamin D deficiency and toxicity in chronic kidney disease: in search of the therapeutic window." Pediatr Nephrol 25(12): 2413-2430.

Racine, R., Grandcolas, L., Grison, S., Gourmelon, P., Gueguen, Y., Veyssiere, G. and Souidi, M. (2009). "Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137." Food Chem Toxicol 47(7): 1642-1647.

Racine, R., Grandcolas, L., Blanchardon, E., Gourmelon, P., Veyssiere, G. and Souidi, M. (2010). "Hepatic cholesterol metabolism following a chronic ingestion of cesium-137 starting at fetal stage in rats." J Radiat Res 51(1): 37-45.

Raymond-Whish, S., Mayer, L. P., O'Neal, T., Martinez, A., Sellers, M. A., Christian, P. J., Marion, S. L., Begay, C., Propper, C. R., Hoyer, P. B. and Dyer, C. A. (2007). "Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice." Environ Health Perspect 115(12): 1711-1716.

Redler, R. L. and Dokholyan, N. V. (2012). "The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Prog Mol Biol Transl Sci 107: 215-262.

Reisman, S. A., Csanaky, I. L., Aleksunes, L. M. and Klaassen, C. D. (2009a). "Altered disposition of acetaminophen in Nrf2-null and Keap1-knockdown mice." Toxicol Sci 109(1): 31-40.

Reisman, S. A., Csanaky, I. L., Yeager, R. L. and Klaassen, C. D. (2009b). "Nrf2 activation enhances biliary excretion of sulfobromophthalein by inducing glutathione-S-transferase activity." Toxicol Sci 109(1): 24-30.

Ren, D., Villeneuve, N. F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H. A. and Zhang, D. D. (2011). "Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A 108(4): 1433-1438.

Renault, S., Faiz, H., Gadet, R., Ferrier, B., Martin, G., Baverel, G. and Conjard-Duplany, A. (2010). "Uranyl nitrate inhibits lactate gluconeogenesis in isolated human and mouse renal proximal tubules: a 13C-NMR study." Toxicol Appl Pharmacol 242(1): 9-17.

Ropenga, A., Chapel, A., Vandamme, M. and Griffiths, N. M. (2004). "Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat." Radiat Res 161(5): 597-602.

Rouas, C., Souidi, M., Grandcolas, L., Grison, S., Baudelin, C., Gourmelon, P., Pallardy, M. and Gueguen, Y. (2009). "Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat : impact of a uranium chronic exposure " Environnemental Toxicology and Pharmacology 28(3): 363-369.

Rouas, C. (2010). Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition à l'uranium appauvrisur le système de détoxification *in vivo* et *in vitro*, Paris-Sud.

Rouas, C., Bensoussan, H., Suhard, D., Tessier, C., Grandcolas, L., Rebiere, F., Dublineau, I., Taouis, M., Pallardy, M., Lestaevel, P. and Gueguen, Y. (2010). "Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentrations." Chem Res Toxicol 23(12): 1883-1889.

Rouas, C., Stefani, J., Grison, S., Grandcolas, L., Baudelin, C., Dublineau, I., Pallardy, M. and Gueguen, Y. (2011). "Effect of nephrotoxic treatment with gentamicin on rats chronically exposed to uranium." Toxicology 279(1-3): 27-35.

Saito, H. (2013). "Toxico-pharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases." Biochem Pharmacol 85(7): 865-872.

Salonen, L. (1994). "238U series radionuclides as a source of increased radioactivity in groundwater originating from Finnish bedrock." Future groundwater resources at risk: 71-84.

Sano, K., Fujigaki, Y., Miyaji, T., Ikegaya, N., Ohishi, K., Yonemura, K. and Hishida, A. (2000). "Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate." Kidney Int 57(4): 1560-1570.

Sano, R. and Reed, J. C. (2013). "ER stress-induced cell death mechanisms." Biochim Biophys Acta.

Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P., Williams, R. J., Cadenas, E. and Rice-Evans, C. (2002). "MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide." Neurobiol Aging 23(5): 861-880.

Selden, A. I., Lundholm, C., Edlund, B., Hogdahl, C., Ek, B. M., Bergstrom, B. E. and Ohlson, C. G. (2009). "Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells." Environ Res 109(4): 486-494.

Sen Gupta, R., Sen Gupta, E., Dhakal, B. K., Thakur, A. R. and Ahnn, J. (2004). "Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species." Mol Cells 17(1): 132-139.

Shaikh, Z. A., Vu, T. T. and Zaman, K. (1999). "Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants." Toxicol Appl Pharmacol 154(3): 256-263.

Shaki, F., Hosseini, M. J., Ghazi-Khansari, M. and Pourahmad, J. (2012). "Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria." Biochim Biophys Acta 1820(12): 1940-1950.

Shaki, F., Hosseini, M. J., Ghazi-Khansari, M. and Pourahmad, J. (2013). "Depleted uranium induces disruption of energy homeostasis and oxidative stress in isolated rat brain mitochondria." Metallomics 5(6): 736-744.

Shelton, L. M., Park, B. K. and Copple, I. M. (2013). "Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury." Kidney Int 19(10): 248.

Shen, G. and Kong, A. N. (2009). "Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters." Biopharm Drug Dispos 30(7): 345-355.

Shin, S. M., Yang, J. H. and Ki, S. H. (2013). "Role of the Nrf2-ARE Pathway in Liver Diseases." Oxid Med Cell Longev 2013: 763257.

Siegel, D., Bolton, E. M., Burr, J. A., Liebler, D. C. and Ross, D. (1997). "The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant." Mol Pharmacol 52(2): 300-305.

Siegel, D. and Ross, D. (2000). "Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues." Free Radic Biol Med 29(3-4): 246-253.

Siegel, D., Yan, C. and Ross, D. (2012). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones." Biochem Pharmacol 83(8): 1033-1040.

Signorini, C., De Felice, C., Durand, T., Oger, C., Galano, J. M., Leoncini, S., Pecorelli, A., Valacchi, G., Ciccoli, L. and Hayek, J. (2013). "Isoprostanes and 4-hydroxy-2-nonenal: markers or mediators of disease? Focus on Rett syndrome as a model of autism spectrum disorder." Oxid Med Cell Longev 343824(10): 13.

Simic, M. G. and Jovanovic, S. V. (1989). "Antioxidation mechanisms of uric acid." Journal of the American Chemical Society 111(15): 5778-5782.

Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R. K., Rath, S. K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S. N., Bunz, F., Watson, W. H., Gabrielson, E., Feinstein, E. and Biswal, S. (2008). "RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy." Cancer Res 68(19): 7975-7984.

Singh, P., Jain, A. and Kaur, G. (2004). "Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage." Mol Cell Biochem 260(1-2): 153-159.

Sivils, J. C., Ancrum, T. M. and Bain, L. J. (2013). "LOSS of Mrp1 alters detoxification enzyme expression in a tissue- and hormonal-status-specific manner." J Appl Toxicol 33(8): 766-773.

Souidi, M., Gueguen, Y., Linard, C., Dudoignon, N., Grison, S., Baudelin, C., Marquette, C., Gourmelon, P., Aigueperse, J. and Dublineau, I. (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.

Squibb, K. S. and McDiarmid, M. A. (2006). "Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361(1468): 639-648.

Stearns, D. M., Yazzie, M., Bradley, A. S., Coryell, V. H., Shelley, J. T., Ashby, A., Asplund, C. S. and Lantz, R. C. (2005). "Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells." Mutagenesis 20(6): 417-423.

Storz, P. and Toker, A. (2003). "NF-kappaB signaling--an alternate pathway for oxidative stress responses." Cell Cycle 2(1): 9-10.

Sugimoto, H., Okada, K., Shoda, J., Warabi, E., Ishige, K., Ueda, T., Taguchi, K., Yanagawa, T., Nakahara, A., Hyodo, I., Ishii, T. and Yamamoto, M. (2010). "Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 298(2): G283-294.

Suzuki, K. (2009). "Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use?" Adv Drug Deliv Rev 61(4): 287-289.

Sztajnkrycer, M. D. and Otten, E. J. (2004). "Chemical and radiological toxicity of depleted uranium." Mil Med 169(3): 212-216.

Taguchi, K., Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2011). "Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution." Genes Cells 16(2): 123-140.

Tanaka, Y., Aleksunes, L. M., Goedken, M. J., Chen, C., Reisman, S. A., Manautou, J. E. and Klaassen, C. D. (2008). "Coordinated induction of Nrf2 target genes protects against iron nitrilotriacetate (FeNTA)-induced nephrotoxicity." Toxicol Appl Pharmacol 231(3): 364-373.

Tang, W., Sadovic, S. and Shaikh, Z. A. (1998). "Nephrotoxicity of cadmium-metallothionein: protection by zinc and role of glutathione." Toxicol Appl Pharmacol 151(2): 276-282.

Taulan, M., Paquet, F., Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J. and Romey, M. C. (2004). "Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice." Environ Health Perspect 112(16): 1628-1635.

Taulan, M., Paquet, F., Argiles, A., Demaille, J. and Romey, M. C. (2006). "Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure." BMC Genomics 7: 2.

Tessier, C., Suhard, D., Rebiere, F., Souidi, M., Dublineau, I. and Agarande, M. (2012). "Uranium microdistribution in renal cortex of rats after chronic exposure: a study by secondary ion mass spectrometry microscopy." Microsc Microanal 18(1): 123-133.

Thakor, A. S., Paulmurugan, R., Kempen, P., Zavaleta, C., Sinclair, R., Massoud, T. F. and Gambhir, S. S. (2011). "Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells." Small 7(1): 126-136.

Thiebault, C., Carriere, M., Milgram, S., Simon, A., Avoscan, L. and Gouget, B. (2007). "Uranium induces apoptosis and is genotoxic to normal rat kidney (NRK-52E) proximal cells." Toxicol Sci 98(2): 479-487.

Thijssen, S., Cuypers, A., Maringwa, J., Smeets, K., Horemans, N., Lambrichts, I. and Van Kerkhove, E. (2007). "Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys." Toxicology 236(1-2): 29-41.

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. and Biswal, S. (2002). "Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray." Cancer Res 62(18): 5196-5203.

Tirmarche, M., Baysson, H. and Telle-Lamberton, M. (2004). "[Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies]." Rev Epidemiol Sante Publique 52(1): 81-90.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Paquet, F., Aigueperse, J. and Souidi, M. (2006). "Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat." Arch Toxicol 80(8): 473-480.

Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Grandcolas, L., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. and Souidi, M. (2007). "In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on vitamin D3 metabolism in rat." Biochim Biophys Acta 1770(2): 266-272.

Tournier, B. B., Frelon, S., Tourlonias, E., Agez, L., Delissen, O., Dublineau, I., Paquet, F. and Petitot, F. (2009). "Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain." Toxicol Lett 190(1): 66-73.

Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M. and Kumagai, Y. (2011). "Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury." Environ Health Perspect 119(8): 1117-1122.

Tsipas, G. and Morphake, P. (2003). "Beneficial effects of a diet rich in a mixture of n - 6/n - 3 essential fatty acids and of their metabolites on cyclosporine - nephrotoxicity." J Nutr Biochem 14(11): 626-632.

Tymen, H., Gerasimo, P. and Hoffschir, D. (2000). "Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber." Int J Radiat Biol 76(10): 1417-1424.

Ubios, A. M., Guglielmotti, M. B., Steimetz, T. and Cabrini, R. L. (1991). "Uranium inhibits bone formation in physiologic alveolar bone modeling and remodeling." Environ Res 54(1): 17-23.

Ubios, A. M., Marzorati, M. and Cabrini, R. L. (1997). "Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability." Health Phys 72(5): 713-715.

Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., de Cabo, R. and Csiszar, A. (2010). "Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2." Am J Physiol Heart Circ Physiol 299(1): H18-24.

Vacquier, B., Caer, S., Rogel, A., Feurprier, M., Tirmarche, M., Luccioni, C., Quesne, B., Acker, A. and Laurier, D. (2008). "Mortality risk in the French cohort of uranium miners: extended follow-up 1946-1999." Occup Environ Med 65(9): 597-604.

Vacquier, B., Rogel, A., Leuraud, K., Caer, S., Acker, A. and Laurier, D. (2009). "Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners: modifying factors of the exposure-risk relationship." Radiat Environ Biophys 48(1): 1-9.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact 160(1): 1-40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39(1): 44-84.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol 3(7): RESEARCH0034.

Vicente-Vicente, L., Quiros, Y., Perez-Barriocanal, F., Lopez-Novoa, J. M., Lopez-Hernandez, F. J. and Morales, A. I. (2010). "Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives." Toxicol Sci 118(2): 324-347.

Waalkes, M. P. (2000). "Cadmium carcinogenesis in review." J Inorg Biochem 79(1-4): 241-244.

Wade-Gueye, N. M., Delissen, O., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I. and Souidi, M. (2012). "Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats." Biochim Biophys Acta 1820(7): 1121-1127.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. and Beyersmann, D. (2003). "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis." Toxicology 192(2-3): 95-117.

Wang, C. Y. and Chau, L. Y. (2010). "Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives." Chang Gung Med J 33(1): 13-24.

Watjen, W. and Beyersmann, D. (2004). "Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress." Biometals 17(1): 65-78.

WHO (2003). Lead in drinking water. Background document for developement of WHO Guidelines for Drinking-water Quality

World Health Organization.

WHO (2006). Guidelines for Drinking-water Quality. First addendum to third edition, World Health Organization Volume 1.

WHO (2011). Guidelines for drinking-water Quality, Fourth edition., World Health Organization

WHO (2012). Uranium in Drinking-water, World Health Organization

Wierinckx, A., Breve, J., Mercier, D., Schultzberg, M., Drukarch, B. and Van Dam, A. M. (2005). "Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells." J Neuroimmunol 166(1-2): 132-143.

Wilmes, A., Crean, D., Aydin, S., Pfaller, W., Jennings, P. and Leonard, M. O. (2011). "Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity." Toxicol In Vitro 25(3): 613-622.

Wolf, G., Arndt, D., Kotschy-Lang, N. and Obe, G. (2004). "Chromosomal aberrations in uranium and coal miners." Int J Radiat Biol 80(2): 147-153.

Wong, C. G., Bottiglieri, T. and Snead, O. C., 3rd (2003). "GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease." Ann Neurol 54(6): S3-12.

Wrenn, M. E., Durbin, P. W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E. T. and Willis, D. L. (1985). "Metabolism of ingested U and Ra." Health Phys 48(5): 601-633.

Wu, C. H., Lin, J. A., Hsieh, W. C. and Yen, G. C. (2009). "Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro." J Agric Food Chem 57(11): 5058-5064.

Wu, K. C., Liu, J. J. and Klaassen, C. D. (2012). "Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury." Toxicol Appl Pharmacol 263(1): 14-20.

Xu, Y. Q., Zhang, D., Jin, T., Cai, D. J., Wu, Q., Lu, Y., Liu, J. and Klaassen, C. D. (2012). "Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice." PLoS One 7(8): e44237.

Yapar, K., Cavusoglu, K., Oruc, E. and Yalcin, E. (2010). "Protective role of Ginkgo biloba against hepatotoxicity and nephrotoxicity in uranium-treated mice." J Med Food 13(1): 179-188.

Yasutake, A. and Hirayama, K. (1988). "Sex and strain differences of susceptibility to methylmercury toxicity in mice." Toxicology 51(1): 47-55.

Yoshihara, D., Fujiwara, N. and Suzuki, K. (2010). "Antioxidants: benefits and risks for long-term health." Maturitas 67(2): 103-107.

Yu, S. Y., Chung, H. C., Kim, E. J., Kim, S. H., Lee, I., Kim, S. G. and Lee, M. G. (2002). "Effects of acute renal failure induced by uranyl nitrate on the pharmacokinetics of intravenous theophylline in rats: the role of CYP2E1 induction in 1,3-dimethyluric acid formation." J Pharm Pharmacol 54(12): 1687-1692.

Zaire, R., Notter, M., Riedel, W. and Thiel, E. (1997). "Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners." Radiat Res 147(5): 579-584.

Zamora, M. L., Tracy, B. L., Zielinski, J. M., Meyerhof, D. P. and Moss, M. A. (1998). "Chronic ingestion of uranium in drinking water: a study of kidney bioeffects in humans." Toxicol Sci 43(1): 68-77.

Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J. and Zhang, F. (2013). "Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection." Prog Neurobiol 100: 30-47.

Zhang, Y. K., Wu, K. C., Liu, J. and Klaassen, C. D. (2012). "Nrf2 deficiency improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet." Toxicol Appl Pharmacol 264(3): 305-314.

Zhao, H., Cheng, J., Cai, J., Cheng, Z., Cui, Y., Gao, G., Hu, R., Gong, X., Wang, L. and Hong, F. (2012). "Liver injury and its molecular mechanisms in mice caused by exposure to cerium chloride." Arch Environ Contam Toxicol 62(1): 154-164.

Zhu, G., Tan, M., Li, Y., Xiang, X., Hu, H. and Zhao, S. (2009a). "Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments." J Radiat Res (Tokyo) 50(3): 183-192.

Zhu, G., Xiang, X., Chen, X., Wang, L., Hu, H. and Weng, S. (2009b). "Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats." Arch Toxicol 83(1): 37-46.

Zhu, H., Zhang, L., Amin, A. R. and Li, Y. (2008). "Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress." Exp Biol Med (Maywood) 233(6): 753-765.

◆ L'Uranium (U) est un métal lourd radioactif dispersé dans l'environnement. Du fait de cette présence naturelle mais aussi de ses applications civiles et militaires, la population générale peut être exposée à l'U par ingestion d'eau de boisson ou d'aliments contaminés. Le système pro/anti-oxydant est un système de défense fréquemment impliqué lors d'une exposition aiguë à l'uranium. L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle du système pro/anti-oxydant après contamination chronique à l'U dans le foie et les reins. Après contamination chronique de rats à différentes concentrations d'U *via* l'eau de boisson, une accumulation dose dépendante de l'U dans les organes -jusqu'à 6 µg/g dans les reins- ainsi qu'une localisation préférentielle de l'U dans le noyau des cellules du tube contourné proximal sont observées. L'absence de néphrotoxicité observée, même à la plus forte concentration, pourrait s'expliquer par le renforcement du système anti-oxydant et notamment l'augmentation du taux de glutathion. L'étude des effets de la contamination à l'U chez un modèle déficient pour Nrf2, facteur de transcription cytoprotecteur impliqué dans la défense anti-oxydante, a mis en évidence une accumulation d'U plus importante chez les animaux Nrf2 $^{-/-}$. Néanmoins, les effets biologiques de l'U sur le système pro/anti-oxydant ne semblent pas impliquer Nrf2. Par ailleurs, il existe une corrélation entre la localisation de l'U dans des cellules HepG2 en culture et les effets biologiques sur ce système après exposition à de faibles concentrations d'U. Ce radionucléide se localise dans les noyaux sous forme soluble et l'apparition de précipités est corrélée à la mise en place de mécanismes d'adaptation qui sont ensuite débordés au cours du temps et de la concentration, laissant apparaître une toxicité cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le renforcement du système anti-oxydant serait un mécanisme d'adaptation après exposition chronique à faible concentration d'U.

Mots-clés : Uranium, contamination chronique, Nrf2, Système pro/anti-oxydant, rein, foie.

◆ Uranium is a radioactive heavy metal found in the environment. Due to its natural presence and to civil and militaries activities, general population can be exposed to U throughout drinking water or contaminated food. The pro/anti-oxidative system is a defense system which is often implicated in case of acute exposure to U. The aim of this thesis is to study the role of the pro/anti-oxidative system after chronic exposure to U in the liver and the kidney. After chronic exposure of rats to different U concentrations through drinking water, this radionuclide accumulated in the organs in proportion to U intake ; until 6 µg.g-1 of kidney tissues. U is localized in nucleus of the proximal tubular cells of the kidney. No nephrotoxicity was described even for the higher U level in drinking water and a reinforcement of the pro/anti-oxidative system with an increase in glutathione is observed. The study of U internal contamination in Nrf2 deficient mice, a cytoprotective transcription factor involved in the anti-oxidative defense has been realized. U accumulate more in Nrf2 $^{-/-}$ mice than in WT mice but the biologic effects of U on the pro/anti-oxidative system did not seem to implicate Nrf2. At the cell level, a correlation between U distribution in HepG2 cells and the biological effects on this system is observed after U exposure at low concentrations. Soluble distribution of U is observed in cell nucleus. The apparition of U precipitates is correlated to the establishment of the adaptive mechanisms overtime which are overwhelmed and lead to a cellular toxicity at higher U level. In conclusion, these results suggest that the reinforcement of pro/anti-oxidative system could be an adaptive mechanism after chronic exposure at low U concentration.

Key words : Uranium, chronic exposure, Nrf2, pro/anti-oxidative system, liver, kidney

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11-UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »